
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)**

**EMBRIOGÊNESE E DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL DE XYRIDACEAE E
MAYACACEAE E ANATOMIA FLORAL DE *Xyris*, COM ÊNFASE NA
EVOLUÇÃO DE CARACTERES**

KAIRE DE OLIVEIRA NARDI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

**RIO CLARO/SP
Agosto - 2018**

KAIRE DE OLIVEIRA NARDI

**EMBRIOGÊNESE E DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL DE XYRIDACEAE E
MAYACACEAE E ANATOMIA FLORAL DE *Xyris*, COM ÊNFASE NA EVOLUÇÃO
DE CARACTERES**

Orientadora: Profa. Dra. Aline Oriani

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutora em Ciências Biológicas
(Biologia Vegetal).

Rio Claro – SP

2018

581.4 Nardi, Kaire de Oliveira
N223e Embriogênese e desenvolvimento pós-seminal de
Xyridaceae e Mayacaceae e anatomia floral de Xyris, com
ênfase na evolução de caracteres / Kaire de Oliveira Nardi. -
Rio Claro, 2018
105 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Aline Oriani

1. Anatomia vegetal. 2. Embrião. 3. Gineceu. 4.
Opérculo. 5. Placentação. 6. Plântula. I. Título.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Embriogênese e desenvolvimento pós-seminal em Xyridaceae e Mayacaceae e Anatomia floral de Xyris, com ênfase na evolução de caracteres

AUTORA: KAIRE DE OLIVEIRA NARDI

ORIENTADORA: ALINE ORIANI MAGANHATO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ALINE ORIANI MAGANHATO
Pós Doutoranda do Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



Profa. Dra. VERA LUCIA SCATENA
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



Profa. Dra. SIMONE DE PÁDUA TEIXEIRA
Departamento de Ciências Farmacêuticas / FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO



Profa. Dra. JULIANA LISCHKA SAMPAIO MAYER
Depto de Biologia Vegetal / UNICAMP



Profa. Dra. SHIRLEY MARTINS SILVA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ

Rio Claro, 30 de agosto de 2018

ERRATA:

Onde se lê: Embriogênese e desenvolvimento pós-seminal em Xyridaceae e Mayacaceae e Anatomia floral de Xyris, com ênfase na evolução de caracteres.

Leia-se: Embriogênese e desenvolvimento pós-seminal de Xyridaceae e Mayacaceae e anatomia floral de Xyris, com ênfase na evolução de caracteres.



Dedico este trabalho aos meus pais, e a minha avó (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - Câmpus de Rio Claro pela infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento desta Tese.

Agradeço às agências de fomento que possibilitaram a realização deste trabalho: ao CNPQ (160640/2014-8), pela bolsa de doutorado concedida por meio do Programa de Pós-Graduação, bem como à CAPES/PDSE (88881.132211/2016-01) pela bolsa de doutorado sanduíche.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal), aos professores e funcionários do Departamento de Botânica, em especial à Profa. Dra. Alessandra Ike Coan, que coordenou o PPG durante a maior parte do desenvolvimento desta Tese e atuou como parecerista dos relatórios anuais, e às funcionárias Celinha Hebling (Departamento de Botânica) e Ivana Brandt (Seção de Pós-Graduação) pela solicitude.

Em especial, agradeço à minha orientadora, Aline Oriani pelos valiosos ensinamentos, por compartilhar o conhecimento e me incentivar a buscar sempre mais, por me ajudar a perseverar e nunca desistir, pelo apoio, paciência e carinho. Enfim, obrigada por me orientar não apenas quanto pesquisadora, mas também quanto ser humano. Foram quase 7 anos de muitas alegrias. Agradeço as minhas ex-orientadoras também, Daniela Guimarães Simão e Vera Lucia Scatena pela orientação durante a graduação e mestrado e por estarem sempre torcendo por mim. I would like to thank Dr. Lisa Campbell for the internship opportunity and for kindly providing some species of *Xyris*. I also thank the New York Botanical Garden for the infrastructure provided. Agradeço a Cinara, Suzana e Pedro por toda ajuda nos EUA.

Agradeço aos meus amigos em especial ao Kleber, por ter me ajudado a acompanhar parte do desenvolvimento pós-seminal no período em que eu estava no sanduíche; ao Luís e Augusto por me ajudarem nas análises estatísticas e filogenéticas, respectivamente; a Blanca, Mariana, Paula, Ana Angélica, Mara, Fernanda, Gisele, Letícia, Arthur e Naiara, pela troca de ensinamentos e convivência no laboratório e ao Diego, que esteve ao meu lado nos meses finais de doutorado me apoiando. Muito obrigada a minha família, pelo amor, carinho, apoio, compreensão e por me apoiarem em todas as minhas decisões. Dedico-lhes esta etapa de minha vida.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.

(Chico Xavier)

RESUMO

Xyridaceae e Mayacaceae são famílias relacionadas, incluídas na ordem Poales. Xyridaceae é grupo-irmão de Eriocaulaceae e ambas as famílias formam o clado xyrídeo. Já Mayacaceae tem posição filogenética instável, emergindo ora no clado xyrídeo, ora no clado cyperídeo. Este trabalho teve como objetivo estudar comparativamente a embriogênese e o desenvolvimento pós-seminal em Xyridaceae e Mayacaceae, buscando contribuir com o entendimento sobre as relações interfamiliares e sobre a evolução de caracteres do embrião e da plântula em Poales. Somando-se a isso, estudou-se o desenvolvimento e a anatomia floral em *Xyris* para elucidar a evolução do gineceu no gênero, que é dividido em três seções com base nas características do ovário como número de lóculos e tipo de placentação. Embriogênese do tipo Asterado, embrião diferenciado e formação de suspensor são condições ancestrais em Poales. Embriogênese do tipo Asterado é compartilhada por Xyridaceae e Eriocaulaceae, enquanto que o tipo Onagrado encontrado em Mayacaceae aproxima essa família das cyperídeas. Além disso, confirmamos que as sementes de Mayacaceae não são operculadas, uma característica há tempos questionada e apontada como provável sinapomorfia do clado xyrídeo. O cotilédone compacto é o estado de caráter ancestral e mais comum em Poales, a partir do qual os outros tipos de cotilédone derivaram, como hipofilo cotiledonar laminar em *Xyris* e coleóptilo em Mayacaceae. O coleóptilo é outra característica compartilhada por Mayacaceae e Cyperaceae, dando suporte ao posicionamento de Mayacaceae no clado cyperídeo. A respeito do gineceu em Xyridaceae, a placentação axilar é o estado de caráter ancestral na família, tendo derivado para a condição parietal intrusiva na subfamília Abolbodoideae. Em *Xyris* (Xyridoideae), a placentação axilar é a condição ancestral, a partir da qual derivou a placentação parietal na seção *Xyris* e a placentação central-livre e basal na seção *Nematopus*, pela redução e esterilização da zona sinascidiada e alongamento da zona simplicada ao longo da evolução do gênero.

Palavras-chave: coleóptilo; cotilédone compacto; embrião; evolução de caracteres; gineceu; hipofilo cotiledonar laminar; opérculo; placentação; plântula; semente.

ABSTRACT

Xyridaceae and Mayacaceae are related families, which are included in the Poales. Xyridaceae is sister-group of Eriocaulaceae and both families form the xyrid clade. Mayacaceae has an unstable phylogenetic position, emerging either in the xyrid clade, or in the cyperid clade. This study aimed to analyze the embryogenesis and post-seminal development of Xyridaceae and Mayacaceae in a comparative approach to better understand the interfamilial relationships and the evolution of some embryo and seedling traits within Poales. The floral development and anatomy were also analyzed in *Xyris* to elucidate the evolution of gynoecium in the genus, which is divided into three sections based on ovary traits such as number of locules and type of placentation. Embryo development of the Asterad-type, differentiated embryo and formation of suspensor are ancestral conditions in Poales. Xyridaceae and Eriocaulaceae share the embryogenesis of Asterad-type, whereas the embryogenesis of Onagrad-type links Mayacaceae to the cyperid families. In addition, our results confirm that the seeds of Mayacaceae are non-operculate, a trait that has been questioned and pointed out as a probable synapomorphy of the xyrid clade. Compact cotyledon is the ancestral condition and a common character state within Poales, from which blade-like hypophyll and coleoptile have derived in *Xyris* and in Mayacaceae, respectively. Coleoptile is another feature shared by Mayacaceae and Cyperaceae, and it may also support the positioning of Mayacaceae in the cyperid clade. Regarding the gynoecium in Xyridaceae, axile placentation is the most likely state at the base of the family, from which intrusive-parietal placentation has derived in the Abolbodoideae. The axile placentation is the ancestral condition in *Xyris* and shift to parietal placentation in *Xyris* sect. *Xyris*, and to free-central or basal placentation in *Xyris* sect. *Nematopus* by shortening and sterilization of the synascidiate zone and elongation of the fertile symplicate zone during the evolution of the genus.

Key-words: coleoptile; compact cotyledon; embryo; character evolution; gynoecium; blade-like hypophyll; operculum; placentation; seed; seedling.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	08
Referências bibliográficas	20
CAPÍTULO 1 Embryogenesis in Xyridaceae and Mayacaceae and evolution of embryological characters in Poales	25
Abstract	26
Introduction	27
Material and methods	29
Results	31
Discussion	36
References	41
Illustrations	48
Table	63
CAPÍTULO 2 Germinação, desenvolvimento pós-seminal e evolução do cotilédone em <i>Xyris</i> (Xyridaceae, Poales)	64
Resumo	65
Introdução	66
Material e métodos	69
Resultados	72
Discussão	75
Conclusões	83
Referências	84
Ilustrações	89
Tabela	109

CAPÍTULO 3 Desenvolvimento pós-seminal em Mayacaceae: as sementes de <i>Mayaca</i> são operculadas e o cotilédone é do tipo compacto?	110
Resumo	111
Introdução	112
Material e métodos	115
Resultados	119
Discussão	122
Conclusões	128
Referências	130
Ilustrações	136
Tabela	149
Material suplementar	150
CAPÍTULO 4 Inferences on the gynoecium evolution in <i>Xyris</i> (Xyridaceae) based on floral anatomy and development	152
Abstract	153
Introduction	154
Material and methods	157
Results	158
Discussion	163
References	167
Illustrations	170
Table	195
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	196

INTRODUÇÃO GERAL

Famílias estudadas

Xyridaceae compreende cerca de 430 espécies, agrupadas em duas subfamílias: Abolbodoideae, que inclui os gêneros *Abolboda* Bonpl. (23 spp.), *Achlyphila* Maguire & Wurdack (1 sp.), *Aratitiopea* Steyerl. & P.E. Berry (1 sp.) e *Orectanthe* Maguire (2 spp.), ocorrentes no norte da América do Sul, sendo os três últimos restritos ao Planalto das Guianas (KRAL, 1992, 1998; CAMPBELL, 2005; STEVENS, 2018), e Xyridoideae, que inclui *Xyris* (ca. 400 spp.), de distribuição pantropical. Os representantes de Xyridaceae são adaptados a uma variedade de habitats, geralmente oligotróficos e sazonalmente úmidos, como savanas, pântanos e afloramentos rochosos, como campos rupestres (KRAL, 1998; CAMPBELL, 2005) (**Fig. 1A-B**).

As Xyridaceae são ervas perenes ou anuais; apresentam caule com entrenós geralmente curtos, com folhas de filotaxia dística ou espiralada; bainha foliar aberta e lâmina achatada ou cilíndrica (**Fig. 1C-D**). A partir do caule desenvolvem-se os escapos, que portam inflorescências racemosas, alongadas (*Xyris* e *Abolboda*) ou globosas (*Orectanthe*, *Achlyphila* e *Aratitiopea*). As flores são trímeras, pentacíclicas, heteroclamídeas, com sépalas livres a concrecidas, sendo as sépalas latero-adaxiais carenadas; as pétalas podem ser livres ou fundidas e são amarelas em *Xyris* (**Fig. 1E**) e *Orectanthe*, vermelhas em *Aratitiopea*, alvas em *Achlyphila* e alvas ou azuis a arroxeadas em *Abolboda*. Os estames são epipétalos, sendo o verticilo externo ausente, ou reduzido a estaminódios (*Xyris* e *Abolboda*); as anteras são bitecas, tetrasporangiadas, com deiscência rimosa. O gineceu é tricarpelar, com ovário súpero, e o fruto é do tipo cápsula loculicida, com sementes pequenas, castanhas, numerosas, arredondadas, exceto em *Orectanthe*, que apresenta sementes maiores, achatadas e aladas (KRAL, 1992, 1998; WANDERLEY, 1992, 2011).

As subfamílias Abolbodoideae e Xyridoideae são bastante distintas morfológica e anatomicamente (KRAL, 1992, 1998). As flores de Xyridoideae diferem das de Abolbodoideae pela simetria actinomorfa, corola dialipétala, pelo estilete tripartido e sem apêndices e pelos óvulos ortótopos (KRAL, 1998, 1992; ORIANI; SCATENA, 2012). Do ponto de vista embriológico, Xyridoideae difere por apresentar envoltório seminal formando por endotégmen, endotesta e exotesta, desenvolvimento da parede da antera do tipo reduzido, tapete secretor, uniestratificado, e grãos de pólen elípticos, sulcados, com exina reticulada (RUDALL; SAJO, 1999; CAMPBELL, 2004, 2012). Em Abolbodoideae os óvulos são

anátropos, o envoltório seminal é formado por endotégmen, exotégmen, endotesta e exotesta, o desenvolvimento da parede da antera é do tipo monocotiledôneo, o tapete é plasmodial, multiestratificado, e os grãos de pólen são esféricos, inaperturados, com exina espiculada ou clavada (CAMPBELL, 2012; ORIANI; SCATENA, 2014, 2015, 2017).

O primeiro estudo taxonômico de Xyridaceae no Brasil foi realizado por Seubert (1855), seguido pelos trabalhos de Malme (1896, 1898, 1901, 1912, 1913a, b, 1929) e Smith & Downs (1968). Maguire publicou trabalhos referentes às espécies ocorrentes no Planalto das Guianas (MAGUIRE, 1958; MAGUIRE; WURDACK, 1960; MAGUIRE; SMITH, 1964), enquanto Kral contribuiu para o conhecimento acerca das espécies ocorrentes em todo o norte da América do Sul. Kral também colaborou com Smith (KRAL; SMITH, 1980, 1982a, b) e Wanderley (KRAL; WANDERLEY, 1988a, b, 1992, 1995), sendo que esta última autora vem publicando continuamente trabalhos sobre a taxonomia da família (WANDERLEY, 2003, 2010, 2011; SILVA; WANDERLEY, 2013; MOTA; WANDERLEY, 2013, 2014).

Com relação à *Xyris*, a maior concentração de espécies ocorre no norte da América do Sul, sendo reconhecidos dois centros de diversidade, um na Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais e da Bahia e o outro nos tepuis da Venezuela (WANDERLEY, 2011). Essas espécies habitam ambientes abertos como os do Cerrado, incluindo a vegetação dos campos rupestres, ou bordas de matas na Mata Atlântica. Algumas espécies estão presentes nas campinaranas da Floresta Amazônica e na vegetação dos campos sulinos (WANDERLEY, 2011).

As espécies de *Xyris* são divididas em três seções, com base nas características do ovário, como o número de lóculos e o tipo de placentação. Essas seções são: *Xyris* Endl. (ca. 140 espécies, com distribuição pantropical), com ovário unilocular e placentação parietal; *Nematopus* Seub. (ca. 250 espécies, com distribuição neotropical), com ovário unilocular e placentação central-livre ou basal; e *Pomatoxyris* Endl. (22 espécies restritas à Austrália), com ovário trilocular e placentação axilar (DOUST; CONN, 1994).

Em estudo filogenético de Xyridaceae baseado em dados mitocondriais (*cox3* e *orf25*) e plastidiais (*matK*, *ndhF* e *rbcL*), tanto o gênero *Xyris* como as suas três seções emergem como monofiléticos, com alto suporte filogenético (MOTA, 2014) (**Fig. 2**). Além disso, as espécies da seção *Nematopus* emergem formando sete clados, que foram denominados de clados A, B, C, D, E e F (MOTA, 2014). A seção australiana *Pomatoxyris* aparece como a primeira linhagem divergente do gênero, como grupo-irmão das demais espécies de *Xyris* incluídas nas seções *Xyris* e *Nematopus* (MOTA, 2014). No entanto, para obter uma filogenia mais completa e robusta de *Xyris*, marcadores moleculares adicionais e uma amostragem taxonômica mais abrangente, incluindo espécies da África, Ásia, Austrália e do Planalto das

Guianas são essenciais (MOTA, 2014).

A família Mayacaceae inclui apenas um gênero, *Mayaca* Aubl., com 4-10 espécies de distribuição neotropical (STEVENSON, 1998). As espécies de Mayacaceae distribuem-se de modo disjunto pelas Américas e África, sendo que a maioria delas concentra-se na América do Sul, enquanto que somente *Mayaca baumii* Gürke é encontrada no continente africano (STEVENSON, 1998). No Brasil, ocorrem quatro espécies, sendo *M. fluviatilis* Aubl. e *M. sellowiana* Kunth as espécies mais bem distribuídas, ocorrendo em todas as cinco regiões do país (MONTEIRO; CARVALHO, 2014).

Os representantes de Mayacaceae são ervas perenes ou anuais, aquáticas ou anfíbias; apresentam caule curto ou alongado, ereto quando emerso ou rastejante, com canais aeríferos e raízes adventícias em um único ponto ou por toda extensão do caule. As folhas são espiraladas, simples, sésseis, uninervadas e filiformes. As flores são isoladas, ou organizadas em inflorescências terminais com duas a três flores, trímeras, pentacíclicas, actinomorfas, dialissépalas, dialipétalas, de coloração branca ou róseo-arroxeadas (Fig. 1F). Os três estames são alternos às pétalas, apresentando filetes livres, anteras basifixas, tetrasporangiadas a bisporangiadas, com deiscência poricida. O ovário é súpero, tricarpelar, unilocular, com óvulos ortótopos, placentação parietal e estilete terminal alongado. O fruto é capsular, trivalvar, e as sementes são ovóides ou globosas e escorbiculadas (STEVENSON, 1998; CARVALHO, 2007).

Aublet (1775) descreveu o gênero *Mayaca* a partir da espécie *Mayaca fluviatilis* Aubl. A partir daí outras espécies e gêneros relacionados foram descritos até Kunth (1841) reconhecer Mayacaceae como uma família monogênica, com quatro espécies. No entanto, mesmo com o reconhecimento da família, essas espécies foram posteriormente incluídas em outras famílias como Xyridaceae (GRISEBACH, 1866; VAN TIEGHEM, 1898) e Commelinaceae (HUTCHINSON, 1934). A primeira revisão taxonômica de Mayacaceae, realizada por Lourteig (1952), estabeleceu a família, compreendendo quatro espécies: *Mayaca fluviatilis*, *M. sellowiana*, *M. baumii* e *M. longipes* Mart. ex Seub. De acordo com Venturelli e Bouman (1986), vários caracteres embriológicos embasam o reconhecimento de Mayacaceae como uma família. Mais recentemente, Carvalho (2007) também realizou a revisão taxonômica de Mayacaceae, resgatando as mesmas quatro espécies reconhecidas por Lourteig (1952), diferenciando-as principalmente pelo número de esporângios e pelo comprimento dos poros das anteras. A delimitação e o reconhecimento das espécies na fase vegetativa são dificultados pela heterofilia, uma vez que os indivíduos anfíbios produzem diferentes tipos de folhas acima e abaixo da água (WELLS; PIGLIUCCI, 2000).

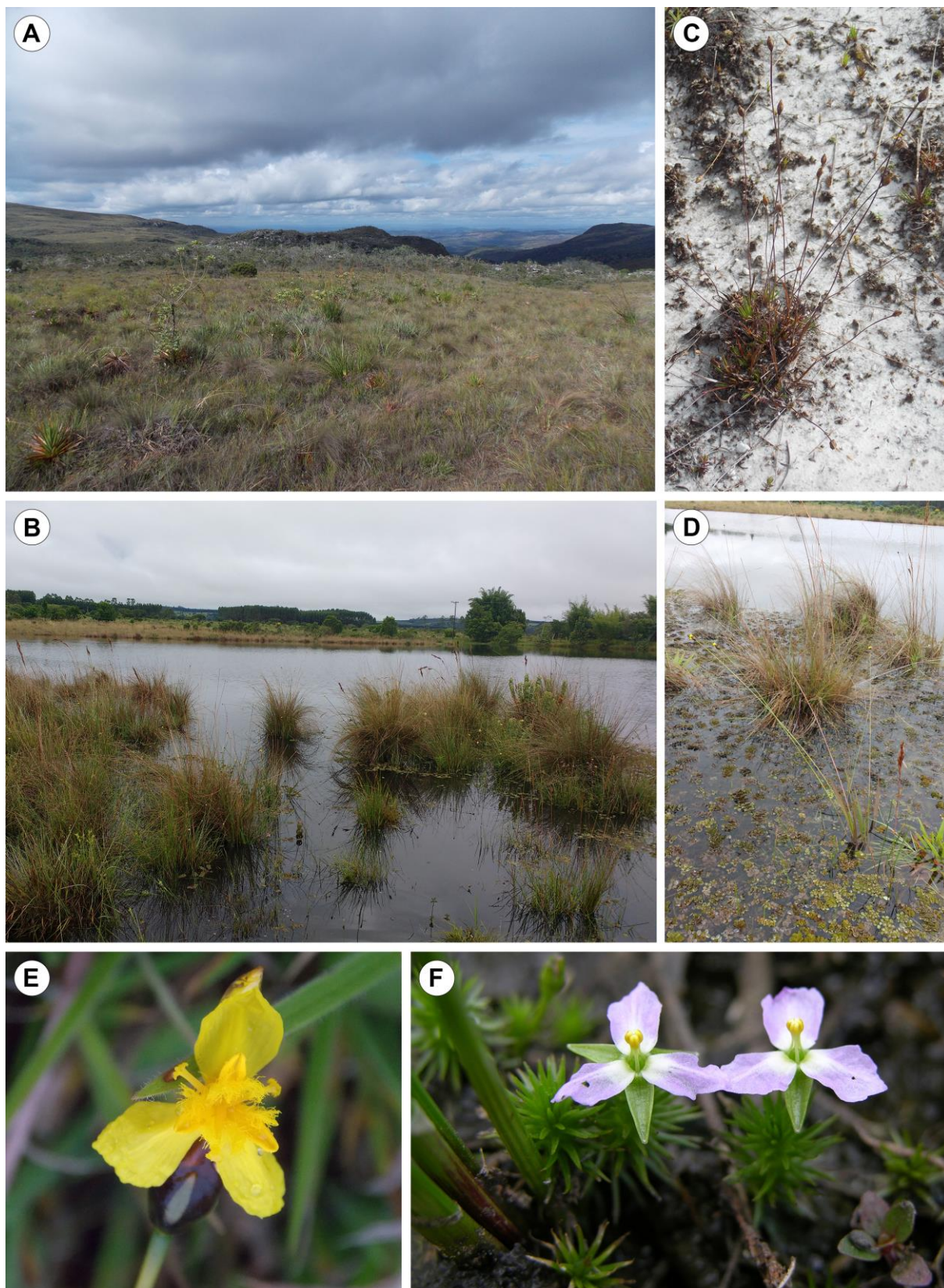


Figura 1. Hábitat, hábito e morfologia de *Xyris* (Xyridaceae) e *Mayaca* (Mayacaceae). A. Campos rupestres da Serra do Cipó - MG. B. Áreas de campos úmidos (cerrado) em Itirapina – SP. C. Hábito de *Xyris* sp. D. Hábito de *Xyris macrocephala*. E. Inflorescência de *Xyris trachyphylla*., com uma flor em antese. F. Flores em antese de *Mayaca fluviatilis*.

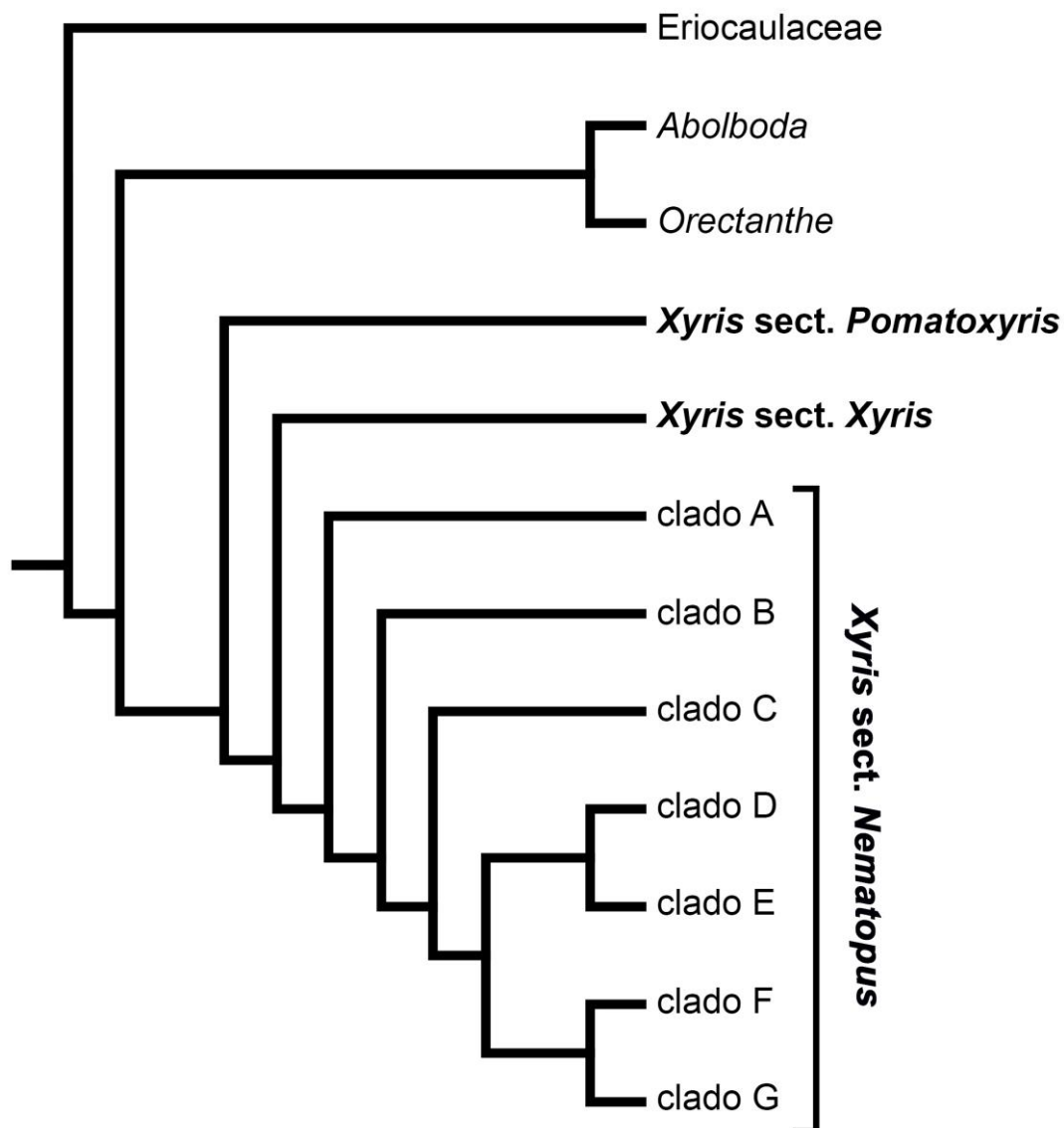


Figura 2. Árvore de máxima verossimilhança obtida pela combinação de sequências mitocondriais (*cox3* e *orf25*) e plastidiais (*matK*, *ndhF* e *rbcL*), mostrando o posicionamento dos gêneros de Xyridaceae e seções de *Xyris*. Extraída de Mota (2014).

Posição filogenética de Xyridaceae e Mayacaceae

Xyridaceae e Mayacaceae estão inseridas em Poales, ordem que compreende cerca de um terço das monocotiledôneas (LINDER; RUDALL, 2005). As 16 famílias dessa ordem formam cinco clados: bromelídeo (Typhaceae e Bromeliaceae), xyrídeo (Xyridaceae e Eriocaulaceae), restiídeo (Anarthriaceae, Restionaceae e Centrolepidaceae), graminídeo (Flagellariaceae, Joinvilleaceae, Ecdeicoleaceae e Poaceae) e cyperídeo (Mayacaceae, Rapateaceae, Thurniaceae, Juncaceae e Cyperaceae) (BOUCHENAK-KHELLADI et al., 2014) (**Fig. 3**).

A posição filogenética de Mayacaceae é bastante instável, enquanto Xyridaceae e Eriocaulaceae quase sempre aparecem como grupos-irmãos (GIVNISH et al., 1999, 2005, 2006; CHASE et al., 2000, 2006; BREMER, 2002; BOUCHENAK-KHELLADI et al., 2014). No entanto, Xyridaceae apresenta problemas no entendimento das relações infrafamiliares (CAMPBELL et al., 2009) e nem sempre emerge como monofilética.

Em análise filogenética de Poales baseada em dados morfológicos e plastidiais (*rbcL* e *atpA*), *Orectanthe* aparece como grupo-irmão de *Abolboda* e ambos os gêneros formam um clado que é grupo-irmão do clado composto por *Xyris*, Eriocaulaceae e Mayacaceae (MICHELANGELI et al., 2003). Em análise filogenética baseada apenas em dados plastidiais (*rbcL* e *atpA*) e que inclui quatro dos cinco gêneros de Xyridaceae, *Abolboda*, *Aratitiopea* e *Orectanthe* formam um clado que é grupo-irmão de Eriocaulaceae, enquanto *Xyris* aparece como grupo-irmão de Mayacaceae (DAVIS et al., 2004).

Já a análise filogenética mais recente e abrangente de Poales, baseada em dados plastidiais (*rbcL* e *ndhF*), resgatou Xyridaceae como monofilética (BOUCHENAK-KHELLADI et al., 2014). Essa análise incluiu quatro dos cinco gêneros da família (exceto *Achlyphila*), os quais apareceram agrupados em dois clados, um deles incluindo as espécies de *Xyris* e o outro as espécies dos demais gêneros (BOUCHENAK-KHELLADI et al., 2014, comunicação pessoal). Já Mayacaceae, nas diferentes análises filogenéticas de Poales, aparece incluída no clado das xyrídeas, juntamente com Eriocaulaceae e Xyridaceae (GIVNISH et al., 1999, 2005, 2006); como grupo-irmão do clado das cyperídeas (Cyperaceae, Juncaceae e Thurniaceae) (CHASE et al., 2000; CHRISTIN et al., 2008), ou do clado formado pelas cyperídeas, mais Eriocaulaceae-Xyridaceae (GIVNISH et al., 2005, 2006; CHASE et al., 2006), ou ainda como grupo-irmão de Eriocaulaceae (GIVNISH et al., 2010). Na análise de Bouckenak-Khelladi et al. (2014), Mayacaceae emerge no clado cyperídeo, juntamente com Rapateaceae, Thurniaceae, Juncaceae e Cyperaceae, porém com baixo suporte filogenético, enquanto que o clado xyrídeo emerge com alto suporte, formado apenas por Xyridaceae e Eriocaulaceae. Assim, estudos anatômicos e de desenvolvimento mostram-se importantes, pois permitem identificar homologias que possam dar suporte ao posicionamento filogenético dessas famílias.

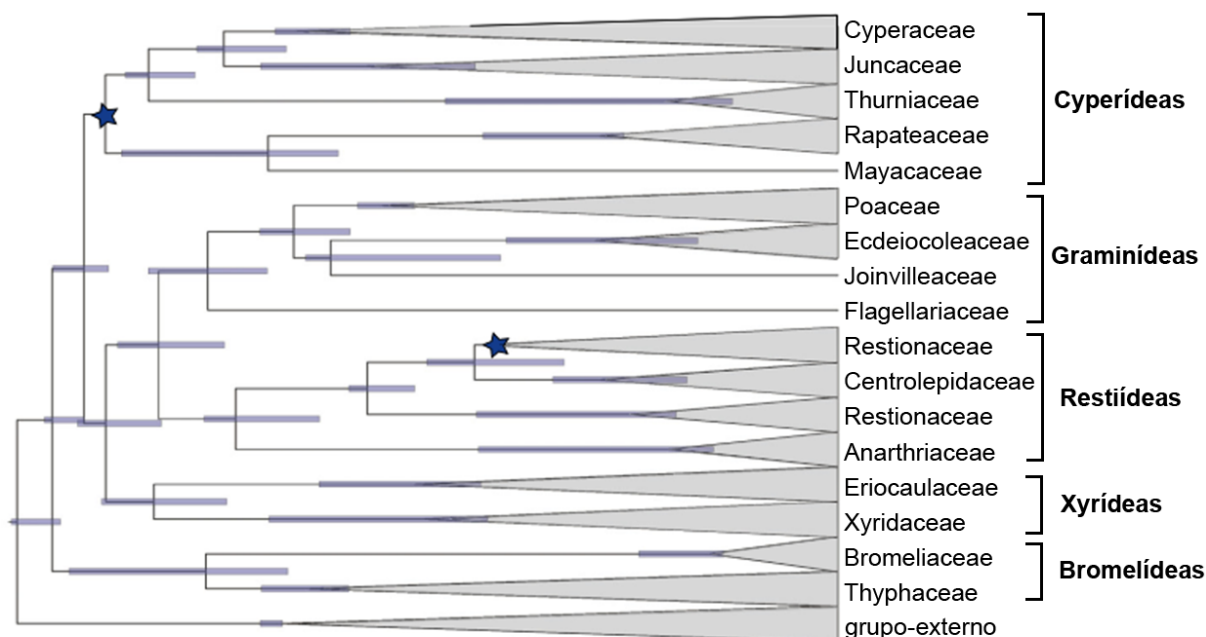


Figura 3. Árvore de credibilidade máxima obtida por análise Bayesiana MCMC (Monte Carlo Markov chain) a partir de sequências plastidiais (*rbcL* e *ndhF*), mostrando o posicionamento das famílias dentro dos clados de Poales. As estrelas indicam baixo suporte filogenético (<0.9). Extraída de Bouchenak-Khelladi et al. (2014).

Embriogênese e desenvolvimento pós-seminal de Xyridaceae e Mayacaceae

Algumas características embriológicas são compartilhadas por Xyridaceae, Mayacaceae e Eriocaulaceae, como óvulos bitegmentados e tenuinucelados, sementes com hipóstase taninífera, endosperma amilífero e embriões indiferenciados, campanulados (VENTURELLI; BOUMAN, 1986; SCATENA; BOUMAN, 2001; COAN et al., 2010; ORIANI; SCATENA, 2014, 2017; NARDI et al., 2015). Todos esses trabalhos citados descrevem o desenvolvimento do óvulo e das sementes, mas não incluem a embriogênese.

Estudos abordando a embriogênese e o desenvolvimento pós-seminal em Xyridaceae e Mayacaceae ainda são escassos. O embrião maduro e algumas fases iniciais de seu desenvolvimento foram descritos em dez espécies de *Xyris* (WEINZIEHER, 1914; RUDALL; SAJO, 1999; NARDI et al., 2015), em quatro espécies de *Abolboda* (CARLQUIST, 1960; ORIANI; SCATENA, 2014) e em uma espécie de *Orectanthe* (CARLQUIST, 1960). Todas as fases do desenvolvimento do embrião foram analisadas apenas em *Xyris pauciflora* e em *Mayaca fluviatilis* (GOVINDAPPA, 1955; VENTURELLI; BOUMAN, 1986, respectivamente). Esses estudos mostram que a embriogênese é do tipo Onagrado em Mayacaceae e do tipo Asterado em Xyridaceae, assim como em Eriocaulaceae

(RAMASWAMY; AREKAL, 1982). No entanto, esses trabalhos deixam dúvidas quanto às divisões celulares que ocorrem no início da embriogênese, que podem ser regulares ou irregulares, quanto à formação e a presença ou não do suspensor no embrião maduro, e não descrevem a variação do tipo de embriogênese. Além disso, em Xyridaceae, observam-se diferenças na orientação das divisões celulares, as quais conferem sutis variações no formato do embrião, e a presença de estruturas semelhantes à coleorriza no embrião (CARLQUIST, 1960; ORIANI; SCATENA, 2014; NARDI et al., 2015) que carecem de investigação.

O desenvolvimento pós-seminal foi estudado, sob o ponto de vista morfológico, em *Xyris longiscapa*, *X. platystachia*, *X. nubigena* (KRAUS et al., 1994) e *X. natalensis* (TILLICH, 2007). Nas quatro espécies estudadas parte do cotilédone fica retida no interior da semente no início da germinação com a função de absorver nutrientes do endosperma (KRAUS et al., 1994; TILLICH, 2007). A plântula de *Xyris* apresenta inicialmente uma estrutura tubular, com um disco ou colar de tricomas ou rizoides na sua porção distal, e dessa estrutura tubular se originam a raiz primária e as primeiras folhas (KRAUS et al., 1994; TILLICH, 2007). Segundo Tillich (2007), que realizou estudo comparativo do desenvolvimento pós-seminal em vários representantes de Poales, a estrutura da plântula fornece caracteres úteis para delimitar famílias e gêneros dentro da ordem. Em Xyridaceae, por exemplo, *Orectanthe* diferencia-se de *Xyris* pelas plântulas apresentarem cotilédone compacto, enquanto que este último gênero apresenta hipofilo cotiledonar laminar (TILLICH, 2007).

Em Mayacaceae, o estudo do desenvolvimento pós-seminal foi realizado apenas em *Mayaca fluviatilis* por Tillich (2007), que descreveu o cotilédone como do tipo compacto e reduzido à sua parte haustorial, que fica retida dentro da semente. Diante dessas variações e do valor taxonômico já reconhecido dos caracteres da plântula, estudos de desenvolvimento pós-seminal abordando também os aspectos anatômicos das plântulas em um número maior de espécies dessas famílias mostram-se relevantes, permitindo comparações e inferências evolutivas.

Tipos de cotilédone em Poales e seus aspectos evolutivos

O cotilédone possui origem embrionária e apresenta uma região denominada hipofilo, que é a parte basal (proximal) do cotilédone, e outra região denominada hiperfilo, que é a parte apical (distal) (TILLICH, 2007). Essas partes do cotilédone podem apresentar diferentes morfologias e funções, resultando nos diferentes tipos de cotilédone, que são: compacto

(apresentando bainha reduzida ou lobo mediano da bainha desenvolvido), hipofilo cotiledonar laminar, coleóptilo e fanerômero. Esses diferentes tipos foram apontados por Tillich (2007) como estados de caráter com valor taxonômico em Poales, podendo ser utilizados para realizar inferências a respeito das relações entre as famílias da ordem.

O **cotilédone compacto** é constituído pelo hiperfilo haustorial e pelo hipofilo com uma pequena bainha cotiledonar. Essa bainha reduzida, que corresponde a parte apical do hipofilo, teria se desenvolvido ao longo da evolução, formando o lobo mediano da bainha que envolve os primórdios foliares. O hipofilo também pode ser expandido formando uma estrutura de assimilação semelhante a uma lâmina, denominada **hipofilo cotiledonar laminar**; ou se diferenciar no **coleóptilo**, uma estrutura tubular produzida pela atividade meristemática do tecido marginal da bainha cotiledonar, e que por meio desse processo de crescimento a margem foliar cotiledonar é elevada e forma uma abertura distal no coleóptilo de onde as primeiras folhas emergem a partir do epicótilo. Já o **fanerômero** compreende a parte proximal do hiperfilo cotiledonar que eleva a semente bem acima da superfície do solo, sendo, nesse caso, o primeiro órgão de assimilação da plântula (TILLICH, 2007).

Por meio de estudo comparativo da morfologia de plântulas das famílias de Poales e de análise de reconstrução do estado de caráter ancestral, Tillich (2007) hipotetizou que o cotilédone compacto seria a condição ancestral da ordem, a partir da qual todos os outros tipos teriam derivado, ou pelo alongamento do hipofilo, como observado no hipofilo cotiledonar laminar e no coleóptilo, ou pelo alongamento do hiperfilo, como observado no fanerômero (**Fig. 4**).

Cotilédone do tipo compacto está presente em Xyridaceae (*Xyris* e *Orectanthe*) e Mayacaceae e, dentre as Poales, ocorre também em Bromeliaceae, Rapateaceae, Restionaceae, Flagellariaceae e Ecdeicoleaceae. Já o hipofilo cotiledonar laminar ocorre em *Xyris* (Xyridaceae) e em Bromeliaceae. Cyperaceae, Restionaceae, Joinvilleaceae, Ecdeicoleaceae e Poaceae apresentam coleóptilo; e Typhaceae, Thurniaceae, Juncaceae, Restionaceae, Cetrolepidaceae e Anarthriaceae possuem fanerômero (TILLICH, 2007).

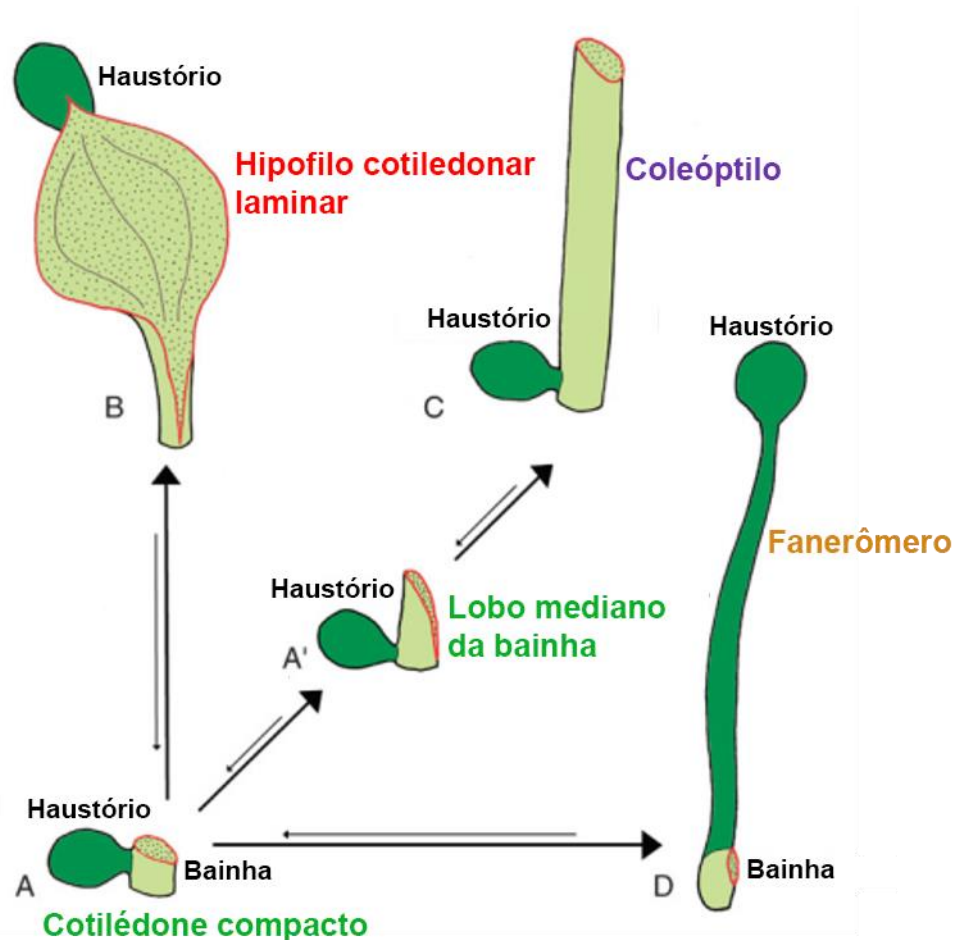


Figura 4. Evolução dos tipos de cotilédone em Poales. Cotilédone compacto como provável ancestral, a partir do qual derivaram o cotilédone compacto com o lobo mediano da bainha desenvolvido, o coleóptilo, o hipofilo cotiledonar laminar e o fanerômero. Extraído de Tillich (2007).

Opérculo

Uma característica da semente que aproxima Xyridaceae de Eriocaulaceae é a presença de opérculo (NARDI et al., 2015; ORIANI; SCATENA, 2014). Estudos anatômicos com representantes de Poales indicam que essa estrutura é exclusiva dessas duas famílias dentro da ordem (SCATENA; BOUMAN, 2001; COAN et al., 2010; ORIANI; SCATENA, 2014; NARDI et al., 2015), podendo representar uma sinapomorfia do clado xyrídeo. Em Xyridaceae, a ontogenia do opérculo foi estudada apenas recentemente em representantes de *Xyris* (NARDI et al., 2015) e de *Abolboda* (ORIANI; SCATENA, 2014), tendo origem a partir dos tegumentos interno e externo do óvulo, enquanto que em Eriocaulaceae tem origem apenas do tegumento interno (SCATENA; BOUMAN 2001; COAN et al., 2010). Acredita-se que o opérculo se rompe pelo crescimento do eixo embrionário em um processo passivo

durante a germinação da semente (COAN et al., 2010), no entanto, não foi realizado nenhum estudo abordando sua funcionalidade nessas famílias.

Em Mayacaceae, a ocorrência de opérculo nas sementes ainda é discutida. Sua presença foi relatada por Hamann (1961) e, embora Venturelli & Bouman (1986) afirmem que as sementes de *Mayaca fluviatilis* não apresentam opérculo, suas ilustrações mostram a formação de uma estrutura diferenciada na região micropilar da semente, que se forma a partir dos tegumentos interno e externo do óvulo, fechando a micrópila. Assim, estudos anatômicos com representantes de Mayacaceae são necessários a fim de determinar a presença ou não dessa estrutura na semente e suas prováveis funções.

Anatomia floral de Xyridaceae

Com relação à anatomia floral de Xyridaceae, o primeiro trabalho realizado envolveu *Xyris asperula* Mart., *X. filifolia* Alb. Nilsson, *X. hymenachne* Mart., *X. macrocephala* Vahl., *X. paradisiaca* Wanderley, *X. seubertii* Alb. Nilsson e *X. veruina* Malme e teve enfoque na vascularização (SAJO et al., 1997). As autoras mostraram que todas as espécies estudadas apresentam o mesmo padrão de vascularização, com a formação de um complexo vascular central e três complexos periféricos no receptáculo da flor, dos quais divergem os traços de todas as peças florais. Sajo et al. (1997) também mostraram que os traços dos estaminódios são associados aos traços laterais das pétalas e, a partir disso, hipotetizaram que, no processo de especialização floral, estaminódios reverteram à condição petalar e se incorporaram à corola, contribuindo para o surgimento de gamopetalia em Abolbodoideae.

Além disso, foi estudada a anatomia e o desenvolvimento floral de *Xyris grandis* Ridl. (REMIZOWA et al., 2012), com ênfase no perianto, indicando que cada sépala recebe apenas um feixe vascular do estelo e que cada pétala recebe três feixes vasculares, condição oposta à observada na maioria das monocotiledôneas. Com relação ao gineceu, Remizowa et al. (2012) relataram a ocorrência de uma zona sinascidiada estéril reduzida e uma zona simplicada fértil, salientando que uma atenção maior deve ser dada à estrutura do ovário nas espécies de *Xyris*, dada sua importância para a classificação infragenérica.

Um estudo mais recente abordou comparativamente a anatomia floral de espécies de *Xyris*, *Abolboda* e *Orectanthe*, mostrando que o padrão de vascularização das flores difere entre os gêneros e que em todas as espécies com estaminódios, os traços dos estaminódios estão associados aos traços laterais das pétalas (SAJO et al., 2017), corroborando a hipótese de Sajo et al. (1997). Este estudo também mostrou que apesar de Xyridaceae ser grupo-irmão

de Eriocaulaceae, os apêndices do estilete não são homólogos, mas provavelmente evoluíram independentemente nessas duas famílias. Em todos os estudos acima citados nenhum enfoque foi dado à estrutura do gineceu, seu desenvolvimento e tipos de placentação, o que difere entre os gêneros da família e também dentro de *Xyris*, caracterizando suas seções. Enquanto espécies de Abolbodoideae apresentam placentação parietal intrusiva (CARLQUIST, 1960; ORIANI; SCATENA, 2012), em *Xyris*, como já relatado, a placentação varia de axilar (*Xyris* sect. *Pomatoxyris*), parietal (*Xyris* sect. *Xyris*) a central-livre ou basal (*Xyris* sect. *Nematopus*) (DOUST; CONN, 1994). Assim, considerando a diversidade morfológica do gineceu em *Xyris* e seu valor taxonômico, estudos de anatomia e desenvolvimento floral são pertinentes, pois permitirão identificar as vias ontogenéticas responsáveis por sua variação dentro do gênero.

Assim, diante das lacunas de informações referentes à embriogênese e ao desenvolvimento pós-seminal em Xyridaceae e Mayacaceae e à anatomia e desenvolvimento floral em *Xyris* (Xyridaceae), e considerando a importância desses dados para o entendimento da evolução do grupo, essa tese foi escrita e dividida em quatro capítulos: o primeiro deles sobre a embriogênese em Xyridaceae e Mayacaceae e a evolução de caracteres embriológicos em Poales; o segundo sobre germinação, desenvolvimento pós-seminal e evolução dos tipos de cotilédone em *Xyris* (Xyridaceae); o terceiro sobre o desenvolvimento pós-seminal em Mayacaceae, investigando a presença ou não do opérculo e evolução dos tipos de cotilédone em Poales; e o quarto sobre anatomia e desenvolvimento floral em *Xyris* (Xyridaceae), com ênfase na evolução do gineceu.

Referências bibliográficas

- AUBLET, F. Histoires des plantes de la Guiane Française. Paris: Paris, 1775.
- BOUCHENAK-KHELLADI, Y.; MUAYA, A. M.; LINDER, H. P. A revised evolutionary history of Poales: origins and diversification. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 175, p. 4-16, 2014.
- BREMER, K. Gondwanan evolution of the grass alliance of families (Poales). Evolution, v. 56, p. 1374-1387, 2002.
- CAMPBELL, L. M. Anatomy and systematics of Xyridaceae, with special reference to *Aratitiopea* Steyerl. & P.E. Berry. Tese de Doutorado - City University of New York, New York, 2004.
- CAMPBELL, L. M. Contributions towards a monograph of Xyridaceae: a revised nomenclature of *Abolboda*. Harvard Papers in Botany, v. 10, p. 137-145, 2005.
- CAMPBELL, L. M. Pollen morphology of Xyridaceae (Poales) and its systematic potential. Botanical Review, v. 78, p. 428-439, 2012.
- CAMPBELL, L. M.; WANDERLEY, M. G. L.; OLIVEIRA, G. Xyridaceae. Neotropikey: interactive key to the flowering plants of the Neotropics. Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em:
<<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey.htm>>. Acesso em: 28 mar. 2009.
- CARLQUIST, S. Anatomy of Guayana Xyridaceae: *Abolboda*, *Orectanthe* and *Achlyphila*. Memoirs of the New York Botanical Garden, v. 10, p. 65-117, 1960.
- CARVALHO, M. L. S. Estudos taxonômicos em Mayacaceae Kunth. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.
- CHASE, M. W.; FAY, M. F.; DEVEY, D. S.; MAURIN, O.; RONSTED, N.; DAVIES, T. J.; PILLON, Y.; PETERSEN, G.; SEBERG, O.; TAMURA, M. N.; ASMUSSEN, C. B.; HILU, K.; BORSCH, T.; DAVIS, J. I.; STEVENSON, D. W.; PIRES, J.C.; GIVNISH, T. J.; SYTSMA, K. J.; MCPHERSON, M. A.; GRAHAM, S. W.; RAI, H. S. Multigene analyses of monocot relationships: a summary. Aliso, v. 23, p. 62-74, 2006.
- CHASE, M. W.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P.S.; RUDALL, P. J.; FAY, M. F.; HAHN, W.H.; SULLIVAN, S.; JOSEPH, J.; MOLVRAY, M.; KORES, P.J.; GIVNISH, T. J.; SYTSMA, K. J.; PIRES, J. C. Higher-level systematics of the monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification. In: Wilson KL, Morrison DA (Eds). Monocots: systematics and evolution. Melbourne: CSIRO, 3-16. 2000.
- CHRISTIN P. A.; BESNARD G.; SAMARITANI E.; DUVALL M. R.; HODKINSON T. R.; SAVOLAINEN V.; SALAMIN N. Oligocene CO₂ decline promoted C₄ photosynthesis in rasses. Current Biology, v. 18, p. 37-43, 2008.
- COAN, A. I.; STÜTZEL, T.; SCATENA, V. L. Comparative embryology and taxonomic considerations in Eriocaulaceae (Poales). Feddes Repertorium, v. 121, p. 268-284, 2010.
- DAVIS, J. I.; STEVENSON, D. W.; PETERSEN, G.; SEBERG, O.; CAMPBELL, L. M.; FREUDENSTEIN, J. V.; GOLDMAN, D. H. A phylogeny of the monocots, as inferred from *rbcL* and *atpA* sequence variation, and a comparison of methods for calculating jackknife and bootstrap values. Systematic Botany, v. 29, p. 467-510, 2004.
- DOUST, A. N.; CONN, B. J. *Xyris* L. section *Xyris* (Xyridaceae) in Australia. Australian Systematic Botany, v. 7, p. 455-484, 1994.

- GIVNISH, T. J.; EVANS, T. M.; PIRES, J. C.; SYTSMA, K. J. Polyphyly and convergent morphological evolution in Commelinales and Commelinidae: evidence from *rbcL* sequence data. Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 12, p. 360-385, 1999.
- GIVNISH, T. J.; PIRES, J. C.; GRAHAM, S. W.; MCPHERSON, M. A.; PRINCE, L. M.; PATTERSON, T. B.; RAI, H. S.; ROALSON, E. H.; EVANS, T. M.; HAHN, W. J.; MILLAM, K. C.; MEEROW, A. W.; MOLVRAY, M.; KORES, P. J.; O'BRIEN, H. E.; HALL, J. C.; KRESS, W. J.; SYTSMA, K. J. 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 B, v. 272, p. 1481-1490, 2005.
- GIVNISH, T. J.; PIRES, J. C.; GRAHAM, S. W.; MCPHERSON, M. A.; PRINCE, L. M.; PATTERSON, T. B.; RAI, H. S.; ROALSON, E. H.; EVANS, T. M.; HAHN, W. J.; MILLAM, K. C.; MEEROW, A. W.; MOLVRAY, M.; KORES, P. J.; O'BRIEN, H. E.; HALL, J. C.; KRESS, W. J.; SYTSMA, K. J. Phylogenetic relationships of monocots based on the highly informative plastid gene *ndhF*: evidence for widespread concerted convergence. Aliso, v. 22, p. 28-51, 2006.
- GIVNISH, T. J.; AMES, M.; MCNEAL, J. R.; MCKAIN, M. R.; STEELE, P. R.; DEPAMPHILIS, C. W.; GRAHAM, S. W.; PIRES, J. C.; STEVENSON, D. W.; ZOMLEFER, W. B.; BRIGGS, B. G.; DUVAL, M. R.; MOORE, M. J.; HEANEY, J. M.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; THIELE, K.; LEEBENS-MACK, J. H. Assembling the tree of the monocotyledons: plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. Annals of the Missouri Botanical Garden, v. 97, p. 584-66, 2010.
- GOVINDAPPA, D. A. Embryological studies in *Xyris pauciflora* Wild. Proceedings of the Indian Academy of Sciences, Section B, v. 42, p. 47-57, 1955.
- GRISEBACH, A. Catalogus Plantarum Cubensium. Leipzig, v.1-4, p. 301, 1866.
- HAMANN, U. Merkmalsbestand und Verwandtschaftsbeziehungen der Farinosae: Ein Beitrag zum System der Monocotyledonen. Willdenowia, v. 2, p. 639-763, 1961.
- HUTCHINSON, J. The families of flowering plants II. Monocotyledons, London: Mac Millan & Co, 1934.
- KRAL, R. A. Treatment of American Xyridaceae exclusive of *Xyris*. Annals of the Missouri Botanical Garden, v. 79, p. 819-885, 1992.
- KRAL, R. Xyridaceae. In: Kubitzki K (*Ed.*). The families and genera of vascular plants. IV. Flowering plants. Monocotyledons: Alismataceae and Commelinaceae (except Gramineae), Berlin: Springer, p. 461-469, 1998.
- KRAL, R.; SMITH, L. B. Xyridaceae Brasiliae I. Bradea, v. 3, p. 57-64, 1980.
- KRAL, R.; SMITH, L. B. Xyridaceae Brasiliae II. Bradea, v. 3, p. 273-298, 1982a.
- KRAL, R.; SMITH, L. B. *Xyris apureana* Kral & Smith, a new species of *Xyris* (sect. *Nematopus*) from Venezuela. Annals of the Missouri Botanical Garden, v. 69, p. 412-414, 1982b.
- KRAL, R.; WANDERLEY, M. G. L. Ten novelties in *Xyris* (Xyridaceae) from the Planalto of Brazil. Annals of the Missouri Botanical Garden, v. 75, p. 352- 372, 1988a.
- KRAL, R.; WANDERLEY, M. G. L. Two new *Xyris* (Xyridaceae) from the Amazon Basin of Brazil. Annals of the Missouri Botanical Garden, v. 74, p. 912- 916, 1988b.
- KRAL, R.; WANDERLEY, M. G. L. Five new taxa of *Xyris* L. (Xyridaceae) from Brazil. Kew Bulletin, v. 48, p. 577-588, 1992.

- KRAL, R.; WANDERLEY, M. G. L. Xyridaceae. In: Stannard B.L (Ed.). Flora of Pico das Almas, Chapada da Diamantina, Bahia, Brazil. Royal Botanic Gardens, Kew, p. 781-802, 1995.
- KRAUS, J. E.; SAJO, M. G.; DIAS-LEME, C. L.; WANDERLEY, M. G. L. Aspectos morfológicos do desenvolvimento pós-seminal em espécies de *Xyris* L. (Xyridaceae). Hoehnea, v. 21, p. 29-38, 1994.
- KUNTH, C. S. Über *Mayaca* Aubl. Abhandlungen der Königlichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, p. 39, v. 1-4, 1841.
- LINDER, H. P.; RUDALL, P. J. Evolutionary history of Poales. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics, v. 36, p. 107-124, 2005.
- LOURTEIG, A. Mayacaceae. Notulae Systematicae, v.14, p. 234-248, 1952.
- MAGUIRE, B. Xyridaceae. In: Maguire B, Wurdack JJ & Collaborators. The botany of the Guayana Highland-Part III. Memoirs of the New York Botanical Garden, v. 10, p. 1-156, 1958.
- MAGUIRE, B.; SMITH, L. B. Xyridaceae. In: Maguire B, Wurdack J.J. & Collaborators. The botany of the Guayana Highland - Part V. Memoirs of the New York Botanical Garden, v. 10, p. 1-278, 1964.
- MAGUIRE, B.; WURDACK, J. J. Xyridaceae. In: Maguire B, Wurdack J.J. & Collaborators. The botany of the Guayana Highland - Part IV. Memoirs of the New York Botanical Garden, v.10, p. 1-37, 1960.
- MALME, G. O. A. Die Xyridaceen. der Ernten Regnell'schen expedition. Bihang till Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar, v. 22, p. 1-27, 1896.
- MALME, G. O. A. Xyridaceae Brasiliensis, praecipue Goyazensis a Glaziou Lectae. Bihang till Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar, v. 24, p. 1-20, 1898.
- MALME, G. O. A. Beiträge zur Xyridaceen - Flora Sudamerikas. Bihang till Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar, v. 26, p. 1-18, 1901.
- MALME, G. O. A. Xyridaceae. Recueil des Travaux Botaniques Néerlandais, v. 9, p. 129-135, 1912.
- MALME, G. O. A. *Xyris* L. Untergattung *Nematopus* (Seubert). Entwurf einer Gliederung. Arkiv för Botanik, v. 13, p. 1-103, 1913a.
- MALME, G. O. A. Die amerikanischen species der gattung *Xyris* L., untergattung *Euxyris* (Endlicher). Arkiv för Botanik, v. 13, p. 1-32, 1913b.
- MALME, G. O. A. Xyridaceae brasiliensis Hilarianae. Arkiv för Botanik, v. 22, p. 1-9, 1929.
- MICHELANGELI, F. A.; DAVIS, J. I.; STEVENSON, D. W. Phylogenetic relationships among Poaceae and related families as inferred from morphology, inversions in the plastid genome, and sequence data from the mitochondrial and plastid genomes. American Journal of Botany, v. 90, p. 93-106, 2003.
- MONTEIRO, R. F.; Carvalho, M. L. S. Mayacaceae. In: Lista da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2014.
- MOTA, N. F. O. Filogenia e diversidade de Xyridaceae Neotropicais, com ênfase no gênero Xyris. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- MOTA, N. F. O.; WANDERLEY, M. G. L. *Xyris riopretensis* (Xyridaceae): uma nova espécie para Minas Gerais, Brasil. Rodriguésia, v. 64, p. 555-560, 2013.

- MOTA, N. F. O.; WANDERLEY, M. G. L. Three new species of *Xyris* (Xyridaceae) from Diamantina Plateau in Brazil, Minas Gerais. Brittonia, v. 66, p. 42-50, 2014.
- NARDI, K. O.; SCATENA, V. L.; ORIANI, A. Development of ovule, fruit and seed of *Xyris* (Xyridaceae, Poales) and taxonomic considerations. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 177, p. 619-628, 2015.
- ORIANI, A.; SCATENA, V. L. Floral anatomy of xyrids (Poales): contributions to their reproductive biology, taxonomy and phylogeny. International Journal Plant Sciences, v. 173, p. 767-779, 2012.
- ORIANI, A.; SCATENA, V. L. Ovule, fruit and seed development in *Abolboda* (Xyridaceae, Poales): implications for taxonomy and phylogeny. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 175, p. 144-154, 2014.
- ORIANI, A., SCATENA, V. L. Anther wall development, microsporogenesis, and microgametogenesis in *Abolboda* and *Orectanthe*: contributions to the embryology of Xyridaceae (Poales). International Journal of Plant Science, v. 176, p. 324-332, 2015.
- ORIANI, A.; SCATENA, V.L. Ovule, fruit, and seed development of *Orectanthe sceptrum* and its systematic relevance to Xyridaceae (Poales). International Journal of Plant Science, v. 178, p. 104-116, 2017.
- RAMASWAMY, S. N.; AREKAL, G. D. Embryology of *Eriocaulon xeranthemum* Mart. (Eriocaulaceae). Acta Botanica Neerlandica, 31, p. 41-54, 1982.
- REMIZOWA, M. V.; KUZNETSOV, A. N.; KUZNETSOVA, S. P.; RUDALL, P. J.; NURALIEV, M. S.; SOKOLOFF, D. D. Flower development and vasculature in *Xyris grandis* (Xyridaceae, Poales); a case study for examining petal diversity in monocot flowers with a double perianth. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 170, p. 93-111, 2012.
- RUDALL, P. J.; SAJO, M. G. Systematic position of *Xyris*: flower and seed anatomy. International Journal of Plant Sciences, v. 160, p. 795-808, 1999.
- SAJO, M. G.; ORIANI, A.; SCATENA, V. L.; RUDALL, P. J. Floral ontogeny and vasculature in Xyridaceae, with particular references to staminodes and stylar appendages. Plant Systematics and Evolution, v. 303, p. 1293-1310, 2017.
- SAJO, M. G.; WANDERLEY, M. G. L.; MENEZES, N. L. Observações anatômicas sobre a vascularização floral em *Xyris* L. (Xyridaceae). Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, v. 16, p. 15-19, 1997.
- SCATENA, V. L.; BOUMAN, F. Embryology and seed development of *Paepalanthus* sect. *Actinocephalus* (Koern.) Ruhland (Eriocaulaceae). Plant Biology, v. 3, p. 341-350, 2001.
- SEUBERT, M. Xyrideae. In: Martius CFP, Eichler AG (Ed.). Flora brasiliensis. Frid. Fleischer: Leipzig, v. 3, p. 209-224, 1855.
- SILVA, G. O. S.; WANDERLEY, M. G. L. A família Xyridaceae no município de Mucugê, Bahia, Brasil. Hoehnea, v. 40, p. 51-76, 2013.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Xyridaceae. In: Hoehne FC (Ed. con't. Teixeira AR). Flora Brasília. Instituto de Botânica, São Paulo, v. 9, p. 1-125, 1968.
- STEVENS, P. F. Angiosperm phylogeny website. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 06 fev. 2018.
- STEVENSON, D. W. Mayacaceae. In: Kubritski K (Org.). The families and genera of vascular plants. Berlin: Springer-Verlag, p. 294-296, 1998.

- TILLICH, H. J. Seedling diversity and the homologies of seedling organs in the order Poales (Monocotyledons). Annals of Botany, v. 100, p. 1413-1429, 2007.
- VAN TIEGHEM, P. Eléments de botanique, Paris (*Ed.*). 3, 1898.
- VENTURELLI, M.; BOUMAN, F. Embryology and seed development in *Mayaca fluviatilis* (Mayacaceae). Acta Botanica Neerlandica, v. 35, p. 497-516, 1986.
- WANDERLEY, M. G. L. Estudos taxonômicos no gênero *Xyris* L. (Xyridaceae) da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1992.
- WANDERLEY, M. G. L. Xyridaceae. In: Wanderley MG, Shepherd GJ, Giulietti AM, Melhem TS (*Ed.*). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. FAPESP: RiMa, São Paulo, v 3, p. 333-348, 2003.
- Wanderley, M. G. L. Cinco novas espécies de *Xyris* (Xyridaceae) da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil, Rodriguésia, v. 61, p. 83-94, 2010.
- WANDERLEY, M. G. L. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Xyridaceae. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, v. 29, p. 69-134, 2011.
- WANDERLEY, M. G.; GIULIETTI, A. M. Mayacaceae. In: Wanderley MG, Shepherd GJ, Giulietti AM. (Org.). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo 2, São Paulo: Editora Hucitec, p. 185-186, 2002.
- WEINZIEHER, S. Beitrage sur Entwicklungsgeschichte von *Xyris indica*. Flora, v. 106, p. 393-432, 1914.
- WELLS, C.; PIGLIUCCI, M. Adaptive phenotypic plasticity: the case of heterophylly in aquatic plants. Perspect. Plant Ecology Evolution and Systematic, v 3, p. 1-18, 2000.

Capítulo 1

Embryogenesis in Xyridaceae and Mayacaceae and evolution of embryological characters in Poales

KAIRE DE OLIVEIRA NARDI* and ALINE ORIANI

*Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, C.
Postal 199, 13506900 Rio Claro, SP, Brazil*

*Corresponding author. E-mail: kairenardi@gmail.com

Running title: EMBRYOGENESIS IN XYRIDACEAE AND MAYACACEAE

Abstract

The embryo development of Xyridaceae (*Abolboda*, *Orectanthe* and *Xyris*) and Mayacaceae (*Mayaca*) species was studied in a comparative approach to improve the understanding of the evolution of embryological characters in the Poales. The embryo development is of the Asterad-type, *Muscari* variation in Xyridaceae, whereas in Mayacaceae is of the Onagrad-type, *Juncus* variation. The embryo in both families exhibits a vestigial suspensor formed by *o* and *p* cells, which originated from *n'* cell. An epistase occurs in Xyridaceae and Eriocaulaceae and corresponds to the nucellar cells that remain at the seed micropylar region. In Mayacaceae an aleurone layer is originated from the peripheral cells of endosperm. Embryo development of the Asterad-type, differentiated embryo and formation of suspensor are ancestral conditions in Poales. The epistase may be pointed out as a synapomorphy of the xyrid clade including only Xyridaceae and Eriocaulaceae. Although Mayacaceae shares with Xyridaceae undifferentiated embryo and the formation of a vestigial suspensor, the embryogenesis of Onagrad-type and the presence of an aleurone layer link Mayacaceae to the cyperid families.

ADDITIONAL KEYWORDS: aleurone layer, embryo development, epistase, suspensor.

INTRODUCTION

Xyridaceae includes ca. 430 species grouped into two subfamilies: Abolbodoideae and Xyridoideae (Campbell *et al.*, 2009). Abolbodoideae comprises *Orectanthe* Maguire (2 spp.), *Achlyphila* Maguire & Wurdack (1 sp.), *Aratitiopea* Steyererm. & P.E. Berry (1 sp.) and *Abolboda* Bonpl. (23 spp.), genera restricted to the South America (Kral, 1992; 1998; Campbell, 2005; Campbell *et al.*, 2009); and Xyridoideae comprises *Xyris* (c. 400 spp.), a genus with pantropical distribution (Kral, 1998; Campbell *et al.*, 2009). Mayacaceae includes only the genus *Mayaca* Aubl. with four species occurring in the Neotropical areas, mainly in South America, and only one species restricted to the Africa (Stevenson, 1998; Pellegrini *et al.*, 2016).

Xyridaceae and Eriocaulaceae are usually identified as sister groups and appear together with Mayacaceae forming the weakly supported xyrid clade in several phylogenetic analyses (Linder & Rudall, 2005; Givnish *et al.*, 2010); however, the exact relationships between Mayacaceae and the related families within Poales is unclear (Linder & Rudall, 2005; Givnish *et al.*, 2010). In a phylogenetic analysis of Poales based on morphological, *atpA*, and *rbcL* sequence data, Mayacaceae, Eriocaulaceae and *Xyris* form a sister group to *Orectanthe* and *Abolboda* (Michelangeli *et al.*, 2003). In the phylogenetic analysis of monocots based on *atpA* and *rbcL* sequence data, Mayacaceae appears as a sister group to *Xyris*, whereas *Abolboda*, *Aratitiopea*, and *Orectanthe* form a sister clade to Eriocaulaceae (Davis *et al.*, 2004). In the most recent phylogenetic analysis of Poales based on *rbcL* and *ndhF* sequences, Mayacaceae and Rapateaceae form a sister group to Cyperaceae, Juncaceae, and Thurniaceae within the cyperid clade, although with low phylogenetic support (Bouchenak-Khelladi *et al.*, 2014).

In addition to studies based on morphological and molecular data, features of embryo development with taxonomic relevance such as the embryogenesis type can help to clarify the

interfamilial relationships of the order. The classification of embryogenesis based mainly on the division of zygote proposed by Johansen (1950) has been the most accepted in the literature. If the zygote undergoes a vertical division, the embryogenesis is of the Piperad-type; and if it undergoes a transversal division, the embryogenesis is of the Piperad, Onagrad, Asterad, Solanad, Chenopodiad or Caryophyllad type. The separation of one type from another is based primarily on the behavior of apical cell of the two-celled proembryo, and less directly upon the behavior of the basal cell, but decidedly upon the fact whether the basal cell contributes something or nothing to the construction of the embryo proper. In relation to classification of the variations, it is based upon modifications of the fundamental types (Johansen, 1950).

Although previous works classified the embryogenesis in Xyridaceae of the Asterad-type (Govindappa, 1955) and in Mayacaceae of the Onagrad-type (Venturelli & Bouman, 1986), they have not described all stages of embryo development. Within Xyridaceae, only some stages of embryogenesis and mature embryo have been reported in ten species of *Xyris* (Weinzieher, 1914; Rudall & Sajo, 1999; Nardi *et al.*, 2015), four species of *Abolboda* (Carlquist, 1960; Oriani & Scatena, 2014) and one species of *Orectanthe* (Carlquist, 1960; Oriani & Scatena, 2017) and in all of these works the authors interpreted the mature embryo as undifferentiated. The suspensor was founded only in latter two genera (Carlquist, 1960) and in *Mayaca fluviatilis* (Venturelli & Bouman, 1986); however, the authors did not report whether this structure degenerates or not at later stages of development. This information is relevant since if the suspensor is persistent it may have a function during the embryo development. It is essential to identify whether the suspensor is formed or not to classify the variation of the embryogenesis type.

Considering that the type and variation of embryogenesis as well as the identification of embryological characters are useful for taxonomy and phylogeny, the aim of the present study

was to comparatively analyze the embryo development in species of *Xyris*, *Abolboda*, *Orectanthe* (Xyridaceae) and *Mayaca* (Mayacaceae). The results herein obtained in addition to those available in the literature for other families of Poales were analyzed in a phylogenetic context to understand the evolution of some embryological characters within the order.

MATERIAL AND METHODS

The embryo development were analyzed in the following species: Xyridaceae C. Agardh.: *Xyris* sect. *Xyris*: *Xyris fallax* Malme (Nardi *et al.* 34); *Xyris* sect. *Nematopus*: *X. nubigena* Kunth (Nardi & Dugarte 08; Scatena *et al.* 448, 451), *X. obtusiuscula* L.A. Nilsson (Scatena *et al.* 454), *X. pilosa* Kunth (Scatena *et al.* 455; Nardi & Dugarte 04), *X. pterygoblephara* Steud. (Nardi & Dugarte 11, 12, 16; Scatena *et al.* 453), *X. subsetigera* Malme (Nardi & Dugarte 14, 17; Scatena *et al.* 447), *Abolboda poarchon* Seub. (Coan & Oriani 61, 72), *A. pulchella* Humb. (Coan & Oriani 60, 71), and *Orectanthe sceptrum* (F. Oliver) Maguire (Lombardi *et al.* 7658; Scatena *et al.* 472); Mayacaceae Kunth.: *Mayaca sellowiana* Kunth (Scatena *et al.* 307; Coan & Oriani 53). These species were chosen because they occur in Brazil and they represent different genera of Xyridaceae and also different sections within *Xyris*. We also analyzed seeds of one species of Eriocaulaceae Martinov.: *Comanthera suberosa* (Giul.) L.R. Parra & Giul. (Dugarte *et al.* 172, 174) for comparison.

Samples of *Comanthera suberosa* and most species of *Xyris* were collected in rocky fields (campos rupestres) in the Parque Nacional da Serra do Cipó, in Santana do Riacho municipality, Minas Gerais State; *X. fallax*, *Abolboda poarchon*, *A. pulchella* and *Mayaca sellowiana* were collected at a swamp grassland in a characteristic ‘cerrado’ (Brazilian savanna) area, on private property between the cities of Itirapina and Brotas, São Paulo State, and samples of *Orectanthe sceptrum* (Oliv.) Maguire were collected in the tepuis of the

Parque Nacional do Monte Roraima, Roraima State. Herbarium specimen vouchers were identified and deposited in the Herbarium Rioclarense (HRCB) of the Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Flowers and fruits at different developmental stages were fixed in FAA 50 (37% formalin, acetic acid, ethanol 50%, 1:1:18 v/v; Johansen, 1940) and stored in 70% ethanol for the embryological study. For the light microscopy analysis, the fixed material was dehydrated in an n-butyl alcohol series (40%, 55%, 70%, 85%, 100%), embedded in (2-hydroxyethyl)-methacrylate (Leica Histo-resin Embedding Kit; Gerrits & Smid, 1983), and sectioned at 6-8 μm thickness using a rotary microtome (Leica, RM 2245). Anatomical sections were stained with periodic acid–Schiff's reagent and toluidine blue (O'Brien *et al.*, 1964; Feder & O'Brien, 1968) and mounted on permanent slides using Entellan (Merck). The results were documented by photomicrographs obtained with a Leica DM 4000B microscope fitted with a Leica DFC 450 capturing device and a digital imaging software (Leica Application Suite, version 4.0.0).

To analyze the evolution of some embryological traits, embryo and seed characters were optimized in the maximum clade credibility tree from Bayesian Markov chain Monte Carlo obtained by Bouchenak-Khelladi *et al.* (2014), which is most recent well-resolved phylogenetic analysis of Poales. The characters selected and their states were as follows: embryogenesis (Asterad-type: 0; Onagrad-type: 1); embryo (differentiated: 0; undifferentiated: 1) suspensor formation (present: 0; absent: 1); suspensor in the mature seed (persistent: 0; ephemeral: 1; absent: 2); epistase (present: 0; absent: 1); nucellus (elongated epidermis: 0; multiseriate cap: 1; undifferentiated: 2); and aleurone layer origin (endosperm: 0; nucellus: 1; absent: 2). Character optimization was performed using parsimony methods in Mesquite, version 3.40 (Maddison & Maddison, 2018). To code the character states for the other families of Poales, and Arecaceae used as outgroup, the following references were

consulted: Typhaceae: Netolitzki (1926), Davis (1966), and Kubitzki (1998); Bromeliaceae: Billings (1904), Netolitzki (1926), Johri *et al.* (1992), Magalhães & Mariath (2012), and Prado *et al.* (2014); Eriocaulaceae: Smith (1910), Begum (1968), Ramaswamy & Arekal (1982), and Dugarte *et al.* (2015); Anarthriaceae: Linder & Rudall (1993); Restionaceae: Kircher (1986), Rudall & Linder (1988), and Rudall (1997); Centrolepidaceae: Prakash (1969), Hamann (1975), and Linder & Rudall (1993); Flagellariaceae: Rudall & Linder (1988) and Rudall (1997); Joinvilleaceae: Campbell & Kellog (1987), Watson & Dallwitz (1992), and Rudall (1997); Ecdeiocoleaceae: Watson & Dallwitz (1992) and Rudall (1997); Poaceae: Souèges (1924), Chopa *et al.* (1982), Chandra (1963), Venkateswarlu & Devi (1964), Bhanwra & Chopa (1986), and Anton & Cocucci (1987); Rapateaceae: Tiemann (1985) and Venturelli & Bouman (1988); Thurniaceae: Davis (1966) and Thimm (1985); Juncaceae: Souèges (1923), Netolitzki (1926), and Shah (1963); Cyperaceae: Hofmeister (1861), Nijalingappa (1986), and Makde & Bhuskute (1987); Arecaceae: Taylor (1920), DeMason *et al.* (1989), and Genovese-Marcomini *et al.* (2013).

RESULTS

EMBRYO DEVELOPMENT IN XYRIDACEAE

In the porogamous phase of the fertilization the pollen tube penetrates the embryo sac through the micropyle (Fig. 1A) and the male gametes are discharged into the synergid. One of the spermatic nuclei fuses with the central cell originating the primary endosperm, and the other fuses with the egg cell forming the zygote (Fig. 1B). A nucellar layer is persistent at the micropylar region adjacent to the embryo (Fig. 1B-F, 2A-F).

In all genera studied the embryogenesis is of the Asterad-type *Muscari*-variation. The division of the zygote is transversal and gives rise to a two-celled proembryo formed by the

apical cell (*ca*) and the basal cell (*cb*) (Fig. 1C). The apical cell divides vertically to form two juxtaposed cells (*q*) (Fig. 1D, F), which later form the quadrants. The basal cell undergoes an oblique division resulting in two cells, *m* (colored pink) and *ci* (colored green) (Fig. 1E). The apical cell usually divides before the basal cell (Fig. 1D). Simultaneous divisions of apical and basal cells were not observed.

Both *q* cells undergo an oblique division forming two other cells to the embryo periphery (quadrants), whose tangential external walls are curved outwardly. The cells of quadrants divide into eight cells forming the octants (Fig. 2A). The colors orange and yellow were used to distinguish the daughter cells of each *q* cell (Fig. 2A-F). The outermost cells of octants undergo transversal divisions giving rise to the epidermal initials (Fig. 2A-F). After the separation of epidermal initials, the embryo enters into the globular stage of development. The innermost cells undergo transversal divisions contributing to the increase in length of the embryo, and later undergo vertical divisions contributing to the increase in width of the embryo (Fig. 2C-F). Divisions are not simultaneous in the two halves of the embryo in all studied species; the cells of apical region undergo irregular and more rapid divisions than the cells of basal region.

During the formation of globular embryo, the *ci* cell occupies the most basal portion of embryo in relation to the *m* cell that occupies a more apical position (Fig. 2B). Cells derived from *ci* cell are colored green, whereas the cells derived from *m* cell are colored pink (Fig. 2A-F). The *ci* cell undergoes a division forming the *n* and *n'* cells in the apical and basal positions, respectively (Fig. 2D-F). The *m* cell divides obliquely giving rise to two cells (Fig. 2C, E), which also divide (Fig. 2D, F) forming part of the basal and central portions of embryo together with some cells originated from divisions of *n* cell; the *n'* cell forms the most basal portion of embryo.

After the globular stage, the epidermal initials cells originated from divisions of the outermost cells of quadrants undergo anticlinal divisions forming the cotyledonary cells (Figs. 3A-F; 4A-B, D-F). In this stage, by a transverse division, *n'* cell produces *o* (asterisk) and *p* (arrowhead) cells (Figs. 3A-B, 4E), characterizing the suspensor. The *p* cell undergoes a transverse division (Fig. 3B-C, arrowhead), whereas *o* cell undergoes an oblique division (Fig. 3C, asterisks). The two upper daughter cells originated from *o* and *p* cells participate to the formation of embryo proper, and the two lower daughter cells disintegrate forming a space between the embryo and the nucellar layer (Fig. 3E-F, 4A, D, F). In the mature seed, a layer of nucellar cells persists between the embryo and the inner integument (endotegmen) corresponding to the epistase (colored red) (Figs. 3 A-F, 4A-F).

The epistase is present in all genera of Xyridaceae studied (Fig. 4A, D, F) as well as in *Comanthera suberosa* (Eriocaulaceae) (Fig. 6D). In both families the mature embryo is campanulate, undifferentiated, without suspensor, with a narrower pole turned towards the micropyle (Fig. 4A, D, F; 6D), its cells contain starch grains, and its size is reduced in relation to the seed size (Figs. 6A-B). The cotyledonary cells are larger than the remaining embryo cells (Fig. 4A, D, F; 6D). The remaining of the seed content is filled with endosperm cells that accumulate starch grains (Figs. 6A-B).

Xyridaceae species studied here present variations in the quantity and orientations of the cell divisions at later stages of embryo development resulting in different numbers of cells and subtle variations in the shape of the mature embryo (Fig. 4A, D, F). Embryos of *Xyris* and *Abolboda* species possess about 10 cell layers (Fig. 4A, F), whereas those of *Orectanthe* are relatively larger with about 15-20 cell layers (Fig. 4D) in longitudinal median section.

EMBRYO DEVELOPMENT IN MAYACACEAE

In the species studied the embryogenesis is of the Onagrad-type *Juncus*-variation. The zygote is initially globose (Fig. 5A) and undergoes the mitotic division transversally, originating the apical (*ca*) and basal cell (*cb*) (Fig. 5B). The basal cell also divides transversally and gives rise to two cells, the intermediate one (*m*) (colored pink) and the basally situated one (*ci*) (colored green) (Fig. 5C). The apical cell (colored white) (Fig. 5C) divides vertically resulting in a T-shaped embryo (Fig. 5D). This division is followed by a transverse division of the *ca* daughter cells to form the quadrants (Fig. 5E). The cells of quadrants divide vertically forming the octants (Fig. 5F).

The *m* cell undergoes a vertical division (Fig. 5E-F), and the *ci* cell undergoes a transversal division to form the *n* and *n'* cells (Fig. 5E-F). The *n* cell situated in the apical portion divides transversally (Fig. 5G), its daughter cells undergo vertical divisions (Fig. 5H), and subsequently numerous divisions in different plans. The *n'* cell situated in the basal portion (Fig. 5E-F) may divide into *o* (asterisk) and *p* (arrowhead) cells (Fig. 5H) or not (Fig. 5I) forming the suspensor, which degenerates at later stages of embryo development (Figs. 5J-K).

By a vertical division the two daughter cells of *m* (Fig. 5E-F) originate a layer of cells that undergo vertical (Fig. 5G-H) and transversal divisions (Fig. 5H). At the same time, the outermost cells originated from the quadrants undergo divisions (Fig. 5F-G) resulting in the epidermal initials (Fig. 5H) that differentiate into cotyledonary cells at later stages of embryo development (Fig. 5I-K). It is noted that there are more cell divisions in the upper portion than in the lower portion of the embryo (Fig. 5I-K). During embryo development, cell divisions occur in several plans while the embryo still exhibits the suspensor represented by the *n'* (Fig. 5E-G, I) or *o* (asterisk) and *p* (arrowhead) cells (Fig. 5H). The suspensor degenerates in the mature seed (Fig. 5J-K).

The mature embryo is campanulate, undifferentiated, without suspensor, with a narrower pole turned towards the micropyle; its cells contain starch grains and the cotyledonary cells are larger than remaining ones (Fig. 5J-K). The embryo is reduced in relation to the seed size, and the seed content is filled with a starchy endosperm (Fig. 6C). The nucellus degenerates, except the outermost layer, which persists in the mature seed and corresponds to the aleurone layer (colored blue) (Fig. 6E).

CHARACTER EVOLUTION

Some embryological characters of Xyridaceae, Mayacaceae and other related families are compared in Table 1. The ancestral character-state reconstructions show that the embryogenesis of the Asterad-type, differentiated embryo and formation of suspensor are the most likely states at the base of Poales (Fig. 7A-C).

Embryogenesis of the Onagrad-type evolved at least twice in the order, one in the most recent ancestor of restiid clade and the other in the most recent ancestor of cyperid clade, with secondary loss in Rapateaceae (Fig. 7A). The undifferentiated embryo appeared in the most recent ancestor of the clade formed by Xyridaceae and Eriocaulaceae, of the clade formed by Mayacaceae and Rapateaceae, which is sister-group to the remaining cyperids, and in Centrolepidaceae, which is included in the restiid clade (Fig. 7B).

The suspensor is a common character state within Poales, which was lost in some families, such as Eriocaulaceae and Rapateaceae (Fig. 7C). The degeneration of suspensor is also a common character state within Poales, however it is persistent in Bromeliaceae, Centrolepidaceae and Poaceae (Fig. 7D).

The epistase may be pointed out as a synapomorphy of the xyrid clade (Fig. 7E). The elongated nucellar epidermis most likely appeared in the most recent ancestor of the clade formed by restiids and graminids, since it occurs in Restionaceae, Centrolepidaceae and

Flagellariaceae (Fig. 7F). The multiseriate nucellar cap appeared in the most recent ancestor of the graminid clade, occurring in Flagellariaceae, Joinvilleaceae and Poaceae (Fig. 7F). The aleurone layer originated from the endosperm evolved at least three times in the order, in Bromeliaceae, in Poaceae, and in the most recent ancestor of the cyperid clade; whereas the aleurone layer originated from the nucellus evolved at least twice, one in the most recent ancestor of the bromeliad clade and in Centrolepidaceae (Fig. 7G).

DISCUSSION

The families studied here do not share the same type of embryogenesis: in Xyridaceae it is of the Asterad-type *Muscari*-variation due to the formation of a suspensor; whereas in Mayacaceae it is of the Onagrad-type *Juncus*-variation because the four cells of each quadrant divide transversally demarcating precociously the epidermal initials. The embryogenesis variation of *Muscari*, as well as ephemeral suspensor formed by *o* and *p* cells originated from *n'* cell, and epistase are reported here for the first time for *Xyris*, *Abolboda* and *Orectanthe* (Xyridaceae). All species studied belonging to these genera show variations in the quantity and orientations of cell divisions at later stages of embryo development resulting in different numbers of cells and subtle variations in the shape of the mature embryo.

At the early stages of embryogenesis, the embryo at tetrad-stage is classified into Series A, B or C according to the division of the apical (*ca*) and basal (*cb*) cells (Souèges, 1941). In all species of Xyridaceae studied here the embryo at tetrad-stage belongs to Serie A variation 1 because *ca* divides vertically resulting in two juxtaposed cells, whereas *cb* undergoes an oblique division producing *m* and *ci* cells, as also observed in other species of *Xyris*, Eriocaulaceae and Rapateaceae (Weinzieher, 1914; Govindappa, 1955; Tiemann, 1985; Ramaswamy & Arekal, 1982). On the other hand, in *Mayaca sellowiana* the embryo at tetrad-

stage belongs to Serie A variation 2 because *ca* undergoes a vertical division originating a T-shaped embryo, as also observed in *Mayaca fluviatilis* (Venturelli & Bouman, 1986) and in several families of Poales, such as Bromeliaceae, Centrolepidaceae, Thurniaceae, Juncaceae, and Cyperaceae (Bilings, 1904; Prakash, 1969; Thimm, 1985; Souèges, 1923; Nijalingappa, 1986). Among the Poales studied up to the present moment, only the embryo at tetrad stage of Poaceae is classified as Serie B variation 2 because *ca* undergoes an oblique division; whereas *cb* undergoes a transverse division originating an embryo very differentiated and with peculiar structures, such as coleoptile, epiblast and hypoblast (Souèges, 1924).

The embryogenesis of Asterad-type is the ancestral condition in Poales, whereas the Onagrad-type evolved at least twice in the order, one in the most recent ancestor of restiid clade and the other in the most recent ancestor of cyperid clade, with secondary loss in Rapateaceae. It should be emphasized that the sequence of divisions of *cb* may differ in species of Asterad-type, allowing the identification of the variation (Johansen, 1950). The *Penaea*-variation was reported for *Xyris indica* mainly due to the absence of suspensor (Weinzieher 1914; Govindappa 1955). For *Abolboda* and *Orectanthe*, Carlquist (1960) reported the presence of a suspensor but did not describe its origin and whether this structure degenerates or persists in the mature embryo. Our results show that the embryo in both Xyridaceae and Mayacaceae exhibits a suspensor formed by *o* and *p* cells, and sometimes only by the *n'* cell in Mayacaceae. These findings are consistent with those of Venturelli and Bouman (1986), who provided an ontogenetic study of the seed of *Mayaca fluviatilis*. However, as observed in this study for Mayacaceae, the suspensor degenerated at later stages of embryo development. In Xyridaceae, *o* and *p* cells undergoes an oblique and vertical division, respectively, and the two upper daughter cells participate to the formation of the embryo, whereas the two lower cells disintegrate.

The formation of suspensor is the ancestral and a common condition within Poales; it does not occur only in Eriocaulaceae (Ramaswamy & Arekal, 1982) and Rapateaceae (Tiemann, 1985; Venturelli & Bouman, 1988). The role of the suspensor is hold the embryo in a fixed position within the seed, push the embryo into the nutrient-rich endosperm, or transmit the nutrients from the maternal tissue to the embryo (Maheshwari, 1950; Yeung & Meinke, 1993). Although the suspensor is persistent and probably functional in the mature embryo of Bromeliaceae (Billings, 1904), Centrolepidaceae (Prakash, 1969) and Poaceae (Souèges, 1924), it degenerates in other families of Poales as in most monocotyledons, and may therefore represent a vestigial structure.

Some cells that surround the mature embryo are anatomically similar to the embryonic cells in all genera of Xyridaceae, which makes difficult to identify their origin. These cells have been described as flap-like extensions at the edges of the cotyledon in *Abolboda grandis* (Tiemman, 1985), *A. americana* and *Orectanthe sceptrum* (Carlquist, 1930). However, our results show that these cells have no embryonic origin, but they originate from nucellar cells that persist in the mature seed of *Xyris*, *Abolboda* and *Orectanthe* (Xyridaceae), as well as in *Comanthera suberosa* (Eriocaulaceae), forming a layer at the seed micropylar region, here termed epistase. Such structure can also be observed in anatomical sections of the seeds of other species of Eriocaulaceae (Coan *et al.*, 2007, 2010; Dugarte *et al.*, 2015), thus, it may be pointed out as a synapomorphy of the clade including Xyridaceae and Eriocaulaceae.

It is noteworthy that the epistase is a well-marked tissue at the micropylar region of seed usually derived from the nucellar epidermis or sometimes from the inner integument, and in rare cases it is a composite structure of both (Werker, 1997). It forms a caplike structure of often thick-walled, and sometimes cutinized or sclerified cells covering the apex of the embryo sac and blocking the micropyle (Johri *et al.*, 1992). The functions suggested to the epistase are similar to those of the hypostase, such as stabilization of water balance

through the resting period of the mature seed and checking of growth of the embryo at the micropylar end (Johansen, 1928; Kapil & Vasil, 1963; Werker, 1997). The epistase is known in a few angiosperms such as in some species of Myrtales, Fouquieriaceae (Ericales), Zingiberaceae (Zingiberales), Nymphaeaceae (Nymphaeales), and in Liliaceae (Asparagales) (Cook, 1906; Boehm, 1931; Khan, 1943; Mahabale & Deshpande, 1959; Bouman, 1984). In the last family, in species of the genus *Ornithogalum*, after fertilization the cells of epistase secrete an exudate that obstructs the micropyle probably preventing the invasion of pathogens and desiccation of the embryo and endosperm (Tilton, 1980). In *Xyris*, *Orectanthe*, *Abolboda* (Xyridaceae), and in *Comanthera suberosa* (Eriocaulaceae), we suggest that the epistase has arisen to provide protection against desiccation to the reduced embryo as well as the invasion of pathogens because these species grow in poor and seasonally dry soils. In addition, the epistase may have a function similar to that of the coleorhiza present in Poaceae (Sargent & Osborne, 1980), plays an important role in seed germination, protecting the embryonic axis when it protrudes the seed coat.

Certain characteristics of the ovule in *some poalean families* should be discussed, because they are important in an evolutionary context. These characteristics include the elongated nucellar epidermis and the multiseriate nucellar cap. In Restionaceae and Centrolepidaceae, a markedly elongated nucellar epidermis near the micropyle is a synapomorphy linking both families (Linder & Rudall, 1993). This feature had at least two independently origins in the order, one in the most recent ancestor of the restiid clade, and other in Flagellariaceae, since it was reported in some species (Hamann, 1975; Rudall & Linder, 1988). An elongated nucellar epidermis also occurs in other commelinids such as *Eichhornia* (Pontederiaceae) (Rudall, 1999), and may represent an apomorphy in *Hanguana* (Hanguanaceae) (Rudall *et al.*, 1999).

A multiseriate nucellar cap occurs in some Flagellariaceae, Joinvilleaceae and Poaceae

(Linder & Rudall, 1993), and had probably evolved in the most recent ancestor of the graminid clade. In Poaceae, previous studies have reported that this structure is absorbed by the developing embryo and the endosperm (Chopa *et al.*, 1982; Bhanwra & Choda, 1986). However, for Restionaceae, Centrolepidaceae, Flagellariaceae, and Joinvilleaceae the authors did not perform an ontogenetic study indicating if the elongated nucellar epidermis or the multiseriate nucellar cap are persistent in the seed forming the epistase, or if they degenerate. Further studies on embryogenesis and post-seminal development in the different families of Poales are necessary to evaluate if the epistase is a common character in the order. In addition, ultrastructural analyses will contribute to identify the role of this structure.

According to our results for Mayacaceae, the outermost cells of endosperm form an aleurone layer. In other angiosperms, the aleurone layer may be originated from the nucellus, endosperm, or inner integument (Werker, 1997). During seed germination, the aleurone performs an important digestive function, secreting enzymes to break down the starch and proteins stored in the central endosperm, which undergo programmed cell death during seedling development (Young & Gallie, 2000; Becraft, 2007). Within Poales, the aleurone layer originated from the endosperm evolved at least three times in the order, whereas the aleurone layer originated from the nucellus evolved at least twice in the order. In addition, in other monocotyledons the aleurone layer derived from endosperm is also found in Araceae, Cannaceae, Musaceae, and Pontederiaceae (Neolitzky, 1926), whereas the aleurone layer originated from the nucellus and inner integument is found in some eudicotyledons such as Piperaceae and Brassicaceae, respectively (Neolitzky, 1926; Bergfeld & Schopper, 1986).

By comparing the studied species of Mayacaceae with those of Poales, and considering its unstable phylogenetic position, we highlight that although Mayacaceae shares with Xyridaceae an undifferentiated embryo, and formation of an ephemeral suspensor, the embryogenesis of the Onagrad-type, and the formation of an aleurone layer may indicate that

this family is better positioned in the cyperid clade, in accordance with the most recent phylogeny of Poales (Bouchenak-Khelladi *et al.*, 2014). On the other hand, although Rapateaceae is included in the cyperid clade in such phylogeny (Bouchenak-Khelladi *et al.*, 2014), its embryogenesis of the Asterad-type links this family to Bromeliaceae and Typhaceae in a basal position of Poales phylogeny, as have been recovered in most previous phylogenetic analyses of the order (Chase *et al.*, 2000, 2006; Givnish *et al.*, 2005, 2006, 2010).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (process n°. 160640/2014-8 to K.O.N and 301692/2010-6 to A.O), FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (process n°. 2011/115536-3), and CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for financial support. We also thank Dr Nara Furtado de Oliveira Mota for identifying the species and Dr Blanca Dugarte for providing us with the seeds of *Comanthera suberosa*.

REFERENCES

- Anton AM, Cocucci AE. 1984.** The grass megagametophyte and its possible phylogenetic implications. *Plant Systematics and Evolution* **146**: 117-121.
- Becraft PW. 2007.** Aleurone cell development. In: Olsen AO, eds. *Endosperm: development and molecular biology*. Berlin: Springer, 45-56.
- Begum M. 1968.** Embryological studies in *Eriocaulon quinquangulare* Linn. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences, Section B* **67(4)**: 148-156.
- Bergfeld R, Schopper P. 1986.** Differentiation of a functional aleurone layer within the seed coat of *Sinapis alba* L. *Annals of Botany* **57**: 25-33.

- Bhanwra RK, Chopra SP. 1986.** Comparative embryology of *Echinochloa colonum* and *Echinochloa crusgalli* (Poaceae). *Proceedings of the Indian Academy of Sciences* **96**: 71-78.
- Billings FH. 1904.** A study of *Tillandsia usneoides*. *Botanical Gazette* **38**: 99-121.
- Boehm K. 1931.** Embryologische Untersuchungen an Zingiberaceen. *Planta* **14**: 411-440.
- Bouchenak-Khelladi Y, Muaya AM, Linder HP. 2014.** A revised evolutionary history of Poales: origins and diversification. *Botanical Journal of the Linnean Society* **175**: 4-16.
- Bouman F. 1984.** The ovule. In: Johri BM, eds. *Embryology of angiosperms*. Berlin: Springer, 123-157.
- Campbell LM. 2005.** Contributions towards a monograph of Xyridaceae: a revised nomenclature of *Abolboda*. *Harvard Papers in Botany* **10(2)**: 137-145.
- Campbell CS, Kellogg EA. 1987.** Sister-group relationships of the Poaceae. In: Soderstrom TR, Hilu KW, Campbell CS, Barkworth ME, eds. *Grass systematics and evolution*. Washington: Smithsonian Institution Press, 217-224.
- Campbell LM, Wanderley MGL, Silva GO. 2009 onwards.** Neotropical Xyridaceae. In: Milliken W, Klitgard B, Baracat A, eds. *Neotropikey - Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics*. Available at: <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Xyridaceae.htm> [accessed March 2018].
- Carlquist S. 1960.** Anatomy of Guayana Xyridaceae: *Abolboda*, *Orectanthe* and *Achlyphila*. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **10(2)**: 65-117.
- Chandra N. 1963.** Morphological studies in the gramineae. IV. Embryology *Eleusine indica* Gaertn. and *Dactyloctenium aegyptium* (Desf) Beauv. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences, Section B* **58**: 117-127.
- Chase MW, Fay MF, Devey DS, Maurin O, Ronsted N, Davies TJ, Pillon Y, Petersen G, Seberg O, Tamura MN, Asmussen CB, Hilu K, Borsch T, Davis JI, Stevenson DW, Pires JC, Givnish TJ, Sytsma KJ, McPherson MA, Graham SW, Rai HS. 2006.** Multigene analyses of monocot relationships: a summary. *Aliso* **23**: 62-74.
- Chase MW, Soltis DE, Soltis PS, Rudall PJ, Fay MF, Hahn WH, Sullivan S, Joseph J, Molvray M, Kores PJ, Givnish TJ, Sytsma KJ, Pires JC. 2000.** Higher-level systematics of the monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification. In: Wilson KL, Morrison DA, eds. *Monocots: systematics and evolution*. Melbourne: CSIRO, 3-16.

- Choda SP, Mitter H, Bhanwra RK. 1982.** Embryological studies in three species of *Cymbopogon* Spreng. (Poaceae). *Proceedings of the Indian Academy of Sciences* **91**: 55-60.
- Coan AI, Rosa MM, Scatena VL. 2007.** Embryology and seed development of *Syngonanthus caulescens* (Poir.) Ruhland (Eriocaulaceae – Poales). *Aquatic Botany* **86**: 148-156.
- Coan AI, Stutzel T, Scatena VL. 2010.** Comparative embryology and taxonomic considerations in Eriocaulaceae (Poales). *Feddes Repertorium* **121**: 268-284.
- Cook MT. 1906.** The embryogeny of some Cuban Nymphaeaceae. *Botanical Gazette* **42(5)**: 376-392.
- Davis GL. 1966.** *Systematic embryology of the angiosperms*. New York: John Wiley & Sons.
- Davis JI, Stevenson DW, Petersen G, Seberg O, Campbell LM, Freudenstein JV, Goldman DH, Hardy CR, Michelangeli FA, Simmons MP, Specht CD, Vergara-Silva F, Gandolfo M. 2004.** A phylogeny of the monocots, as inferred from *rbcL* and *atpA* sequence variation, and a comparison of methods for calculating jackknife and bootstrap values. *Systematic Botany* **29**: 467-510.
- DeMason DA, Stillman JI, Ellmore GS. 1989.** Acid phosphatase localization in seedling tissue of the palms, *Phoenix dactylifera* and *Washingtonia filifera*, and its relevance to controls of germination. *Canadian Journal of Botany* **67**: 1103-1110.
- Dugarte BAC, Escobar DFE, Scatena VL. 2015.** Morfología de semillas y desarrollo post-seminal de especies de *Comanthera* (Eriocaulaceae). *Revista de Biología Tropical* **63**: 1127-1135.
- Feder N, O'Brien TP. 1968.** Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* **55**: 123-142.
- Genovese-Marcomini PR, Mendonça, MS, Carmello-Guerreiro, SM. 2013.** Morphoanatomy of the flower of *Syagrus inajai* (SPRUCE) Becc. (Arecaceae - Arecoideae - Attaleinae), Amazon. *Brazilian Journal of Biology* **73(3)**: 649-661.
- Gerrits PO, Smid L. 1983.** A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy* **32**: 81-85.
- Givnish TJ, Ames M, McNeal JR, McKain MR, Steele PR, dePamphilis CW, Graham SW, Pires JC, Stevenson DW, Zomlefer WB, Briggs BG, Duvall MR, Moore MJ, Heaney JM, Soltis DE, Soltis PS, Thiele K, Leebens-Mack JH. 2010.** Assembling the

- tree of the monocotyledons: plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **97**: 584-616.
- 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 B* **272**: 1481-1490.
- 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. 2006.** Phylogenetic relationships of monocots based on the highly informative plastid gene *ndhF*: evidence for widespread concerted convergence. *Aliso* **22**: 28-51.
- Govindappa DA. 1955.** Embryological studies in *Xyris pauciflora* Wild. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences, Section B* **42**: 47-57.
- Hamann U. 1975.** Neue Untersuchungen zur Embryologie und Systematik der Centrolepidaceae. *Botanische Jahrbücher* **96**: 154-191.
- Hofmeister W. 1861.** Neue Beiträge zur Kenntnis der Embryobildung der Phanerogamen. II. Monokotyledonen. *Abhandlungen der Königlich Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften* **7**: 629-760.
- Johansen DA. 1928.** The hypostase: its presence and function in the ovule of Onagraceae. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* **14**: 710-713.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill.
- Johansen DA. 1950.** *Plant embryology: embryogeny of the spermatophyte*. Waltham: Mass. Chronica Botanica.
- Johri BM, Ambegaokar KB, Srivastava PS. 1992.** *Comparative embryology of angiosperms, vol. 2*. Berlin: Springer.
- Kapil RN, Vasil IK. 1963.** Ovule. In: Maheshwari P, ed. *Recent advances in the embryology of angiosperms*. Delhi: International Society of Plant Morphology, University of Delhi, 41-67.
- Khan R. 1943.** The ovule and embryo sac of *Fouquieria*. *Proceedings of the National Institute of Sciences of India* **9**: 253-256.
- Kircher P. 1986.** Untersuchungen zur Blüte- und Infloreszenzmorphologie, Embryologie und Systematik der Restionaceen im Vergleich mit Gramineen und verwandten Familien. *Dissertationes Botanicae, Ruhr-Universität Bochum* **94**: 1-219.

- Kral R. 1992.** A treatment of American Xyridaceae exclusive of *Xyris*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **79**: 819-885.
- Kral R. 1998.** Xyridaceae. In: Kubitzki K, ed. *The families and genera of vascular plants. IV. Flowering plants. Monocotyledons: Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae)*. Berlin: Springer, 461-469.
- Kubitzki K. 1998.** Typhaceae. In: Kubitzki K, ed. *The families and genera of vascular plants. IV. Flowering plants. Monocotyledons: Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae)*. Berlin: Springer, 457-461.
- Linder HP, Rudall PJ. 1993.** The megagametophyte in *Anarthria* (Anarthriaceae, Poales) and its implications for the phylogeny of the Poales. *American Journal of Botany* **80(12)**: 1455-1464.
- Maddison WP, Maddison DR. 2018.** Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.4005. Available at <http://mesquiteproject.org/> [accessed May 2018].
- Magalhães RI, Mariath JEA. 2012.** Seed morphoanatomy and its systematic relevance to Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution* **298**: 1881-1895.
- Mahabale TS, Deshpande JV. 1959.** The genus *Sonneratia* and its fossil allies. *Paleobotanist* **6**: 51-64.
- Maheshwari P. 1950.** *An introduction to the embryology of angiosperms*. Mc Graw-Hill Book: New York.
- Makde KH, Bhuskute SM. 1986.** Embryology of *Kyllinga monocephala* (Cyperaceae) and its systematic position. *Plant Systematics and Evolution* **156**: 143-150.
- Nardi KO, Scatena VL, Oriani A. 2015.** Development of ovule, fruit and seed of *Xyris* (Xyridaceae, Poales) and taxonomic considerations. *Botanical Journal of the Linnean Society* **177**: 619-628.
- Netolitzky F. 1926.** *Anatomie der Angiospermen-Samen. Handbuch der Pflanzenanatomie* Bd. X. Berlin: Borntraeger.
- Nijalingappa BHM. 1986.** Embryology of *Scleria foliosa* (Cyperaceae). *Plant Systematics and Evolution* **152**: 219-230.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368-373.
- Oriani A, Scatena VL. 2014.** Ovule, fruit and seed development in *Abolboda* (Xyridaceae, Poales): implications for taxonomy and phylogeny. *Botanical Journal of the Linnean Society* **175**: 144-154.

- Oriani A, Scatena VL. 2017.** Ovule, fruit, and seed development of *Orectanthe sceptrum* and its systematic relevance to Xyridaceae (Poales). *International Journal of Plant Science* **178(2)**: 104-116.
- Pellegrini MOO, Machado AFP, Carvalho MLS. 2016** onwards. Mayacaceae. In: *Flora do Brasil 2020*. Available at: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB160> [accessed March 2018].
- Prado JPC, Schmidt EC, Steinmacher DG, Guerra MP, Bouzon ZL, Dal Vesco LL, Pescador R. 2014.** Seed morphology of *Vrisea friburgensis* var. *paludosa* L.B. Sm. (Bromeliaceae). *Hoehnea* **41(4)**: 553-562.
- Prakash N. 1969.** The floral development and embryology of *Centrolepis fascicularis*. *Phytomorphology* **19**: 285-291.
- Ramaswamy SN, Arekal GD. 1982.** Embryology of *Eriocaulon xeranthemum* Mart. (Eriocaulaceae). *Acta Botanica Neerlandica* **31(1/2)**: 41-54.
- Rudall PJ. 1997.** The nucellus and chalaza in monocotyledons: structure and systematics. *The Botanical Review* **63(2)**: 140-181.
- Rudall PJ, Linder HP. 1988.** Megagametophyte and nucellus in Restionaceae and Flagellariaceae. *American Journal of Botany* **75(12)**: 1777-1786.
- Rudall PJ, Sajo MG. 1999.** Systematic position of *Xyris*: flower and seed anatomy. *International Journal of Plant Sciences* **160(4)**: 795-808.
- Rudall PJ, Steveson DW, Linder P. 1999.** Structure and systematics of *Hanguana*, a monocotyledon of uncertain affinity. *Australian Systematic Botany* **12**: 311-330.
- Sargent JA, Osborne DJ. 1980.** A comparative study of the fine structure of coleorhiza and root cells during the early hours of germination of rye embryos. *Protoplasma* **104**: 91-103.
- Shah CK. 1963.** The life history of *Juncus bufonius*. *Journal of the Indian Botanical Society* **42**: 238-251.
- Smith RW. 1910.** The floral development and embryogeny of *Eriocaulon septangulare*. *Botanical Gazette* **49**: 281-289
- Souèges R. 1923.** Embryogénie des Joncacées. Développement de L'embryon chez de *Luzula forsteri* Dc. C.R. *Academic Science of Paris* **177**: 705-708.
- Souèges R. 1924.** Embryogénie des Graminées. Développement de l'embryon chez le *Poa annua* L. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* **178**: 1307-1310.
- Souèges R. 1941.** Variantes dans les deux premiers groupes des périodes de la classification embryogénique. *Bulletin de la Société Botanique de France* **88**: 602-608.

- Taylor WR. 1920.** A morphological and cytological study of reproduction in the genus *Acer*. *Contributions from the Botanical Laboratory of the University of Pennsylvania* **5**: 1-30.
- Thimm U. 1985.** Zur Embryologie, Blüten- und Fruchtanatomie der isolierten Juncales-Gattungen *Prionia* und *Thurnia*. Unpublished D. Phil. Thesis, Ruhr-Universität Bochum, Bochum.
- Tiemann A. 1985.** Untersuchungen zur Embryologie, Blütenmorphologie und Systematik der Rapateaceen und der Xyridaceen-Gattung *Abolboda* (Monocotyledoneae). *Dissertationes Botanicae, Ruhr-Universität Bochum* **82**: 1-201.
- Tilton VR. 1980.** The nucellar epiderms and micropyle of *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) with a review of these structures in other taxa. *Canadian Journal of Botany* **58**: 1872-1884.
- Venkateswarlu J, Devi PI. 1964.** Embryology of some Indian grasses. *Current Science* **33(4)**: 104-106.
- Venturelli M, Bouman F. 1986.** Embryology and seed development in *Mayaca fluviatilis* (Mayacaceae). *Acta Botanica Neerlandica* **35(4)**: 497-516.
- Venturelli M, Bouman F. 1988.** Development of ovule and seed in Rapateaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **97(3)**: 267-294.
- Watson L, Dallwitz MJ 1992 onwards.** *The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval*. Available at: <http://delta-intkey.com/> [accessed March 2018].
- Weinzieher S. 1914.** Beiträge zur Entwicklungsgeschichte von *Xyris indica*. *Flora* **106**: 393-432.
- Werker E. 1997.** *Seed anatomy. Encyclopedia of plant anatomy*. Bd. 10. Berlin: Grebrüder Borntraeger.
- Yeung EC, Meinke DW. 1993.** Embryogenesis in angiosperms: development of the suspensor. *The Plant Cell* **5**: 1371-1381
- Young TE, Gallie DR. 2000.** Programmed cell death during endosperm development. In: Lam E, Fukuda H, Greenberg J, eds. *Programmed cell death in higher plants*. Dordrecht: Springer, 39-57.

ILLUSTRATIONS

Figure 1. Longitudinal sections of the seed of *Xyris* species at beginning stages of embryo development. A, *X. pilosa*, embryo sac showing two synergids and the egg cell, and penetration of the pollen tube through the micropyle. B-F, *X. pterygoblephara*. B, Zygote. C, Division of the zygote. D, Division of the apical cell (*ca*) of two-celled proembryo. E, Division of the basal cell (*cb*) of two-celled proembryo. F, Tetrad stage of the embryo. *ca* = apical cell; *cb* = basal cell; *ci* and *m* = cells originated from the basal cell; *ii* = inner integument; *nu* = nucellus; *oi* = outer integument *q* = cells originated from the apical cell. Scale bars: A = 20 μm ; B-F = 10 μm .

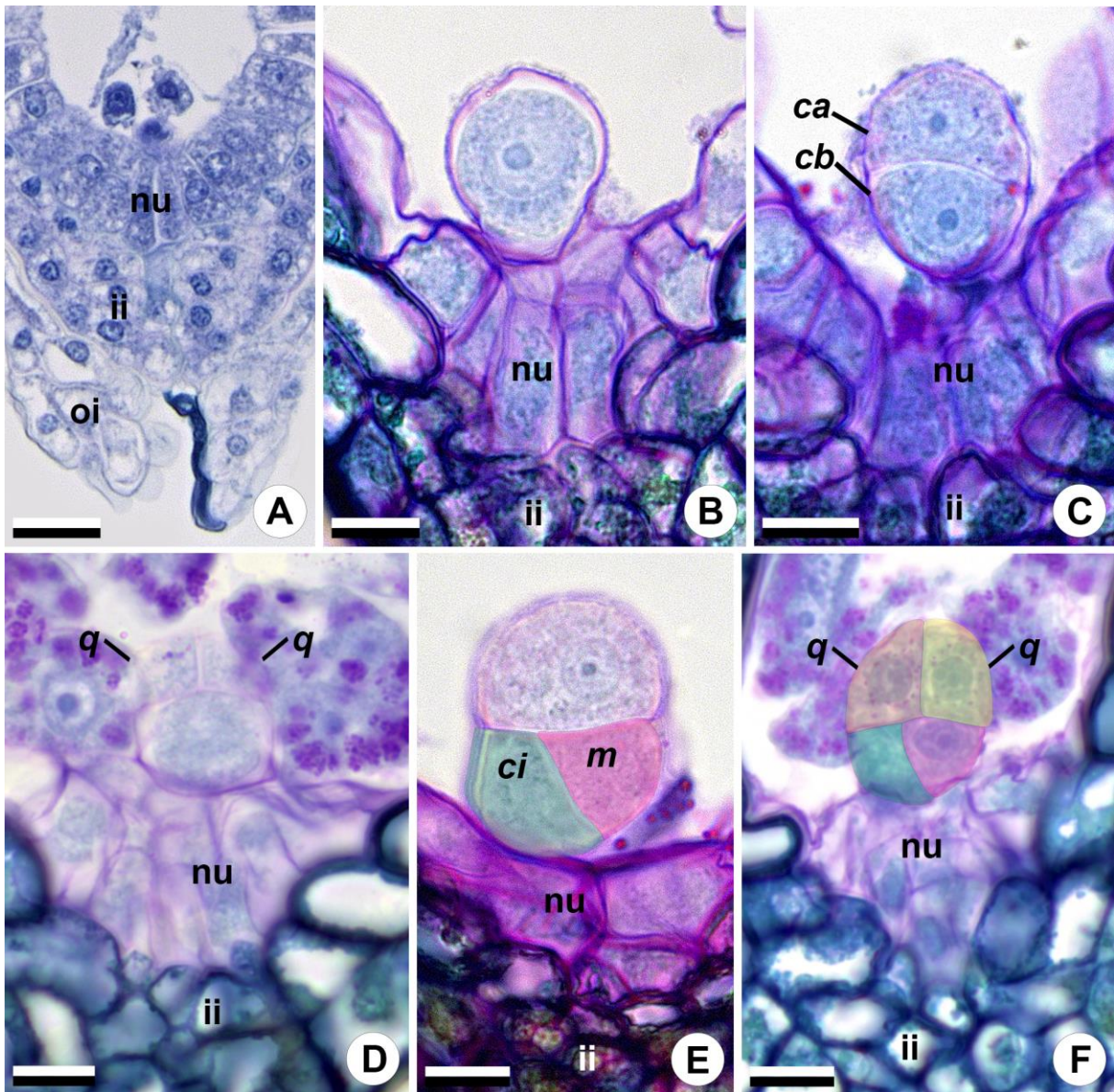


Figure 2. Longitudinal sections of the seeds of *Xyris fallax* at successive stages of embryo development. A, *ci* cell (green), division of *m* cell (pink), and cells originated from *q*; the colors orange and yellow indicate the daughter cells of each *q* cell. B, The outermost cells originated from *q* undergo transversal divisions. C, The innermost cells originated from *q* undergo transversal and vertical divisions. D, *ci* cell divides into *n* and *n'* cells. E, Suspensor formed by *n'* cell. F, Division of the upper daughter cell of *m*. *ci* and *m* = cells originated from basal cell of two-celled proembryo; *ii* = inner integument; *n* and *n'* = cells originated from *ci* cell; *nu* = nucellus. Scale bars: A-F = 20 μm .

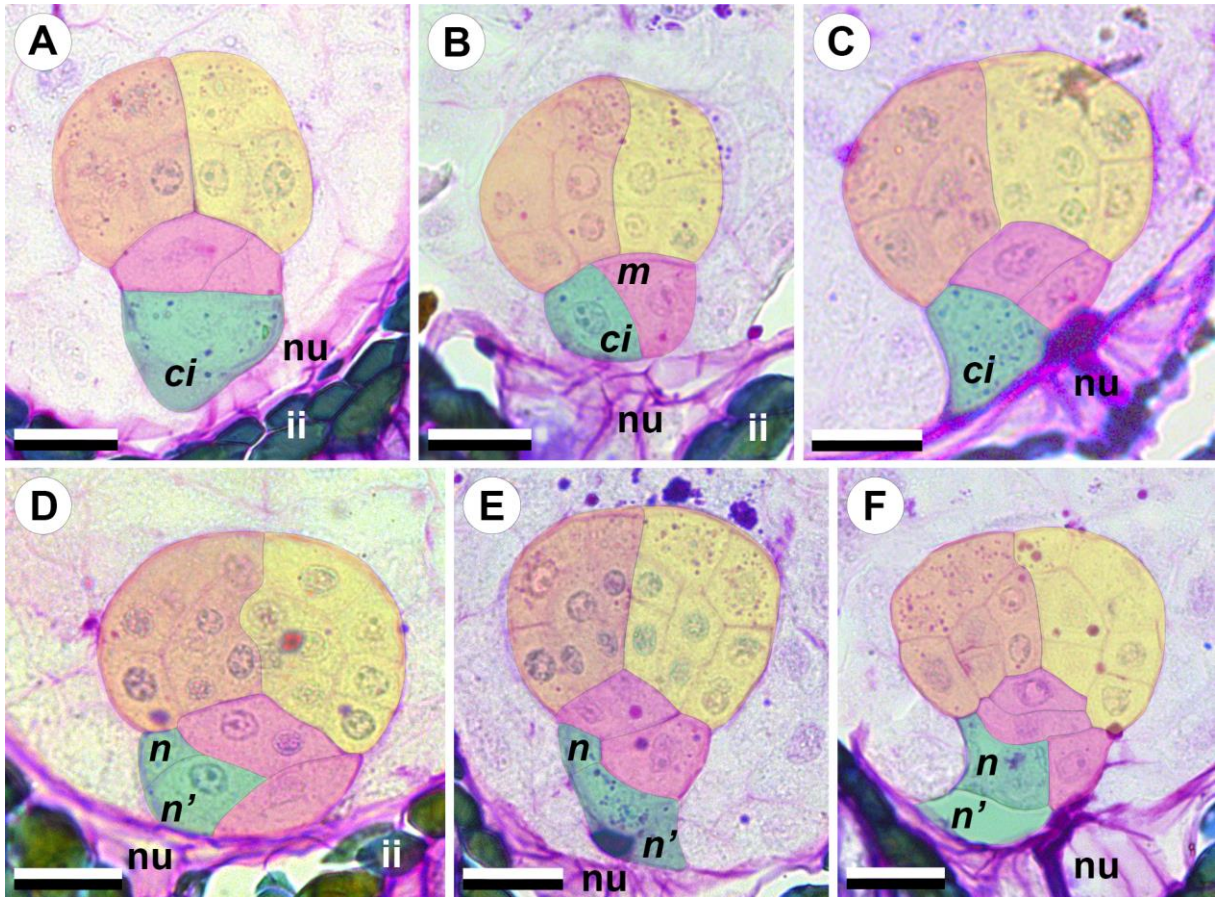


Figure 3. Longitudinal sections of the seed of *Xyris* species at later stages of embryo development. A-C. *X. asperula*. A, Suspensor formed by *o* (asterisk) and *p* (arrowhead) cells, and presence of epistase (colored red). B, Transversal division of *p* cell (arrowhead). C, Oblique division of *o* cell (asterisk). D, *X. pilosa*, two lower daughter cells of *o* and *p* cells before degenerating. E, *X. subsetigera*, degenerating cells (arrow). F, *X. pilosa*, remnants of the suspensor. co = cotyledonary cells; en = endosperm; ii = inner integument. Scale bars: A-C, E-F = 20 μm ; D = 15 μm .

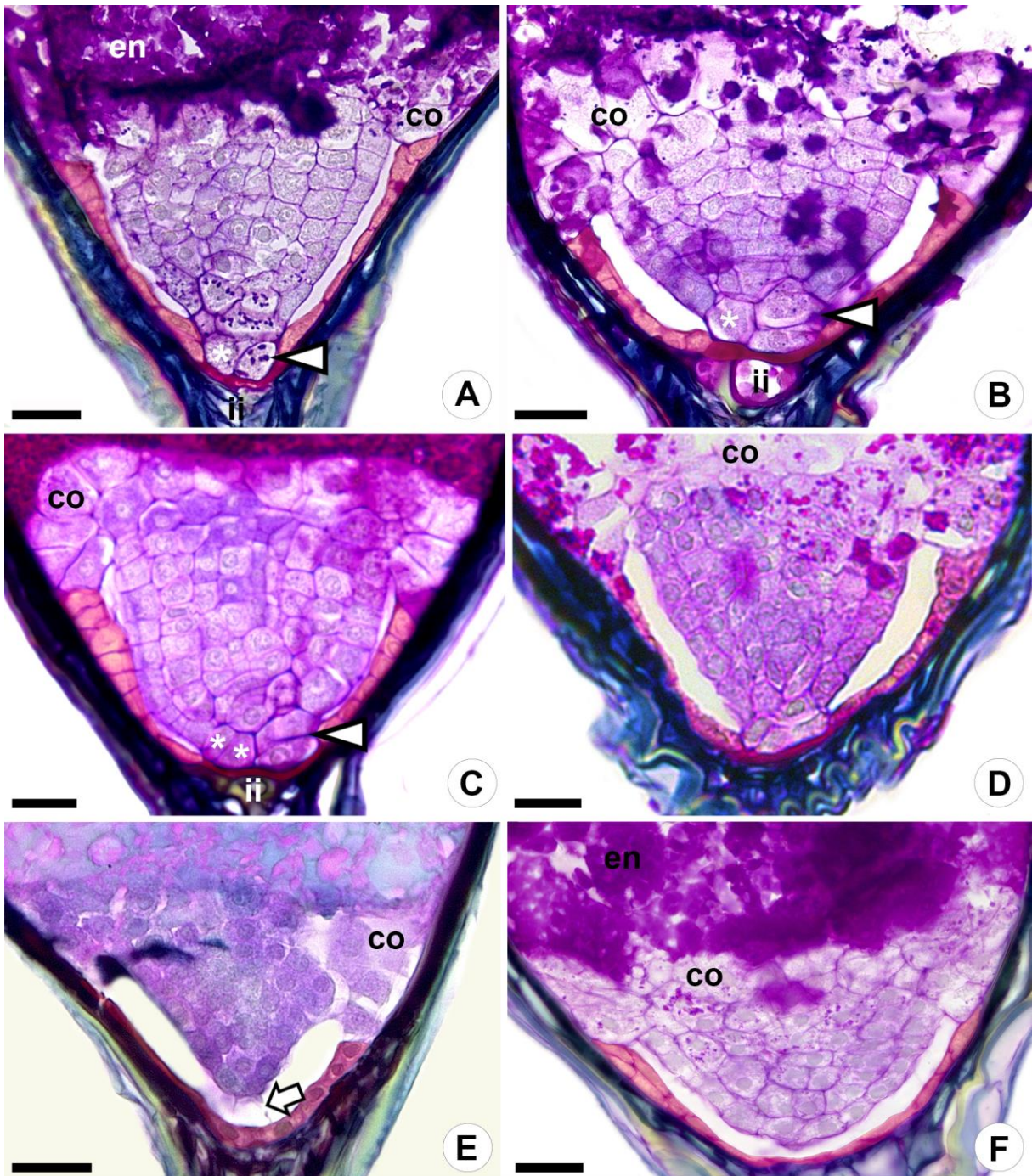


Figure 4. Longitudinal sections of the seed of *Xyris*, *Orectanthe* and *Abolboda* at later stages of embryo development. A, *Xyris pilosa*, mature embryo without suspensor, showing cotyledonary cells attached to the endosperm, and formation of a space between the epistase (colored red) and the embryo. B-D. *Orectanthe sceptrum*. B, Detail of nucelar cells, which correspond to epistase (colored red), cotyledonary cells, and endosperm. C, Two lower daughter cells of *o* and *p* cells before degenerating. D, Mature embryo, epistase and endosperm. E-F. *A. poarchon*. E, *o* cell (asterisk) and vertical division of *p* cell (arrowhead). F, Mature embryo, epistase and endosperm. co = cotyledonary cells; en = endosperm. Scale bars: A = 20 μm ; B, D = 50 μm ; C = 40 μm ; E-F = 25 μm .

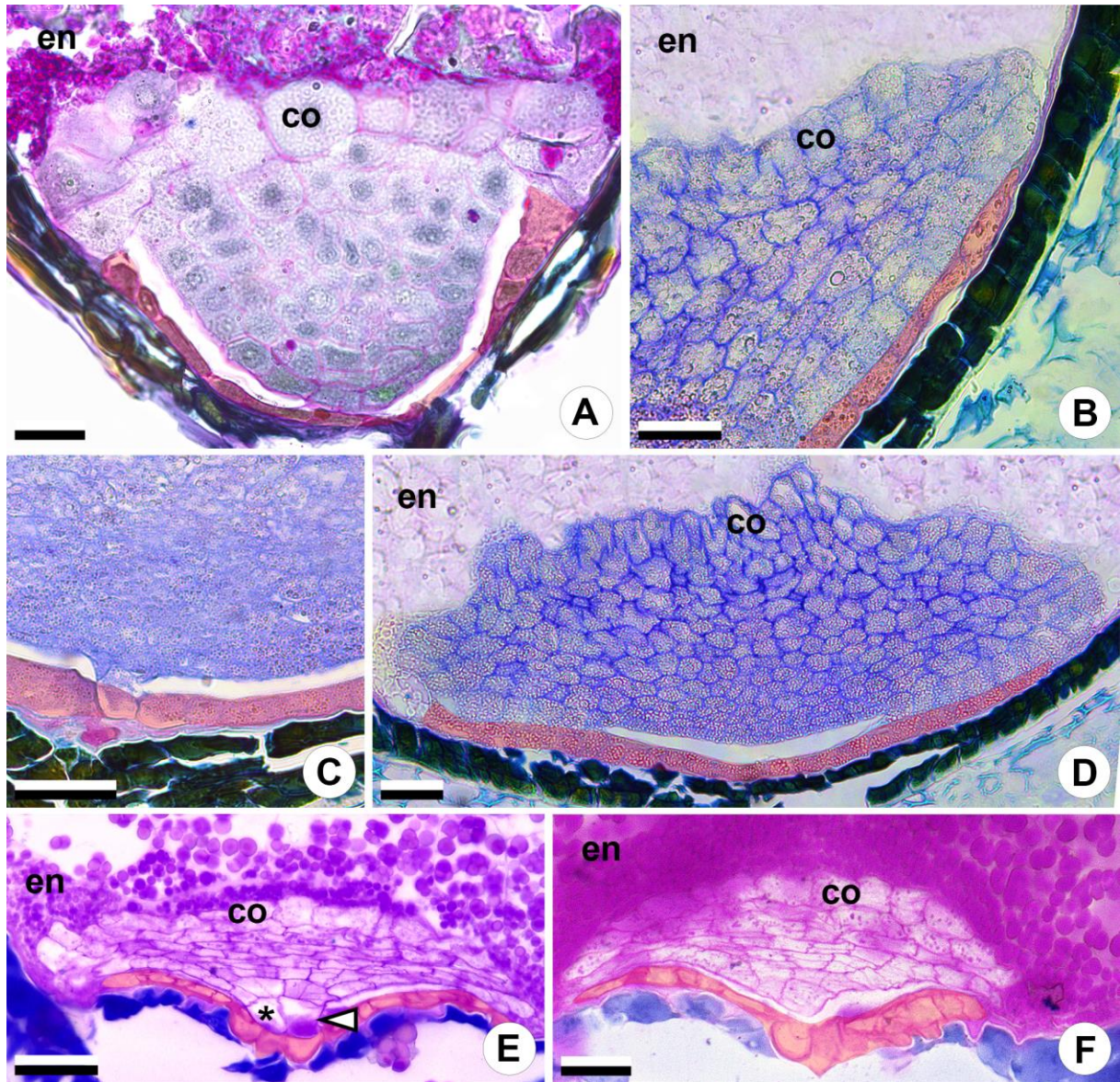


Figure 5. Longitudinal sections of the seeds of *Mayaca sellowiana* at successive developmental stages of the embryo. A, Zygote. B, Division of the zygote. C, Transversal division of the basal cell of the two-celled proembryo. D, Vertical division of apical cell forming the T-shaped embryo. E, Formation of the quadrants, vertical division of *mi cell* and transversal division of *ci* originating *n* and *n'* cells. F, Octants. G, Vertical division of daughter cell of *m* and transversal division of *n* cell. H, Suspensor formed by *o* (asterisk) and *p* (arrowhead) cells. I, Suspensor formed only by *n'* cell. J, Degenerating suspensor (arrow). K, Mature embryo without suspensor, showing cotyledonary cells attached to the endosperm, and an aleurone layer (colored blue). *ca* = apical cell; *cb* = basal cell; *co* = cotyledonary cells; *en* = endosperm; *nu* = nucellus. Scale bars: A-H = 10 μm ; I-K = 25 μm .

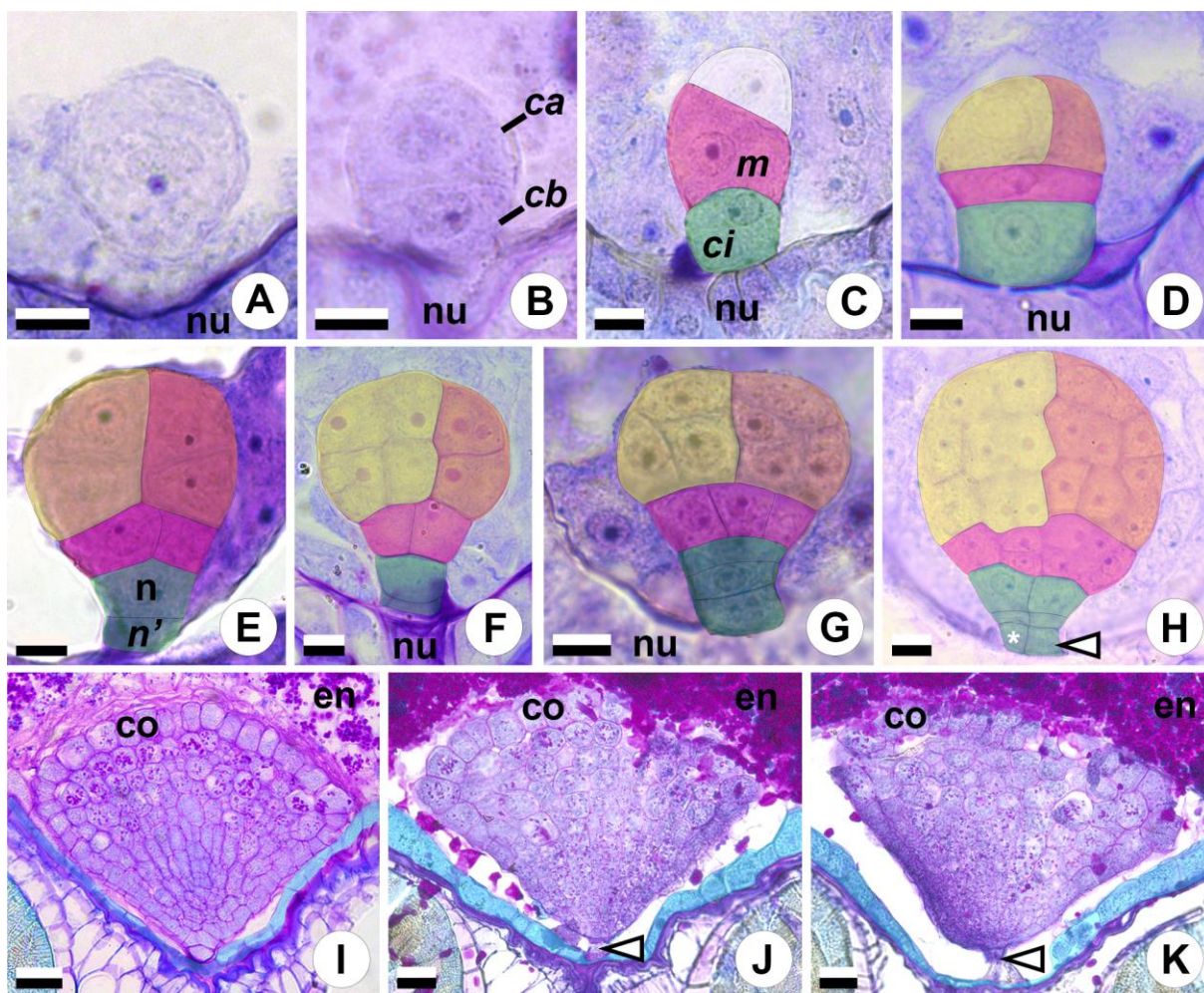


Figure 6. Longitudinal sections of the seeds of *Xyris* (Xyridaceae), *Comanthera* (Eriocaulaceae) and *Mayaca* (Mayacaceae). A, *X. pilosa*. B, *C. suberosa*. C, *M. sellowiana*, the mature embryo is campanulate, undifferentiated and reduced in relation to the seed size, and the remaining of the seed content is filled with endosperm cells that accumulate starch grains. D, *C. suberosa*, mature embryo showing cotyledonary cells attached to the endosperm, and epistase (colored red). E, *M. sellowiana*, micropylar region exhibiting outer and inner integument, the degenerating nucellus, and an aleurone layer (colored blue). Scale bars: A-B = 50 μm ; C = 200 μm ; D-E, 20 μm .

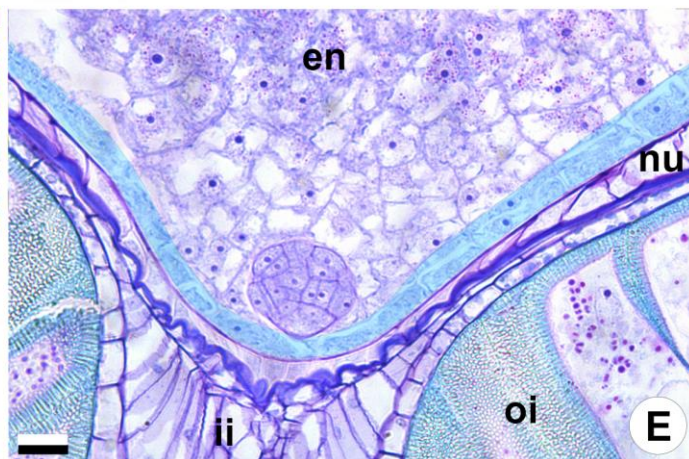
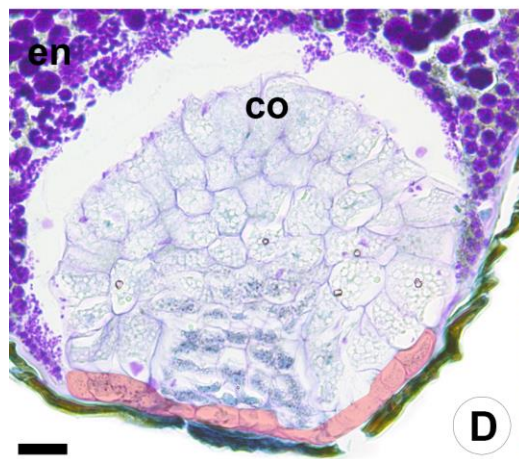
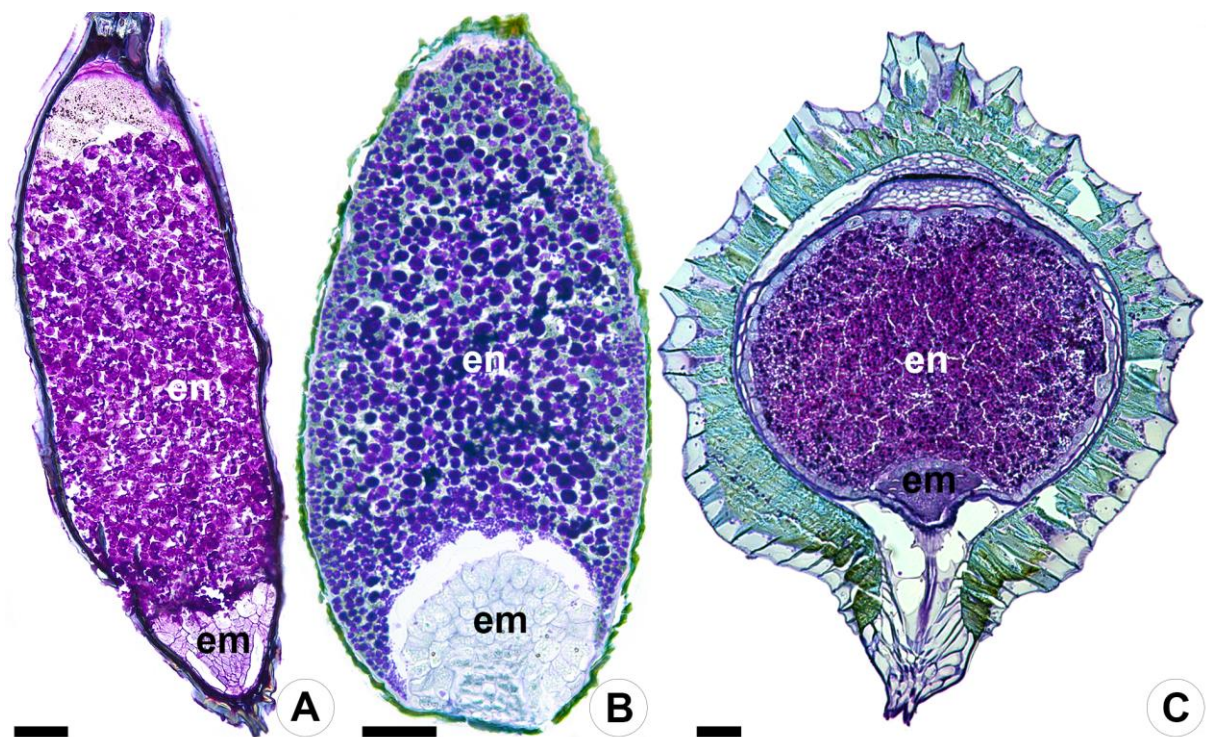


Figure 7. Embryo and seed traits optimized on the maximum clade credibility tree from Bouchenak-Khelladi *et al.* (2014). Character names and their states are indicated in the boxes. The striped branches represent missing data.

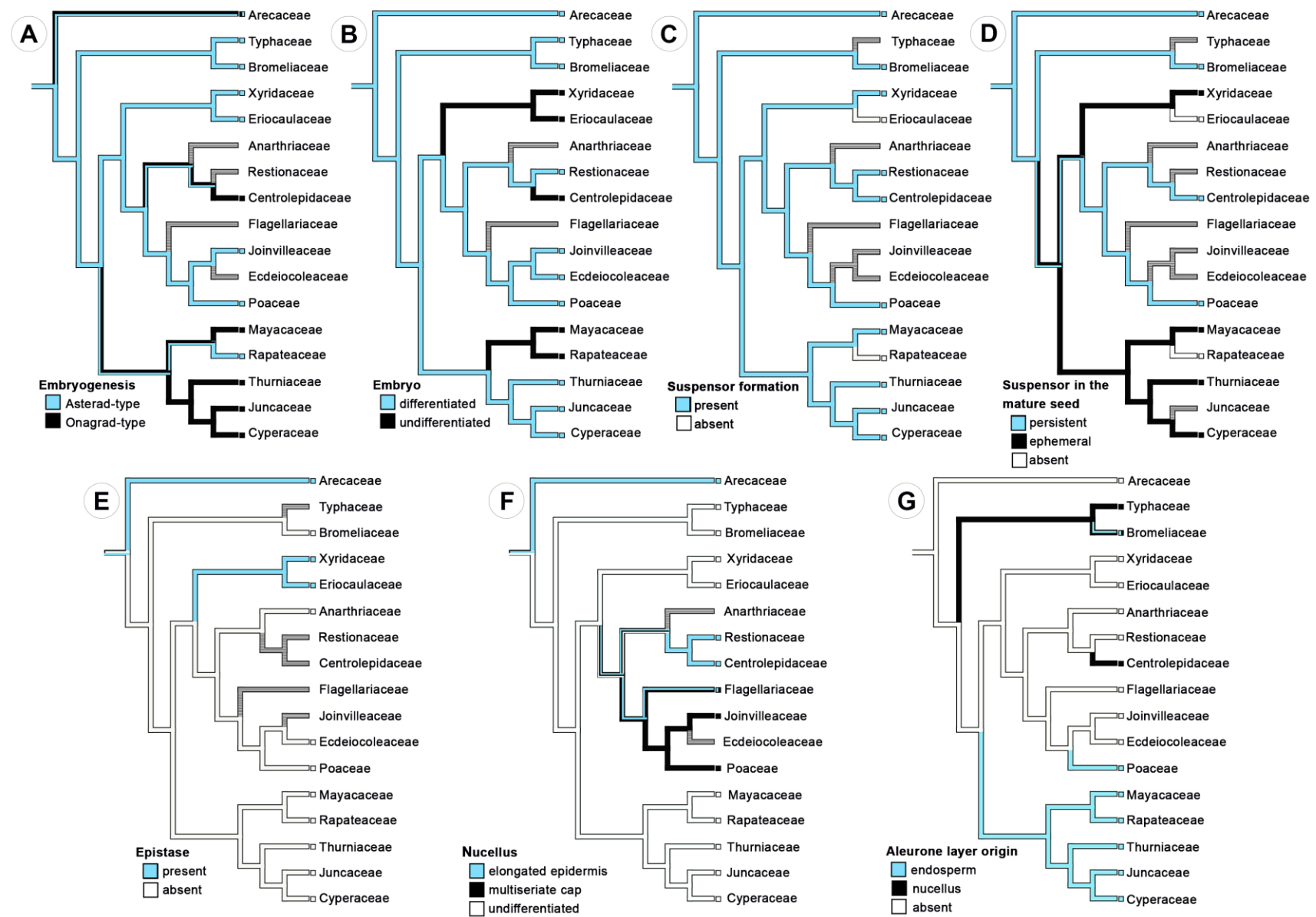


Table 1. Embryogenesis and seed characters in Poales

	Embryogenesis	Variation type	Tetrad shape	Embryo	Suspensor formation	Suspensor origin	Suspensor in the mature seed	Epistase	Nucellus	Aleurone layer origin
Bromeliads										
Typhaceae	Asterad-type	?	?	differentiated	?	?	?	?	undifferentiated	nucellus
Bromeliaceae	Asterad-type	<i>Anthericum</i>	A2 (T-inverted)	differentiated	present	<i>n</i> and <i>n'</i>	Present	absent	undifferentiated	nucellus;endosperm
Xyrids										
Xyridaceae	Asterad-type	<i>Muscari</i>	A1	undifferentiated	present	<i>o</i> and <i>p</i>	Absent	present	undifferentiated	absent
Eriocaulaceae	Asterad-type	<i>Penaeae</i>	A1	undifferentiated	absent	absent	Absent	present	undifferentiated	absent
Restiids										
Anarthriaceae	?	?	?	?	?	?	?	absent	?	absent
Restionaceae	?	?	?	differentiated	present	?	?	?	elongated epidermis	absent
Centrolepidaceae	Onagrad-type	<i>Juncus</i>	A2 (T-inverted)	undifferentiated	present	<i>ci</i>	Present	?	elongated epidermis	nucellus
Graminids										
Flagellariaceae	?	?	?	?	?	?	?	?	elongated epidermis; nucellar cap	absent
Joinvilleaceae	Asterad-type	?	?	differentiated	?	?	?	?	multiseriate nucellar cap	absent
Ecdeiocoleaceae	?	?	?	differentiated	?	?	?	absent	?	absent
Poaceae	Asterad-type	<i>Poa</i>	B2 (T-inverted)	differentiated	present	<i>o</i> and <i>p</i>	Present	absent	multiseriate nucellar cap	endosperm
Cyperids										
Mayacaceae	Onagrad-type	<i>Juncus</i>	A2 (T-shape)	undifferentiated	present	<i>o</i> and <i>p</i> ; or <i>n'</i>	Absent	absent	undifferentiated	endosperm
Rapateaceae	Asterad-type	<i>Penaeae</i>	A1	undifferentiated	absent	absent	Absent	absent	undifferentiated	endosperm
Thurniaceae	Onagrad-type	<i>Juncus</i>	A2 (T-shape)	differentiated	present	<i>o</i> and <i>p</i>	Absent	absent	undifferentiated	endosperm
Juncaceae	Onagrad-type	<i>Juncus</i>	A2 (T-shape)	differentiated	present	<i>o</i> and <i>p</i> ; or <i>n'</i>	?	absent	undifferentiated	endosperm
Cyperaceae	Onagrad-type	<i>Juncus</i>	A2 (T-shape)	differentiated	present	<i>o</i> and <i>p</i> ; or divisions of <i>ci</i>	Absent	absent	undifferentiated	endosperm

Capítulo 2

Germinação, desenvolvimento pós-seminal e evolução do cotilédone em *Xyris* (Xyridaceae, Poales)

Kaire de O. Nardi e Aline Oriani

Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, CP 199,
13506-900 Rio Claro, SP, Brasil

✉ Kaire O. Nardi

Autor para correspondência: kairenardi@gmail.com

Resumo

Estudou-se a germinação e o desenvolvimento pós-seminal em espécies das seções *Xyris* (03 spp.) e *Nematopus* (07 spp.), analisando aspectos morfológicos, micromorfológicos e anatômicos, a fim de caracterizar a plântula e entender a evolução dos tipos de cotilédone dentro do gênero, otimizando-os na filogenia da família. Espécies da seção *Xyris* apresentaram alta porcentagem de germinação ($\geq 92\%$), enquanto que nas espécies da seção *Nematopus* a porcentagem de germinação mostrou-se mais variável (3 a 96%). Testes de germinação de sementes com o opérculo impermeabilizado mostraram que a porcentagem de germinação não diferiu estatisticamente daquelas com o opérculo não impermeabilizado, indicando que essa estrutura não atua no processo de embebição. Em todas as espécies estudadas, exceto em *Xyris fallax*, observou-se a mesma sequência nos estágios de desenvolvimento pós-seminal: ruptura do opérculo devido à emergência do eixo embrionário, alongamento do hipofilo cotiledonar laminar, diferenciação de um colar de rizóides na extremidade do hipocótilo reduzido, formação de raiz primária com desenvolvimento lento e formação de raízes adventícias e de folhas dispostas em roseta a partir do epicótilo reduzido. *Xyris fallax*, pertencente à seção *Xyris*, diferenciou-se por apresentar cotilédone compacto com os lobos da bainha desenvolvidos, os quais envolvem o epicótilo e protegem os primórdios foliares, além da formação das folhas anteceder o desenvolvimento das raízes adventícias. Isto nos possibilita inferir que existem pelo menos dois padrões de desenvolvimento pós-seminal no gênero, sendo o segundo relatado em *Xyris* pela primeira vez. Cotilédone compacto é o estado de caráter ancestral no clado xyrídeo (incluindo Xyridaceae e Eriocaulaceae), a partir do qual o hipofilo cotiledonar laminar derivou provavelmente no ancestral mais recente de *Xyris*.

Palavras-chave: anatomia, cotilédone, evolução, hipofilo cotiledonar, micromorfologia, opérculo, plântula, seção *Nematopus*, seção *Xyris*, semente.

Introdução

Xyridaceae compreende cerca de 430 espécies, divididas em duas subfamílias: Abolbodoideae, que inclui *Abolboda* Bonpl., *Achlyphila* Maguire & Wurdack, *Aratitiopea* Steyerl. & P.E. Berry e *Orectanthe* Maguire, e Xyridoideae, representada por *Xyris* L., que compreende cerca de 90% das espécies da família (Kral 1998; Campbell 2008; Campbell et al. 2009). As espécies de *Xyris* são divididas em três seções, com base nas características do ovário, como o número de lóculos e o tipo de placentação. Essas seções são: *Xyris* Endl., com representantes de placentação parietal em um ovário unilocular; *Nematopus* Seub., de placentação central-livre ou basal em um ovário unilocular; e *Pomatoxyris* Endl., de placentação axilar em um ovário trilocular (Doust e Conn 1994). Dentre as seções de *Xyris*, *Nematopus* é a mais representativa, incluindo cerca de 250 espécies, com distribuição neotropical (Mota 2014). A seção *Xyris* inclui cerca de 140 espécies, com distribuição pantropical, enquanto *Pomatoxyris* agrupa 22 espécies, endêmicas da Austrália (Mota 2014).

Em estudo filogenético de Xyridaceae baseado em dados mitocondriais (*cox3* e *orf25*) e plastidiais (*matK*, *ndhF* e *rbcL*), tanto o gênero *Xyris* como as suas três seções emergem como monofiléticos, com alto suporte filogenético (Mota 2014). Além disso, as espécies da seção *Nematopus* emergem formando sete clados, que foram denominados de clados A, B, C, D, E e F (Mota 2014). A seção australiana *Pomatoxyris* aparece como a primeira linhagem divergente do gênero, como grupo-irmão das demais espécies de *Xyris* incluídas nas seções americanas *Xyris* e *Nematopus* (Mota 2014).

Trabalhos realizados em *Xyris* que abordam a embriologia e algumas fases da embriogênese têm enfoque principalmente taxonômico (p. ex. Weinzieher 1914; Govindappa 1955; Rudall e Sajo 1999; Nardi et al. 2015). São características do gênero: envoltório seminal formado por endotégmen taninífero, endotesta com células de paredes espessadas e

exotesta com células de paredes finas; embrião reduzido, indiferenciado e campanulado; endosperma amiláceo preenchendo a maior parte da semente, e opérculo formado pelos tegumentos externo e interno (Nardi et al. 2015).

Nas angiospermas, o opérculo pode se desenvolver na região micropilar ou hilar da semente, sendo formado pelo tegumento externo, interno, por ambos os tegumentos do óvulo, ou ainda pelo endosperma haustorial, como relatado em Campanulaceae (Johri 1984). Esta estrutura assemelha-se a uma tampa e sofre abscisão quando a semente germina. Várias funções já foram atribuídas ao opérculo. Acredita-se que tal estrutura, que geralmente resulta do desenvolvimento de camadas mecânicas protetoras no envoltório seminal, possa fornecer proteção adicional à região micropilar que é, geralmente, uma região de fraqueza na semente (Johri 1984). Para as espécies de *Xyris* estudadas quanto ao desenvolvimento pós-seminal, sugere-se que o opérculo seja uma adaptação a ambientes áridos (Kraus et al. 1994) e que possa facilitar a germinação (Kraus et al. 1994), pois favorece a embebição da semente (Johri 1984).

Em Poales, o opérculo foi relatado para espécies de Xyridaceae (Carlquist 1960; Kraus et al. 1994; Rudall e Sajo 1999; Oriani e Scatena 2014; Nardi et al. 2015) e Eriocaulaceae (Scatena et al. 1993, 1996; Kraus et al. 1996; Scatena e Bouman 2001; Coan e Scatena 2004; Coan et al., 2007a, b, 2010; Dugarte et al. 2015), porém sem estudo de sua funcionalidade. Em Eriocaulaceae, o opérculo se origina apenas do tegumento interno do óvulo (Coan e Scatena 2004; Coan et al. 2007a, 2007b, 2010), enquanto que em Xyridaceae se origina dos tegumentos externo e interno (Oriani e Scatena 2014; Nardi et al. 2015). Estudos sobre germinação e desenvolvimento pós-seminal poderão contribuir com o entendimento sobre as funções desempenhadas por essa estrutura nessas famílias. Há trabalhos sobre desenvolvimento pós-seminal de espécies de Xyridaceae (Kraus et al. 1994; Tillich 1994, 1995, 2007) e de Eriocaulaceae (Scatena et al. 1993, 1996; Kraus et al. 1996; Tillich 1995,

2007; Dugarte et al. 2015), mas nenhum deles deu enfoque ao opérculo ou testou sua funcionalidade.

De acordo com Tillich (1995, 2000, 2007), as plântulas de monocotiledôneas são mais diversas do que as das demais angiospermas e estudos que descrevam o desenvolvimento pós-seminal podem auxiliar também na taxonomia e filogenia, permitindo o estabelecimento de homologias. O desenvolvimento pós-seminal em Xyridaceae foi estudado em *Xyris caroliniana* (Tillich 1994), *X. longiscapa* (Kraus et al. 1994), *X. obtusiuscula*, *X. trachyphylla* (Sajo e Rudall 1999), *X. platystachia*, *X. nubigena* (Kraus et al. 1994), *X. natalensis* (Tillich 2000, 2007), *Xyris* spp. (Tillich 2007) e em *Orectanthe sceptrum* (Tillich 2007), sendo que algumas características da plântula mostraram-se variáveis entre esses dois gêneros, como a presença de densos rizóides na região do colar em *Xyris*, enquanto que em *Orectanthe* o colar é desprovido de rizóides. Ainda nesse último gênero parte da plântula se desenvolve sob a exostesta, sendo apenas os eofilos distais projetados para fora da semente alada (Tillich 2007).

No entanto, a principal diferença entre ambos os gêneros está relacionada ao cotilédone, que é do tipo hipofilo cotiledonar laminar em espécies de *Xyris* (Kraus et al. 1994; Tillich 1994, 1995, 2000, 2007), enquanto que em *Orectanthe* é do tipo compacto (Tillich 2007). Todos esses estudos são voltados à morfologia da plântula, sendo que com relação à anatomia, apenas alguns aspectos anatômicos das plântulas de *Xyris platystachia* são conhecidos (Kraus et al. 1994). Assim, ressalta-se que estudos sobre germinação e desenvolvimento pós-seminal em *Xyris* ainda são incipientes, principalmente diante do elevado número de espécies no gênero e de sua ampla distribuição.

Diante do contexto apresentado, o presente trabalho visa analisar a germinação e o desenvolvimento pós-seminal em espécies de *Xyris* pertencentes às seções americanas *Xyris* e *Nematopus*, avaliando aspectos morfológicos, micromorfológicos e anatômicos, a fim de caracterizar a plântula nessas seções e entender a evolução dos tipos de cotilédone dentro do

gênero, analisando-os em um contexto filogenético. Buscamos responder as seguintes perguntas: O opérculo tem função no processo de germinação, atuando como estrutura facilitadora da embebição? As espécies de *Xyris* estudadas compartilham o mesmo padrão de desenvolvimento pós-seminal e o mesmo tipo de cotilédone? Como os diferentes tipos de cotilédones evoluíram dentro da família?

Material e métodos

Espécies estudadas

Foram estudadas as seguintes espécies: *Xyris* sect. *Nematopus*: *X. asperula* Mart. (Nardi et al. 40), *X. melanopoda* L.B. Sm & Downs (Nardi 56), *X. obtusiuscula* L.A. Nilsson (Nardi et al. 46), *X. pterygoblephara* Steud. (Nardi et al. 43), *X. savanensis* Miq. (Nardi et al. 70), *X. schizachne* Mart. (Nardi et al. 37), *X. subsetigera* Malme (Nardi et al. 58); *Xyris* sect. *Xyris*: *X. fallax* Malme (Nardi et al. 34), *X. jupicai* (Nardi et al. 36) e *X. macrocephala* Vahl. (Nardi et al. 35). Estas espécies foram escolhidas por abrangerem ambas as seções americanas, *Xyris* e *Nematopus*. Nesta última seção, espécies de quase todos os clados foram amostradas, exceto dos clados B e D por incluírem poucas espécies, com distribuição restrita, em locais de difícil acesso para coleta.

A maioria das espécies de *Xyris* pertencentes à seção *Nematopus* foram coletadas nos campos rupestres da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil), enquanto que as espécies da seção *Xyris* e *X. savanensis* foram coletadas em Itirapina (São Paulo, Brasil), em áreas de campos úmidos (cerrado). Os vouchers foram identificados e depositados no Herbarium Rioclarense (HRCB) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista. A identificação das espécies foi feita com base na chave diagnóstica de Wanderley (2011) e foi confirmada por taxonomista especialista da família (Nara F. O. Mota).

Germinação

Para a análise do desenvolvimento pós-seminal, 100 sementes maduras de cada espécie foram colocadas para germinar em cinco placas de Petri, com 20 sementes em cada. As placas de Petri foram forradas com papel filtro umedecido com água destilada e acondicionadas em sala climatizada, com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e luz fluorescente ($\approx 40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR) constantes.

Para verificar a funcionalidade do opérculo, 30 sementes (3 réplicas de 10 sementes) de *Xyris fallax*, *X. macrocephala*, *X. savanensis* e *X. schizachne* foram colocadas para germinar com a região do opérculo impermeabilizada com cola à base de cianoacrilato (Super Bonder) (Souza et al. 2012). Para tanto, as sementes foram manipuladas sob estereomicroscópio e a cola foi colocada apenas sobre o opérculo, com o auxílio de pincel. Também foram colocadas para germinar 30 sementes não manipuladas de cada espécie como controle. Sementes destas espécies foram escolhidas por apresentarem tamanho maior em relação às demais espécies estudadas, facilitando o manuseio na preparação do experimento.

A observação das sementes foi realizada a cada 24 horas e a germinação foi considerada a partir da protrusão do eixo embrionário. A documentação dos resultados foi feita com imagens obtidas com câmera digital Canon Power Shot S80, acoplada ao estereomicroscópio Leica EZ4. Para a edição de imagens utilizou-se o programa Photoshop CS6.

Para o cálculo do tempo médio de surgimento de cada estrutura da plântula (em dias após a germinação) utilizou-se o método descrito por Ranal e Santana (2006). Curvas de germinação acumulada foram utilizadas para descrever a germinação em função do tempo (em dias) das diferentes espécies estudadas. Nas curva de germinação estão as porcentagens de germinação ajustadas em relação ao número total de sementes germinadas. A diferença na porcentagem de germinação entre as sementes controle e com o opérculo impermeabilizado foi analisada através de Modelos Lineares Generalizados Mistos (GLMM) com distribuição

binomial ($\alpha = 0.05$), utilizando-se as réplicas como fator aleatório na análise (Zuur et al. 2009) no software R 3.2.5 (R Core Team 2016) pacote lme4 (Bates et al. 2015).

Análises anatômica e micromorfológica

Plântulas em diferentes fases de desenvolvimento foram fixadas em FAA 50 (37% formaldeído, ácido acético glacial, 70% etanol, 1:1:18 v/v, Johansen 1940) por 24 horas e posteriormente transferidas para álcool 70%, para o estudo anatômico e micromorfológico.

Para análise sob microscopia de luz, o material fixado foi incluído em (2-hidroxietil)-metacrilato (Leica Historesin Embedding Kit) (Gerrits e Smid 1983) e seccionado (5-7 μ m de espessura) em micrótomo rotativo (RM 2245, Leica). As secções anatômicas foram coradas com ácido periódico - reativo de Schiff (PAS) e azul de toluidina a 0,05% em borato de sódio (O'Brien et al. 1964; Feder e O'Brien 1968) e montadas em lâminas permanentes com Entellan (Merck). As secções anatômicas escolhidas foram registradas com capturador de imagens (Leica, DFC 450) acoplado ao microscópio (Leica, DM 4000B), utilizando-se o programa de digitalização de imagens LAS (Leica Application Suite V4.0.0).

Para análise sob microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram transferidas para etanol 90%, 100%, etanol 100% + acetona 100% (1:1) e acetona 100%, por cerca de 30 minutos em cada solução. Posteriormente, foram submetidas à secagem ao ponto crítico em gás carbônico (Balzers CPD030 Critical Point) e metalizadas com ouro (Balzers 5 CDO 50 Sputter Coater). Os resultados foram documentados por meio de imagens obtidas com capturador de imagens acoplado ao microscópio (TM 3000 Tabletop Microscope Hitachi), utilizando-se o programa TM 3000 Application Program.

A terminologia aqui utilizada segue a proposta por Tillich (2007). Os tipos de cotilédone foram otimizados na filogenia de Xyridaceae publicada por Mota (2014) para

reconstrução do estado de caráter ancestral, utilizando-se o método de parsimônia no software Mesquite 3.40 (Maddison e Maddison 2018).

Resultados

Germinação

Todas as espécies estudadas pertencentes à seção *Xyris* apresentaram alta porcentagem de germinação, de 92% a 96%. Dentre as espécies da seção *Nematopus*, a porcentagem de germinação mostrou-se mais variável, sendo alta em *Xyris savanensis* (96%) e *X. asperula* (91%) e muito baixa em *X. pterygoblephara* (4%) e *X. obtusiuscula* (3%) (Tabela 1).

Na seção *Xyris*, sementes de *Xyris jupicai* e *X. macrocephala* apresentaram início da germinação poucos dias após a montagem do experimento, no 6º e no 8º dia, respectivamente, bem como rápida curva de germinação, tendo a primeira espécie atingido o total de sementes germinadas no 9º dia e a segunda espécie no 15º dia (Fig. 1a). Já *Xyris fallax* iniciou o processo de germinação mais tardiamente em relação às demais espécies, no 28º dia, além de apresentar curva de germinação mais lenta, sendo a última semente germinada no 42º dia após o início do experimento (Fig. 1a).

Na seção *Nematopus*, a maioria das espécies apresentaram curva de germinação lenta, com exceção de *Xyris savanensis* (Fig. 1b-c). Sementes de *X. melanopoda* (Fig. 1b) e *X. schizachne* (Fig. 1c) germinaram anteriormente às das demais espécies da seção. As sementes de *Xyris savanensis*, que germinaram tardiamente e apresentaram curva de germinação rápida, germinaram do 18º ao 22º dia após o início do experimento (Fig. 1c).

A Figura 2 mostra os resultados do teste de germinação das sementes com o opérculo impermeabilizado em relação ao controle. As análises estatísticas mostraram que dentre as espécies estudadas a porcentagem final de germinação diferiu significativamente entre os

tratamentos apenas em *Xyris fallax* ($p=0,021$), na qual a taxa de germinação das sementes com o opérculo impermeabilizado ($70\% \pm 20$) foi menor que a das sementes com o opérculo não impermeabilizado ($100\% \pm 0,5$). Nas demais espécies testadas a porcentagem de germinação foi alta em ambos os tratamentos, não diferindo estatisticamente.

Desenvolvimento pós-seminal

Na maioria das espécies estudadas, exceto em *Xyris fallax*, a germinação inicia-se com a protusão do eixo embrionário (Figs. 3a, 4a) após a embebição da semente. O eixo embrionário se alonga e exerce pressão contra o opérculo, que se rompe transversalmente, formando uma estrutura em forma de tampa (Figs. 3a-b, 4a-b). Em seguida, ocorre o alongamento do hipofilo cotiledonar laminar (Figs. 3c, 4b-c), a diferenciação do colar de rizóides na extremidade do hipocótilo reduzido (Figs. 3d, 4c-d) e a formação da raiz primária (Figs. 3e, 4c-d). Do epicótilo, também reduzido, observa-se o desenvolvimento da primeira (Figs. 3f, 4d), segunda (Figs. 3g, 4e) e terceira folhas (Figs. 3h, 4f), concomitante ao desenvolvimento das raízes adventícias. Plântulas desenvolvidas apresentam hipofilo cotiledonar laminar alongado, folhas dispostas em roseta e várias raízes adventícias (Figs. 3i, 4f). As sementes apresentavam-se pegajosas e aderentes após a germinação.

Sob microscopia eletrônica de varredura, observa-se em *Xyris jupicai* a protrusão do eixo embrionário (Fig. 5a) e o início do desenvolvimento do hipofilo cotiledonar laminar (Fig. 5b). Observa-se também que o opérculo permanece fixo no ápice radicular, protegendo-o durante o desenvolvimento do hipofilo cotiledonar (Fig. 5c-d). A Figura 5e mostra os lobos da bainha do cotilédone envolvendo o primeiro primórdio foliar. Em estágios sucessivos de desenvolvimento observa-se o alongamento do hipofilo cotiledonar e o desenvolvimento da primeira folha a partir do epicótilo, que está envolvido pela bainha cotiledonar (Fig. 5f-h). Nota-se também o colar de rizóides completamente diferenciado na extremidade do

hipocótilo, na região de transição entre hipocótilo-raiz (Fig. 5i) e o início do desenvolvimento da raiz primária (Fig. 5j-k).

Sob microscopia de luz, a semente madura apresenta embrião reduzido em relação ao seu tamanho, sendo seu conteúdo preenchido por endosperma amilífero (Fig. 6a-b). Após a embebição da semente, ocorre a abertura do opérculo pela ruptura do tégmen (Fig. 6b), enquanto a testa permanece aderida à semente na região micropilar (Fig. 6b-c). Antes do alongamento do hipofilo cotiledonar é possível distinguir o ápice radicular e o hipocótilo reduzido (Fig. 6c), na extremidade do qual ocorre a diferenciação do colar de rizóides (Fig. 6d-e). Nessas plântulas de *Xyris schizachne* nota-se que o opérculo não se desprende, mas permanece parcialmente aderido ao envoltório seminal (Fig. 6e-f), não protegendo o ápice radicular. O hipofilo cotiledonar laminar se alonga, mas parte do cotilédone (hiperfilo) permanece dentro da semente (Fig. 6e, g), com função haustorial. Em estágio posterior de desenvolvimento, observa-se o epicótilo extremamente reduzido, a partir do qual se originam as raízes adventícias e as folhas (Fig. 6h-i). A raiz primária aborta (Fig. 6h-i).

O desenvolvimento pós-seminal de *Xyris fallax* se diferencia porque, após a ruptura do opérculo (Fig. 7a) e protrusão do eixo embrionário (Fig. 7b), o hipofilo cotiledonar não se alonga, apenas os lobos da bainha do cotilédone se desenvolvem protegendo o epicótilo curto, a partir do qual já se inicia a formação das primeiras folhas, bem próximas à semente (Fig. 7c-d). O opérculo se desprende do envoltório seminal, ficando sobre o ápice radicular (Fig. 7d). A raiz primária inicia seu desenvolvimento somente depois que as primeiras folhas já estão formadas, mas logo aborta (Fig. 7f-g), sendo substituída por raízes adventícias (Fig. 7h-i).

Sob microscopia eletrônica de varredura observa-se claramente a ruptura do envoltório seminal e protrusão do eixo embrionário (Fig. 8a-b). Logo em seguida, os lobos da bainha do cotilédone se desenvolvem, protegendo o ápice caulinar, onde começam a se formar as primeiras folhas (Fig. 8c-e). Os lobos da bainha do cotilédone apresentam tricomas nas suas

margens (Fig. 8d-e, g, i). O colar de rizóides diferencia-se apenas após a formação das primeiras folhas, na região de transição entre hipocótilo-raiz (Fig. 8f-h), seguido do desenvolvimento da raiz primária (Fig. 8g, i).

O meristema apical caulinar e a formação dos primeiros primórdios foliares podem ser observados sob microscopia de luz (Fig. 9a-e). Observa-se também, sob microscopia de luz, que apenas o tégmen se rompe na germinação formando o opérculo, enquanto a testa permanece aderida ao envoltório seminal na região micropilar (Fig. 9e-f). O alongamento do hipofilo cotiledonar é limitado e o hiperfilo permanece no interior da semente, com função haustorial (Fig. 9a-f). Do epicótilo reduzido originam-se as folhas em roseta (Fig. 9f-h) e as raízes adventícias (Fig. 9i).

Evolução de caracteres

A reconstrução do estado de caráter ancestral mostra que o cotilédone do tipo compacto é o estado de caráter ancestral mais provável para Xyridaceae, estando presente também em Eriocaulaceae, seu grupo-irmão (Fig. 10). O hipofilo cotiledonar laminar é o estado de caráter mais comum em *Xyris*, estando presente em todas as espécies da seção *Nematopus* estudadas e na maioria das espécies incluídas na seção *Xyris*, tendo derivado a partir do cotilédone compacto. Como o tipo de cotilédone na seção *Pomatoxyris* não é conhecido, o hipofilo cotiledonar laminar pode ter tido uma única origem no ancestral mais recente de *Xyris*, com reversão ao cotilédone do tipo compacto em *X. fallax*, ou pode ter tido duas origens independentes no gênero, uma na seção *Xyris* e outra no ancestral mais recente da seção *Nematopus* (Fig. 10).

Discussão

Aspectos ecológicos da germinação

A reprodução via sementes se mostrou eficaz em todas as espécies estudadas pertencentes à seção *Xyris*, e em *X. savanensis* (96%) e *X. asperula* (91%), pertencentes à seção *Nematopus*. Alta porcentagem de germinação também foi observada em sementes de *X. platystachia* (98%) por Kraus et al. (1994). De acordo com Wanderley (1992) algumas espécies do gênero apresentam reprodução via sementes mais eficiente que a vegetativa, principalmente as espécies que formam touceiras pouco extensas, com rizomas laterais curtos. Dentre as espécies analisadas, as sementes de *Xyris obtusiuscula* (3%) e *X. pterygoblephara* (4%) foram as que apresentaram as mais baixas porcentagens de germinação, o que foi verificado também em *X. nubigena* (2%) por Kraus et al. (1994), que interpretaram esse valor como uma baixa capacidade de reprodução sexuada da espécie. Segundo Wanderley (1992) algumas espécies de *Xyris* que apresentam baixa porcentagem de germinação de sementes podem deter um eficiente mecanismo de reprodução vegetativa. No entanto, *Xyris asperula*, *X. macrocephala* e *X. fallax* aqui estudadas apresentaram alta porcentagem de germinação e formam densas touceiras (Wanderley 1992), enquanto que espécies de *X. pterygoblaphara* e *X. obtusiuscula* apresentaram baixa porcentagem de germinação e não formam touceiras (Wanderley 1992), o que indica que não há relação entre hábito e capacidade de propagação vegetativa ou reprodutiva.

A maioria das espécies de *Xyris* apresenta rápida curva de germinação, principalmente as que ocupam áreas de campos úmidos como *Xyris macrocephala*, *X. jupicai* e *X. savanensis*, o que pode ser explicado pelo fato de a alta umidade interferir diretamente diminuindo as flutuações de temperatura do solo (Egley 1986) e favorecendo o aumento da porcentagem de germinação em função do tempo. Estudo de germinação envolvendo oito espécies de *Xyris* de campos rupestres sob diferentes condições de luz, oxigênio e temperatura indicou que as sementes são fotoblásticas positivas e apresentam capacidade de germinar em condições de

hipoxia e intolerância a altas temperaturas quando embebidas, sendo 25°C a temperatura ótima de germinação para a maioria das espécies estudadas (Giorni et al. 2018). A exigência de luz para a germinação e a capacidade de germinar sob condições de hipoxia podem ser vistas como estratégias adaptativas para as espécies se reproduzirem em ambientes abertos expostos à luz solar direta, como os campos rupestres, e em solos mal drenados que acumulam água parada, onde a maioria das espécies de *Xyris* ocorrem (Giorni et al. 2018).

Desenvolvimento pós-seminal

As plântulas possuem morfologia distinta dentre as famílias de Poales, o que dificulta o emprego de terminologias às estruturas e o estabelecimento de homologias (Tillich 2007). Mesmo em Xyridaceae, observam-se denominações diferentes para as mesmas estruturas da plântula, o que dificulta seu reconhecimento.

As etapas do desenvolvimento pós-seminal são semelhantes na maioria das espécies de *Xyris* estudadas. Com a germinação das sementes ocorre a emergência do eixo embrionário, que em outras espécies de *Xyris* foi denominado de estrutura tubular (Kraus et al. 1994). Posteriormente, na base do eixo embrionário diferencia-se o hipocótilo apresentando um colar de rizóides em sua extremidade, estrutura descrita por Kraus et al. (1994) como eixo hipocotilar com um disco ou colar com raízes adventícias. Os rizóides são diferenciados dos pêlos radiculares pelo maior comprimento, densidade e/ou longevidade (Tillich 2007) e estão presentes também em Eriocaulaceae (Ramaswamy et al. 1981; Scatena et al. 1993, 1996) e na maioria das famílias de Poales, com exceção de Rapateaceae e *Orectanthe* (Xyridaceae). Nesse último gênero o colar de rizóides está ausente provavelmente porque a plântula inicia seu desenvolvimento sob a testa, sendo apenas os eofilos distais projetados para fora da semente, que é alada (Tillich 2007). Em Eriocaulaceae a raiz primária não se desenvolve (Tillich 2007; Kraus et al. 1996; Scatena et al. 1993; Dugarte et al. 2015), enquanto que em

Orectanthe (Tillich 2007) e em espécies de *Xyris*, conforme aqui observado, a raiz primária se forma, mas apresenta crescimento limitado, sendo abortada precocemente.

Dentre as Poales, a degeneração da raiz primária é encontrada onde o opérculo permanece fixo sobre o ápice radicular após a germinação, como descrito em Eriocaulaceae (Kraus et al. 1996; Scatena et al. 1993; Dugarte et al. 2015), em *Rapatea* e *Cephalostemon* (Rapateaceae) e em outras monocotiledôneas como *Sarcophrynium* (Maranthaceae, Zingiberales) (Tillich 1995). Assim, o ápice da raiz coberto por uma rígida estrutura como o opérculo não é capaz de penetrar no solo (Scatena et al. 1993). Diante disso, o abortamento da raiz primária pode ser compensado pelo desenvolvimento de numerosos rizóides na região do colar que passam a desempenhar funções de absorção e/ou fixação (Tillich 1995), seguido do desenvolvimento das raízes adventícias.

Observou-se que as sementes de *Xyris* embebidas mostraram-se pegajosas, assim como relatado em espécies de *Paepalanthus* (Eriocaulaceae) por Kraus et al. (1996), que sugerem a presença de substâncias mucilaginosas, porém sem descrever o local de produção dessas substâncias. Ainda de acordo com Kraus et al. (1996), substâncias mucilaginosas possibilitam a adsorção de água, podendo representar adaptação para a dispersão e/ou germinação das sementes em seu habitat. Como em espécies de Eriocaulaceae (Scatena et al. 1993) e de *Xyris* a raiz primária não produz mucilagem para facilitar sua penetração no solo, abortando no início do desenvolvimento, atribui-se às células da epístase a produção de tal secreção. A epístase foi reportada em sementes de Xyridaceae e Eriocaulaceae e corresponde a remanescentes do nucelo entre o embrião e o envoltório seminal, na região do opérculo (Nardi e Oriani, capítulo 1). As células da epístase parecem ter atividade metabólica durante as fases iniciais do desenvolvimento da plântula, secretando mucilagem que protege o eixo embrionário em desenvolvimento. A epístase também está presente em espécies de Liliaceae

(Asparagales), cujo exsudato provavelmente tem função na prevenção de patógenos e dessecação do embrião e do endosperma (Tilton 1980).

Chama-se atenção para o fato de que o desenvolvimento das plântulas de *Xyris fallax* diferenciou-se do das demais espécies estudadas pelas folhas se desenvolverem precocemente, antes da diferenciação do colar de rizóides e da formação das raízes adventícias. Isso pode ser estar relacionado com o fato de que nessa espécie não ocorre o desenvolvimento do hipofilo cotiledonar laminar, que também é fotossintetizante, fazendo o papel das folhas nas outras espécies de *Xyris* em que essa estrutura está presente. Em *Xyris fallax* o cotilédone é compacto, apenas com os lobos da bainha desenvolvidos, os quais envolvem o epicótilo e protegem os primórdios foliares. Isso nos possibilita inferir que existem pelo menos dois tipos de desenvolvimento pós-seminal no gênero, sendo o segundo tipo relatado em *Xyris* pela primeira vez.

Opérculo: origem e função

O opérculo é encontrado em Xyridaceae (Oriani e Scatena 2014; Nardi et al. 2015) e em Eriocaulaceae (Scatena et al. 1993, 1996, Kraus et al. 1996; Coan e Scatena 2004; Coan et al. 2007a, b, 2010; Dugarte et al. 2015) dentre as Poales, ocorrendo também em cerca de 25 famílias de monocotiledôneas como Araceae (Alismatales), Arecaceae (Arecales), Philydraceae e Pontederiaceae (Commelinales) (Johri 1984). Em Poales, o opérculo foi reportado também em Typhaceae (Kerner e Oliver 1895) e Rapateaceae (Tillich 2007), mas sem a descrição de sua origem e funcionalidade. O opérculo pode variar em sua ontogenia, estrutura, formato, função e mecanismo de abertura, o qual pode abrir-se através de linhas de fraqueza ao longo da lamela média ou através das paredes celulares (Johri 1984; Werker 1997). Conforme aqui observado, o opérculo nas sementes de *Xyris* pode se tornar totalmente destacado da semente ou permanecer aderido em um dos lados, como em Cartonemaceae

(Commelinales), no qual o plano de ruptura do opérculo às vezes é descontínuo, pois geralmente a camada interna do tegumento interno se rompe de um lado diferentemente do outro (Grootjen 1983).

Em estudos anatômicos do desenvolvimento da semente de *Xyris* (Nardi et al. 2015) e *Abolboda* (Oriani e Scatena 2014), o opérculo foi descrito como sendo formado pelas células do tegumento externo e interno, assim como observado em *Lemna* e *Spirodela* (Araceae) (Maheshwari 1954, 1956; Kapil e Vasil 1963). No entanto, no presente trabalho, observou-se que o opérculo em *Xyris* é formado apenas pelo tegumento interno (tégmen), assim como relatado em Eriocaulaceae (Coan e Scatena 2004; Coan et al. 2007a, b, 2010), enquanto que o tegumento externo (testa) permanece aderido ao envoltório seminal na região micropilar após a germinação.

A embebição da semente em *Xyris* ocorre antes da ruptura do opérculo e nossos testes de germinação com sementes com o opérculo impermeabilizado mostraram que este não atua na embebição, visto que a porcentagem de germinação das sementes com o opérculo impermeabilizado não diferiu estatisticamente daquela das sementes não manipuladas. Assim, acredita-se que em *Xyris* o opérculo, que é formado pelo endotégmen taninífero, não atue na germinação, mas tenha como funções prevenir o embrião do dessecação precoce, de danos mecânicos e de ataques microbianos, assim como relatado para espécies de Cactaceae (Bregman e Bouman 1983), que também crescem em solos abertos e expostas à alta luminosidade, com a diferença de que nessas espécies o opérculo é formado pela testa taninífera.

Cotilédone: definição dos estados de caráter e sua evolução em *Xyris*

O cotilédone é uma estrutura que apresenta diversos estados de caráter em Poales, podendo ser analisada em um contexto evolutivo. O cotilédone, que possui origem embrionária,

apresenta uma região denominada hipofilo, que é a parte basal sempre bifacial do cotilédone, e outra região denominada hiperfilo, que é a parte distal ao hipofilo bifacial (Tillich 2007).

O hipofilo cotiledonar pode aparecer em três formas principais: como uma pequena bainha cotiledonar que envolve o nó cotiledonar (**cotilédone compacto**), como ocorre na maioria da Poales; pode se expandir, formando uma estrutura de assimilação semelhante a uma lâmina (**hipofilo cotiledonar laminar**), como encontrado na maioria de espécies de *Xyris* (Xyridaceae) e em *Pitcairnia* (Bromeliaceae) dentre as Poales, e em outras monocotiledôneas como *Philodendron*, *Caladium* (Araceae) (Arecales) e *Costus* (Costaceae, Zingiberales); ou desenvolver um **coleóptilo**, como observado em Cyperaceae, Ecdiocoleaceae, Joinvilleaceae, Poaceae, Restionaceae e Mayacaceae dentre as Poales, e em outras monocotiledôneas como Araceae, Arecaceae (Alismatales), Anthericaceae, Colchicaceae (Liliales), Hypoxidaceae (Asparagales) e Marantaceae (Zingiberales) (Tillich 2007; Nardi e Oriani, capítulo 3).

Já o hiperfilo cotiledonar, que é unifacial, dependendo das diferenciações funcionais ou especializações, pode aparecer de diferentes formas: **haustorial**, permanecendo completamente no interior da semente, como na maioria das famílias de Poales; se diferenciar em **apócole**, como em Arecaceae e Anthericaceae; ou **fanerômero**, como nas restiídeas, em Typhaceae, Juncaceae e Thurniaceae dentre as Poales, e em outras monocotiledôneas como Alismataceae, Butomaceae, Juncaginaceae, Potamogetonaceae (Alismatales), Acoraceae (Acorales) e Hyacinthaceae (Asparagales); ou ainda desempenhar função de armazenamento em sementes sem endosperma de Araceae, em *Scheuchzeria* (Scheuchzeriaceae) (Alismatales) e em *Cyanastrum* (Tecophilaeaceae) (Asparagales) (Tillich 2007).

A bainha cotiledonar, que é a parte basal e sempre bifacial de um cotilédone, envolve o nó cotiledonar e protege a plúmula (Tillich 2007). *Orectanthe* apresenta bainha curta protegendo os primórdios foliares, assim como encontrado na maioria das famílias de Poales.

Em Eriocaulaceae o cotilédone também é compacto e reduzido à sua porção haustorial, que fica dentro da semente, não havendo o desenvolvimento dos lobos da bainha cotiledonar envolvendo os primórdios foliares (Tillich 2007), como ocorre em *Xyris fallax*. Os lobos da bainha cotiledonar podem ser definidos como sendo um par de apêndices logo abaixo da junção com o hiperfilo unifacial (Tillich 2007). Ocorrem também em Rapateaceae e em Flagellariaceae (Tillich 2007), tendo tido provavelmente várias origens independentes dentro da ordem.

Dentre as Poales, o cotilédone compacto está presente em Bromeliaceae, Rapateaceae, Eriocaulaceae, Restionaceae e Xyridaceae (*Orectanthe*) (Tillich 2007), além de *Xyris fallax* como aqui observado. Nossos resultados de reconstrução do estado de caráter ancestral mostram que o cotilédone compacto é o provável estado de caráter ancestral em Xyridaceae, a partir do qual teria derivado o hipofilo cotiledonar laminar. Tillich (2007) já havia hipotetizado que os diversos tipos de cotilédone evoluíram a partir do cotilédone compacto com bainha reduzida e hiperfilo haustorial. Essa bainha reduzida teria se desenvolvido ao longo da evolução, formando os lobos da bainha que envolvem os primórdios foliares (Tillich 2007), como observado em *Xyris fallax*, a primeira espécie a divergir na seção *Xyris*, como grupo-irmão das demais espécies da seção. Outro processo importante na evolução reportado por Tillich (2007) seria a expansão da bainha para formar uma estrutura semelhante a uma lamina, denominada hipofilo cotiledonar laminar, assim como encontrado na maioria das espécies da seção *Xyris* e em todas as espécies da seção *Nematopus*. Nas espécies da seção *Pomatoxyris* o tipo de cotilédone é desconhecido, mas se for do tipo hipofilo cotiledonar laminar, que é o estado de caráter mais comum em *Xyris*, a hipótese mais plausível é que esse teve uma única origem no ancestral mais recente do gênero, sendo homólogo nas três seções.

Conclusões

O opérculo não tem função no processo de germinação das sementes de *Xyris*, pois não atua como estrutura facilitadora da embebição; acredita-se que sua função seja prevenir o embrião do dessecamento precoce, de danos mecânicos e de ataques microbianos, uma vez que essas espécies ocorrem em solos abertos e expostas à alta luminosidade.

As espécies de *Xyris* estudadas não compartilham o mesmo padrão de desenvolvimento pós-seminal e o mesmo tipo de cotilédone. Enquanto a maioria das espécies estudadas apresenta hipofilo cotiledonar laminar, *Xyris fallax* (*Xyris* sect. *Xyris*) apresenta cotilédone compacto com os lobos da bainha desenvolvidos.

A evolução dos diferentes tipos de cotilédone em Xyridaceae se deu a partir do cotilédone do tipo compacto, do qual derivou o hipofilo cotiledonar laminar provavelmente no ancestral mais recente de *Xyris*, com reversão ao tipo compacto em *X. fallax*.

Agradecimentos

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (processos n.º. 160640/2014-8 e 168277/2014-0), FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo n.º. 2011/115536-3), e CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PNPD) pelo auxílio financeiro. Agradecemos também à Dra. Nara Furtado de Oliveira Mota pela identificação das espécies e ao Dr. Luis Felipe Daibes de Andrade pelo auxílio com as análises estatísticas.

Referências

- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw* 67: 1-48
- Bregman R, Bouman F (1983) Seed germination in Cactaceae. *Bot J Linn Soc* 86(4): 357-374
- Campbell LM (2008 onward) The Xyridaceae pages - an electronic monograph. <http://sweetgum.nybg.org/xyridaceae/>. Acessado 30 Jul 2018
- Campbell LM, Wanderley MGL, Silva GO (2009) Neotropical Xyridaceae. In: Milliken W, Klitgard B, Baracat A. (2009 onwards). Neotropikey – Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Xyridaceae.htm. Acessado 1 Jul 2018
- Carlquist S (1960) Anatomy of Guayana Xyridaceae: *Abolboda*, *Orectanthe* and *Achlyphila*. *Mem N Y Bot Gard* 10: 65-117
- Coan AI, Rosa MM, Scatena VL (2007a) Contribution to the embryology of *Leiothrix fluitans* (Eriocaulaceae: Poales). *Aquat Bot* 87: 155-160
- Coan AI, Rosa MM, Scatena VL (2007b) Embryology and seed development of *Syngonanthus caulescens* (Poir.) Ruhland (Eriocaulaceae – Poales). *Aquat Bot* 86: 148-156
- Coan AI, Scatena VL (2004) Embryology and seed development of *Blastocaulon scirpeum* and *Paepalanthus scleranthus* (Eriocaulaceae). *Flora* 199: 47-57
- Coan AI, Stutzel T, Scatena VL (2010) Comparative embryology and taxonomic considerations in Eriocaulaceae (Poales). *Feddes Repert* 121: 268-284.
- Doust AN, Conn BJ (1994) *Xyris* L. section *Xyris* (Xyridaceae) in Australia. *Aust Syst Bot* 7: 455-484

- Dugarte BAC, Escobar DFE, Scatena VL (2015) Morfología de semillas y desarrollo post-seminal de especies de *Comanthera* (Eriocaulaceae). *Rev Biol Trop* 63: 1127-1135
- Egely GH (1986) Stimulation of weed seed germination in soil. *Reviews of Weed Science* 2: 67-89
- Feder N, O'Brien TP (1968) Plant microtechnique: some principles and new methods. *Amer J Bot* 55(1): 123-142
- Gerrits PO, L Smid (1983) A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *J Microsc* 132: 81-85
- Giorni VT, Bicalho EM, Garcia QS (2018) Seed germination of *Xyris* spp. from Brazilian *campo rupestre* is not associated to geographic distribution and microhabitat. *Flora* 238: 102-109
- Govindappa DA (1955) Embryological studies in *Xyris pauciflora* Wild. *P Indian As-B* 42 :47-57
- Grootjen CJ (1983) Development of ovule and seed in *Cartonema spicatum* R. Br. (Cartonemataceae). *Aust J Bot* 31: 297-305
- Johansen DA (1940) Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York
- Johri DA (1984) Embryology of angiosperms. Springer-Verlag, Berlin
- Kapil RN, Vasil IK (1963) Ovule. In: Maheshwari P (ed) Recent advances in the embryology of angiosperms. *Int Soc Plant Morphol, Univ Delhi*, pp 41-68
- Kerner A, Oliver FW (1895) The natural history of plants. vols. 1, 2. Blackie & Son, London
- Kral (1988) The genus *Xyris* (Xyridaceae) in Venezuela and contiguous Northern South America. *Ann Mo Bot Gard* 75: 522-722

- Kral R (1998) Xyridaceae. In: Kubitzki K. (ed) The families and genera of vascular plants. IV. Flowering plants. Monocotyledons: Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). Berlin: Springer, pp 461-469
- Kraus JE, Sajo MG, Dias-Leme CL, Wanderley MGL (1994) Aspectos morfológicos do desenvolvimento pós-seminal em espécies de *Xyris* L. (Xyridaceae). *Hoehnea* 21: 29-38
- Kraus JE, Scatena VL, Lewinger ME, Trench KUS (1996) Morfologia externa e interna de quatro espécies de *Paepalanthus* Kunth (Eriocaulaceae) em desenvolvimento pós-seminal. *Bol Bot Univ São Paulo* 15: 45-53
- Maddison WP, Maddison DR (2018) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.4005. <http://mesquiteproject.org/>. Acessado 5 Fev 2018
- Maheshwari SC (1954) The embryology of *Wolffia*. *Phytomorphology* 4: 355-365
- Maheshwari SC (1956) The endosperm and embryo of *Lemna* and systematic position of the Lemnaceae. *Phytomorphology* 6: 51-55
- Mota NFO (2014) Filogenia e diversidade de Xyridaceae Neotropicais, com ênfase no gênero *Xyris*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais
- Nardi KO, VL Scatena, Oriani A (2015) Development of ovule, fruit and seed of *Xyris* (Xyridaceae, Poales) and taxonomic considerations. *Bot J Linn Soc* 177: 619-628
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373
- Oriani A, Scatena VL (2014) Ovule, fruit and seed development in *Abolboda* (Xyridaceae, Poales): implications for taxonomy and phylogeny. *Bot J Linn Soc* 175: 144-154
- R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. Acessado 3 Jul 2018

- Ramaswamy SN, Swamy BGL, Arekal GD (1981) From zygote to seedling in *Eriocaulon robusto-brownianum* Ruhl. (Eriocaulaceae). Beitr Biot Pfl 55:179- 188
- Ranal MA, Santana DG (2006) How and why to measure the germination process? Rev Bras Bot 29: 1-11
- Rudall PJ, Sajo MG (1999) Systematic position of *Xyris*: flower and seed anatomy. Int J Plant Sci 160(4): 795-808
- Sajo MG, Rudall PJ (1999) Systematic vegetative anatomy and ensiform leaf development in *Xyris* (Xyridaceae). Bot J Linn Soc 130: 171-182
- Scatena VL, Bouman F (2001) Embryology and seed development of *Paepalathus* sect. *Actinocephalus* (Koern.) Ruhland (Eriocaulaceae). Plant Biol 3: 341-350
- Scatena VL, Menezes NL, Stützel T (1993) Embryology and seedling development in *Syngonanthus rufipes* Silveira (Eriocaulaceae). Beitr Biol Pflanzen 67: 333-343
- Scatena VL, Lemes-Filho JP, Lima AAA (1996) Morfologia do desenvolvimento pós-seminal de *Syngonanthus elegans* e *S. niveus* (Eriocaulaceae). Acta Bot Bras 10: 85-91
- Souza TVS, Voltolini CH, Santos M, Paulilo MTS (2012) Water absorption and dormancy-breaking requirements of physically dormant seeds of *Schizolobium parahyba* (Fabaceae - Caesalpinioideae). Seed Sci Res 22: 169-176
- Tillich H-J (1994) Untersuchungen zum Bau der Keimpflanzen der Philydraceae und Pontederiaceae (Monocotyledoneae). Sendtnera 2: 171-186
- Tillich HJ (1995) Seedlings and systematic in monocotyledons. In: Rudall PJ; Cribb PJ; Cutler DF and Humphries CJ (eds) Monocotyledons: systematic and evolution. Roy Bot Gard, Kew, pp 303-352
- Tillich, HJ (2000) Ancestral and derived character states in seedlings of Monocotyledons. In: Wilson KL, Morrison DA (ed) Monocots: Systematics and Evolution. Melbourne, Csiro, pp 221-229

- Tillich HJ (2007) Seedling diversity and the homologies of seedling organs in the order Poales (Monocotyledons). *Ann Bot* 100: 1413-1429
- Tilton VR (1980) The nucellar epiderms and micropyle of *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) with a review of these structures in other taxa. *Can J Bot* 58: 1872-1884
- Zuur AF, Ieno EN, Walker NJ, Saveliev AA, Smith GM (2009) Mixed effects models and Extensions with Ecology in R. *Statistics for Biology and Health*. New York, Springer
- Wanderley MGL (1992) Estudos taxonômicos no gênero *Xyris* L. (Xyridaceae) da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo
- Wanderley MGL (2011) Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Xyridaceae. *Bol Bot Univ São Paulo* 29: 69-134
- Weinzieher S (1914) Beitrage sur Entwicklungsgeschichte von *Xyris indica*. *Flora* 106: 393-432
- Werker E (1997) Seed anatomy. *Encyclopedia of plant anatomy*. Bd. 10. Berlin, Grebrüder Borntreager

ILUSTRAÇÕES

Fig 1 Curvas acumuladas de germinação ao longo do tempo em diferentes espécies de *Xyris*. Porcentagens de germinação ajustadas em relação ao número total de sementes germinadas para cada espécie. **a**, Espécies da seção *Xyris*, com placentação parietal. **b**, Espécies da seção *Nematopus*, com placentação central-livre. **c**, Espécies da seção *Nematopus*, com placentação basal.

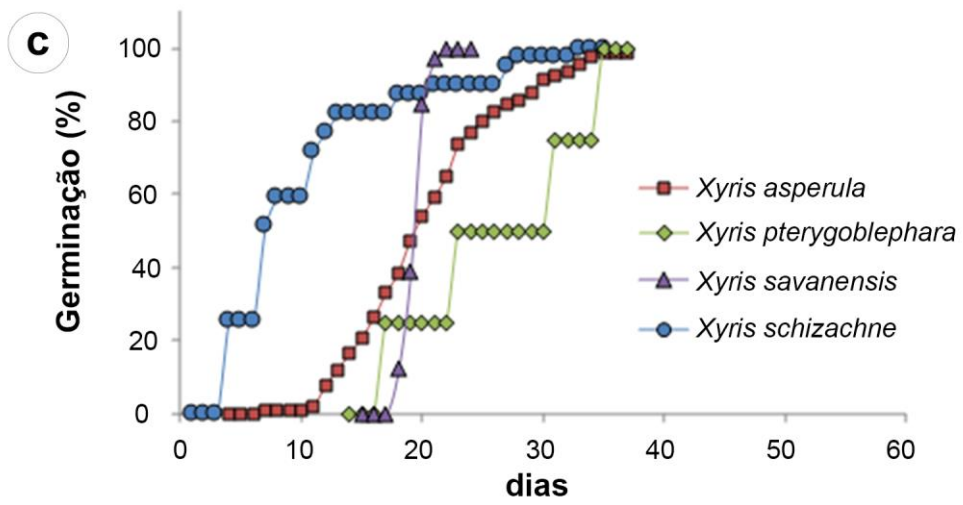
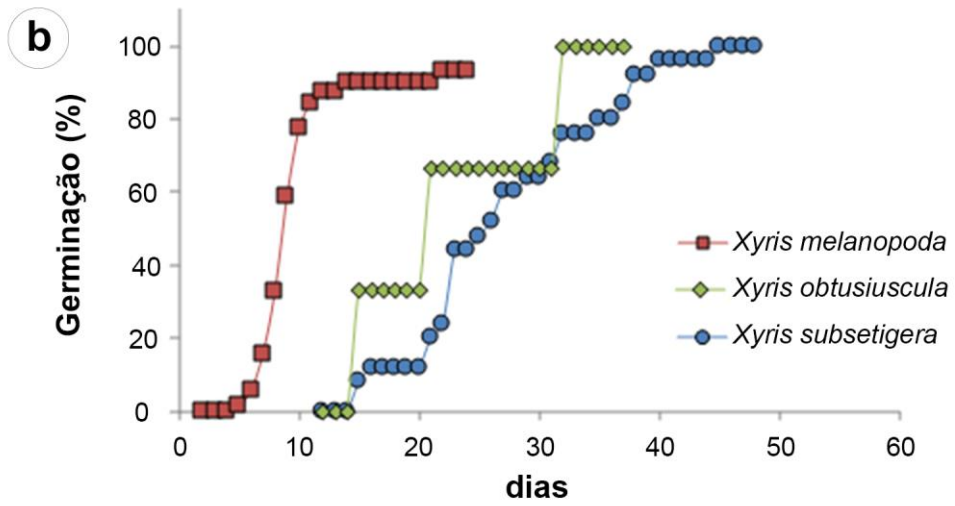
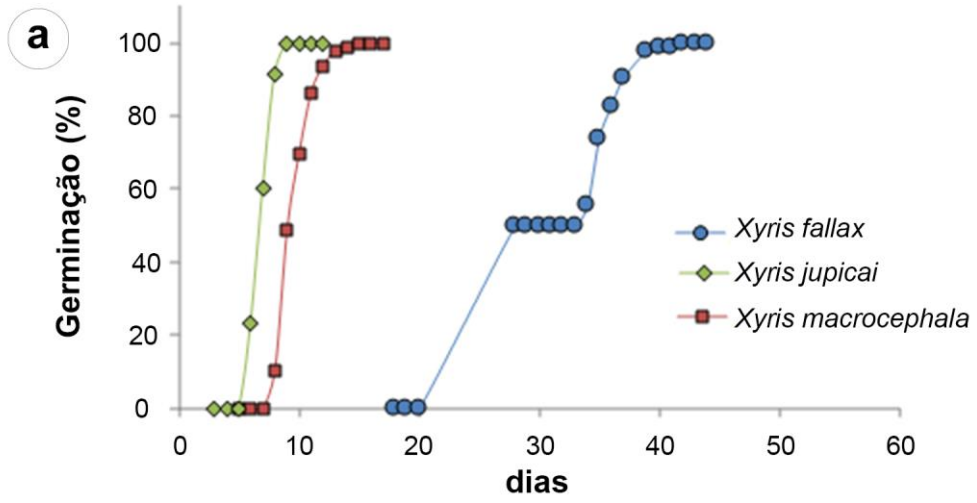


Fig 2 Efeito da impermeabilização do opérculo na germinação de sementes de *Xyris*. A diferença no percentual de germinação entre os tratamentos (sementes com opérculo impermeabilizado x sementes não manipuladas (controle) foi comparada por GLMM com distribuição binomial ($\alpha = 0.05$).

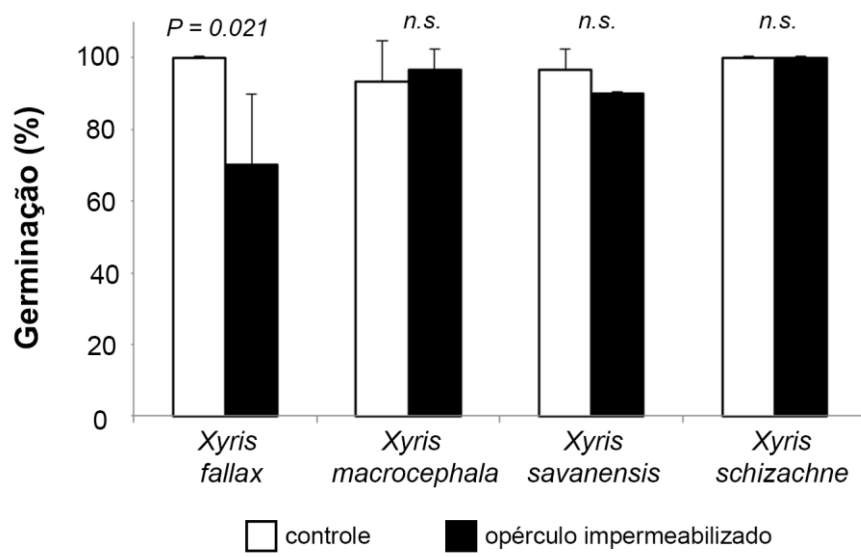


Fig 3 Desenvolvimento pós-seminal de *Xyris asperula*, sob estereomicroscópio. **a**, Início da germinação da semente com a protusão do eixo embrionário e abertura do opérculo. **b**, Alongamento do eixo embrionário. **c**, Alongamento do hipofilo cotiledonar laminar. **d**, Diferenciação do colar de rizóides. **e**, Formação de raiz primária. **f**, Formação da primeira folha e da primeira raiz adventícia. **g-h**, Desenvolvimento da segunda e terceira folhas, respectivamente. **i**, Plântula desenvolvida apresentando hipofilo cotiledonar laminar alongado, quatro folhas dispostas em roseta e diversas raízes adventícias. Cabeça de seta: opérculo. Seta: protusão do eixo embrionário. cr: colar de rizóides. ee: eixo embrionário. f: folha. hcl: hipofilo cotiledonar laminar. ra: raiz adventícia. Barras: a-c: 0,20 mm; d-e: 0,40 mm; f-i: 0,80 mm.

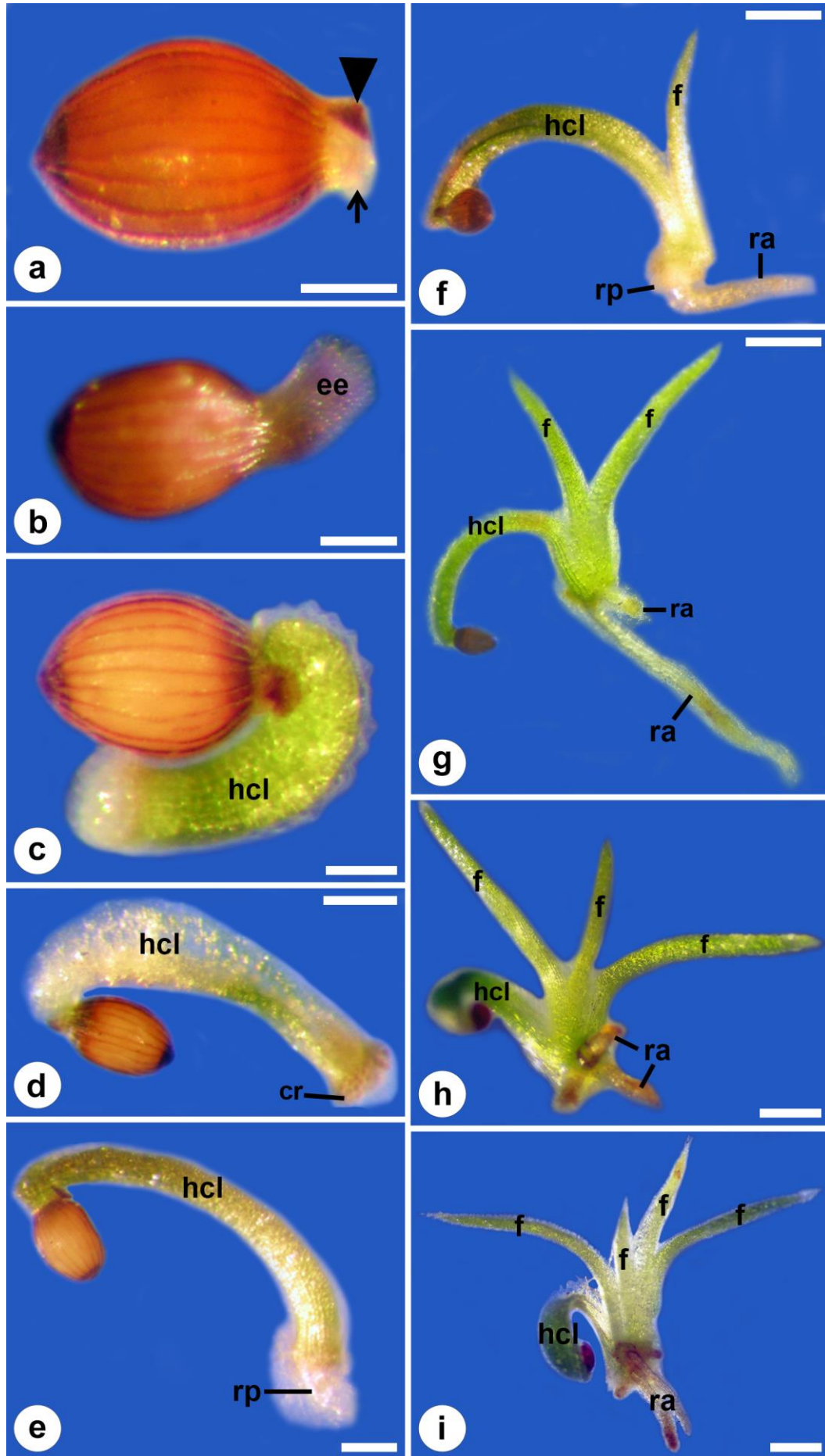


Fig. 4 Desenvolvimento pós-seminal de *Xyris schizachne* (a-d) e *X. macrocephala* (e-f), sob estereomicroscópio. **a**, Semente madura germinada evidenciando a protrusão do eixo embrionário. **b**, Alongamento do hipofilo cotiledonar laminar. Em **a** e **b** nota-se o opérculo. **c**, Diferenciação do colar de rizóides e formação da raiz primária. **d**, Formação da primeira folha. **e**, Desenvolvimento da segunda folha e da primeira e segunda raízes adventícias. **f**, Plântula desenvolvida apresentando hipofilo cotiledonar laminar alongado, três folhas dispostas em roseta e raiz adventícia. Cabeça de seta: opérculo. Seta: protusão do eixo embrionário. cr: colar de rizóides. ee: eixo embrionário. f: folha. hcl: hipofilo cotiledonar laminar. ra: raiz adventícia. Barras: a-c: 0,20 mm; d: 0,40 mm; e-f: 0,80 mm.

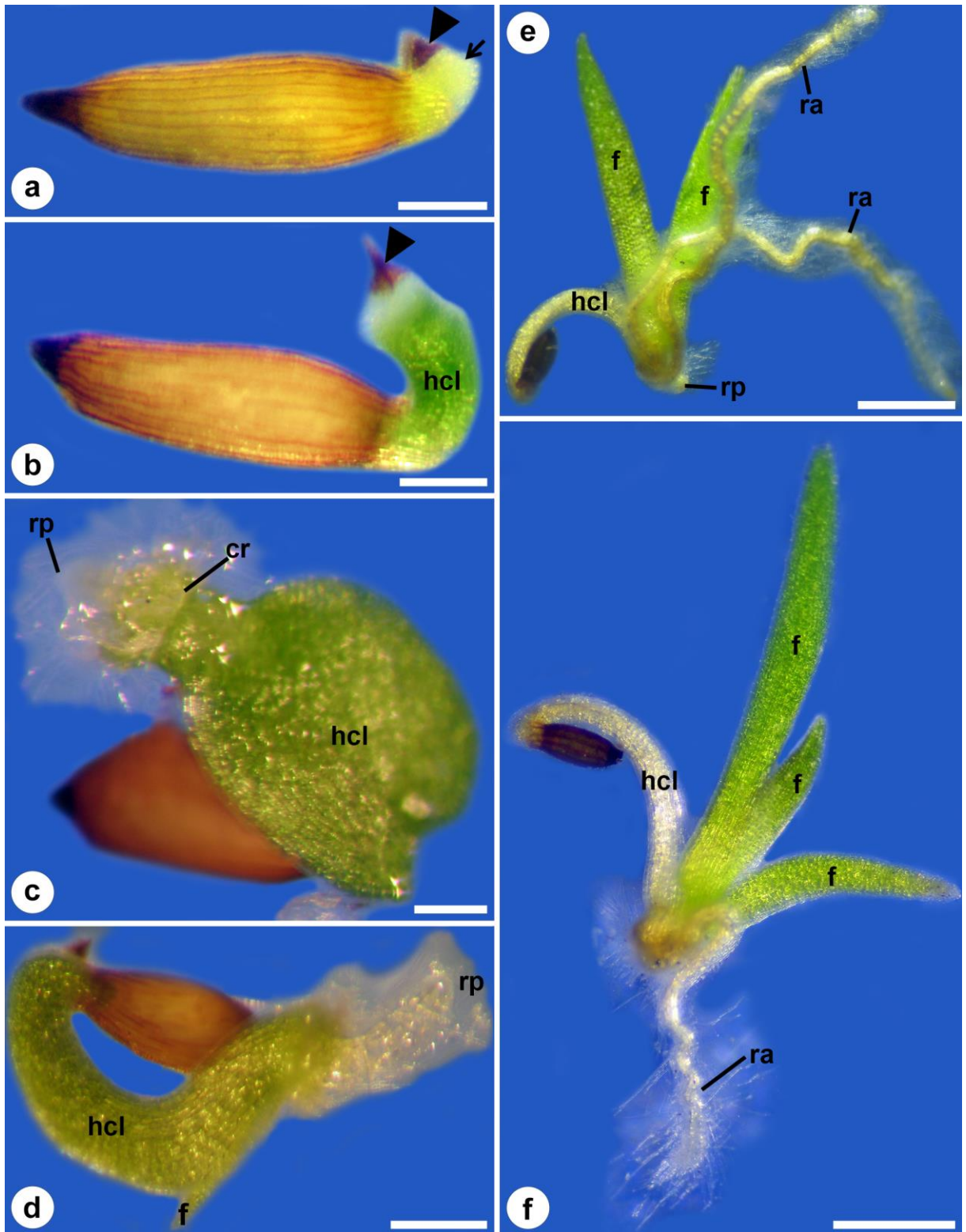


Fig 5 Desenvolvimento pós-seminal de *Xyris jupicai*, sob microscopia eletrônica de varredura. **a**, Germinação da semente com a protrusão do eixo embrionário. **b**, Formação do hipofilo cotiledonar laminar. **c**, Início da diferenciação do colar de rizóides na extremidade do hipocótilo. **d**, Hipofilo cotiledonar laminar em desenvolvimento e colar de rizóides. Em **c** e **d** é possível observar também que o opérculo permanece fixo sobre o ápice da raiz primária. **e**, Formação do primeiro primórdio foliar envolvido pelos lobos da bainha do cotilédone. **f-h**, Plântulas em estágios sucessivos de desenvolvimento, mostrando o alongamento do hipofilo cotiledonar e o desenvolvimento do colar de rizóides e da primeira folha. **i-k**, Detalhes mostrando a inserção do hipofilo cotiledonar laminar no caule, a formação da raiz primária e o hipocótilo com o colar de rizóides desenvolvido na sua extremidade. Cabeça de seta: opérculo. cr: colar de rizóides. ee: eixo embrionário. f: folha. h: hipocótilo. hcl: hipofilo cotiledonar laminar. lb: lobos da bainha do cotilédone. rp: primária. Barras: a-b: 90 μm ; c, e, i-j: 40 μm ; d, f: 90 μm ; g-h: 225 μm ; k: 60 μm

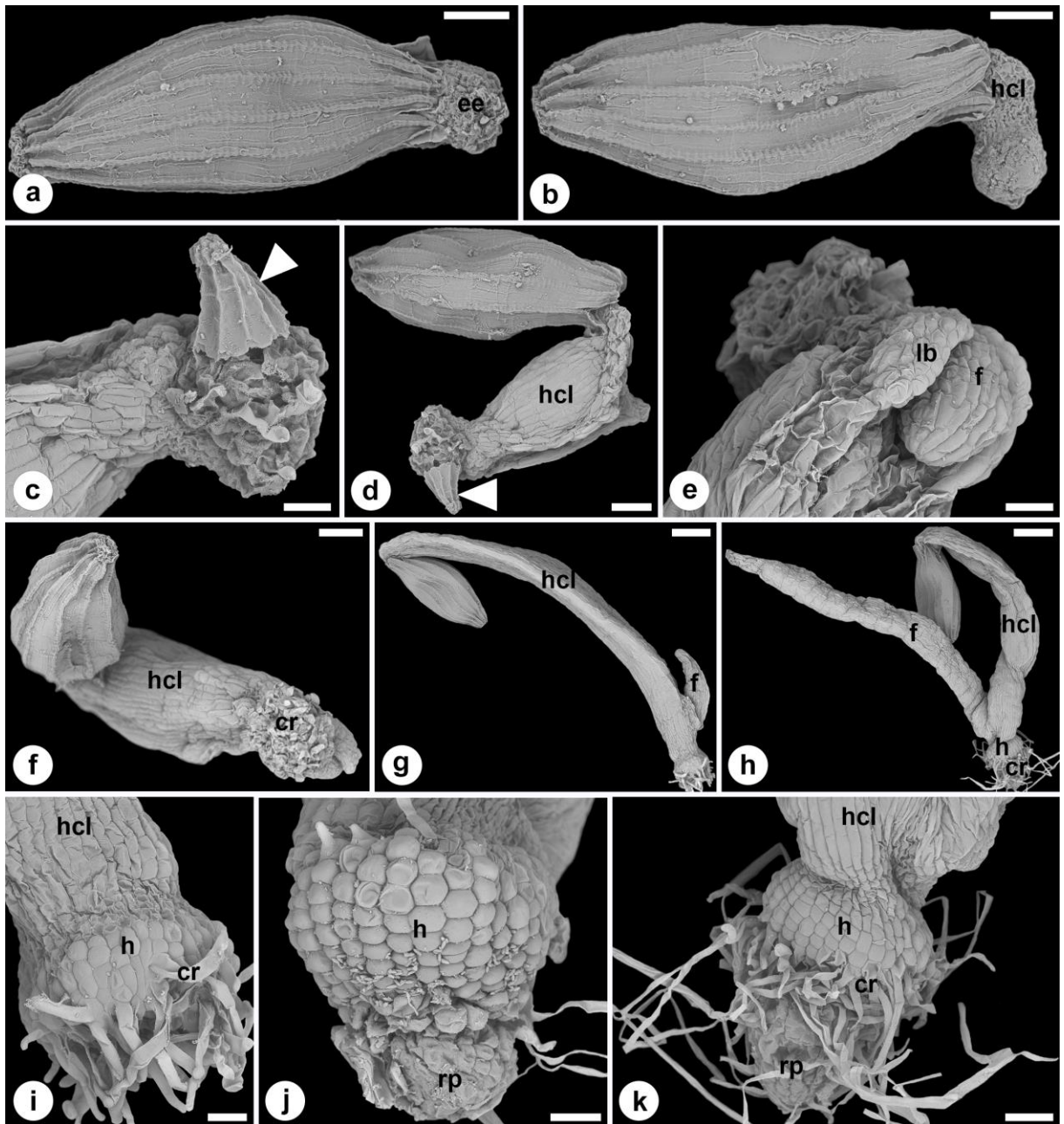


Fig 6 Desenvolvimento pós-seminal de *Xyris schizachne* (a-h) e *X. macrocephala* (i-j), sob microscopia de luz. **a**, Embrião reduzido em relação ao tamanho da semente. **b**, Início da germinação da semente com a protrusão do eixo embrionário e abertura do opérculo. **c**, Formação da raiz primária e do hipocótilo. **d**, Diferenciação do colar de rizóides. **e**, Alongamento do hipofilo cotiledonar laminar. **f**, Formação do primórdio foliar a partir do epicótilo. Em **d**, **e** e **f** observa-se o opérculo preso parcialmente ao envoltório seminal. **g**, Plântula ligada à semente apresentado hipofilo cotiledonar laminar alongado. **h**, Em estágio posterior de desenvolvimento, nota-se o hipofilo cotiledonar laminar alongado, três folhas, colar de rizóides desenvolvido, raiz primária e primeira raiz adventícia. **i**, Detalhe do desenvolvimento da primeira raiz adventícia a partir do hipocótilo. Cabeça de seta: opérculo. cr: colar de rizóides. e: epicótilo. f: folha. h: hipocótilo. hcl: hipofilo cotiledonar laminar. ra: raiz adventícia. te: tégmen. Barras: a, i-j: 80 µm; b-c, e-f: 20 µm; d, g: 40 µm; h: 160 µm.

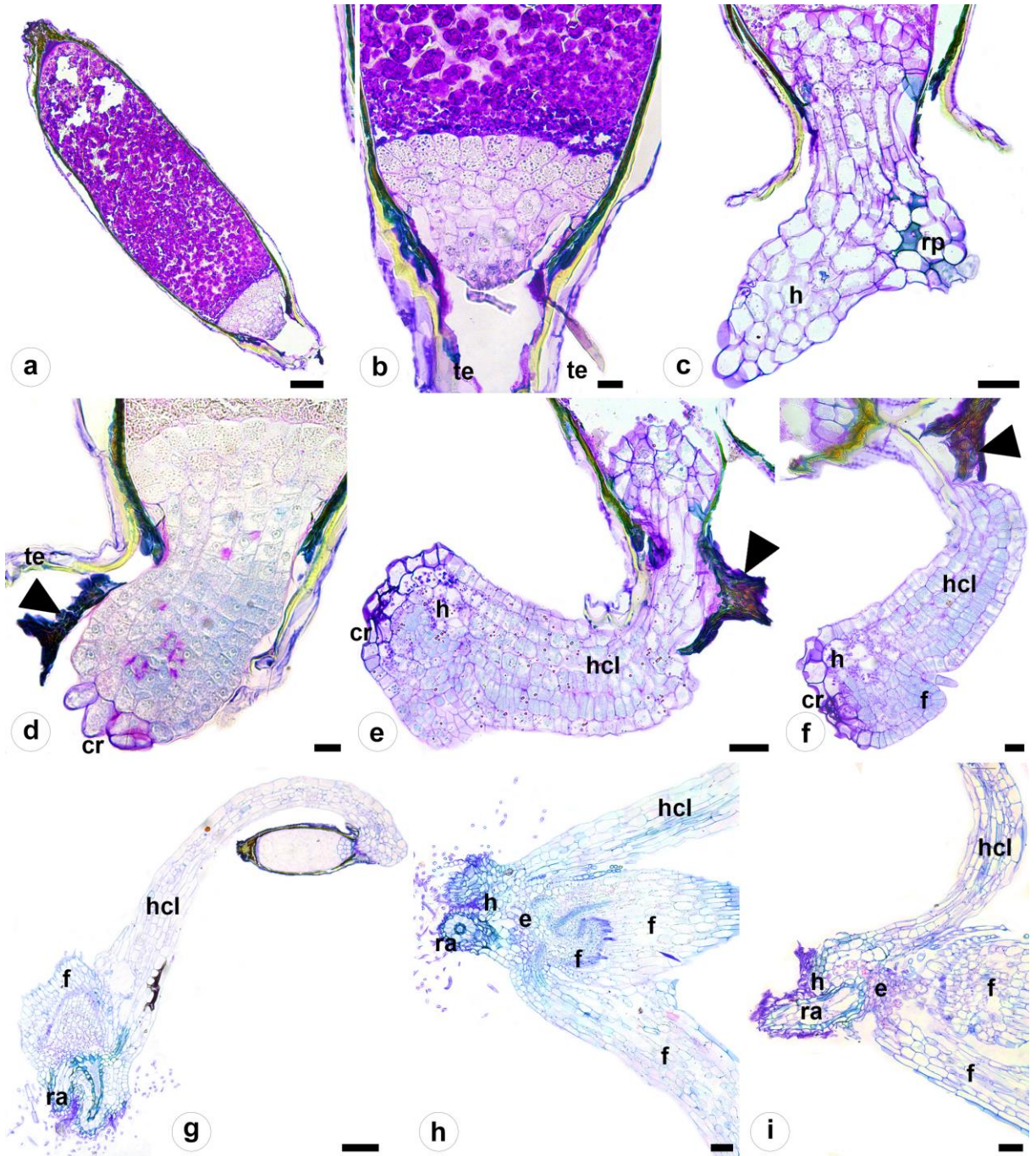


Fig 7 Desenvolvimento pós-seminal de *Xyris fallax*, sob estereomicroscópio. **a**, Germinação da semente com a protrusão do eixo embrionário. **b**, Alongamento do eixo embrionário, que empurra opérculo. **c**, Formação dos lobos da bainha do cotilédone e da primeira folha. **d**, Formação da segunda folha. **e**, Diferenciação do colar de rizóides. **f**, Formação da raiz primária. **g-h**, Em estágios posteriores de desenvolvimento, a plântula apresenta quatro folhas dispostas em roseta e a formação da primeira raiz adventícia. **i**, Detalhe da raiz primária, da primeira raiz adventícia e dos lobos da bainha do cotilédone desenvolvidos. Cabeça de seta: opérculo. Seta: protrusão do eixo embrionário. ee: eixo embrionário. f: folha. lb: lobos da bainha do cotilédone. ra: raiz adventícia. Barras: a-f, i: 0,4 mm. g-h: 0,8 mm.

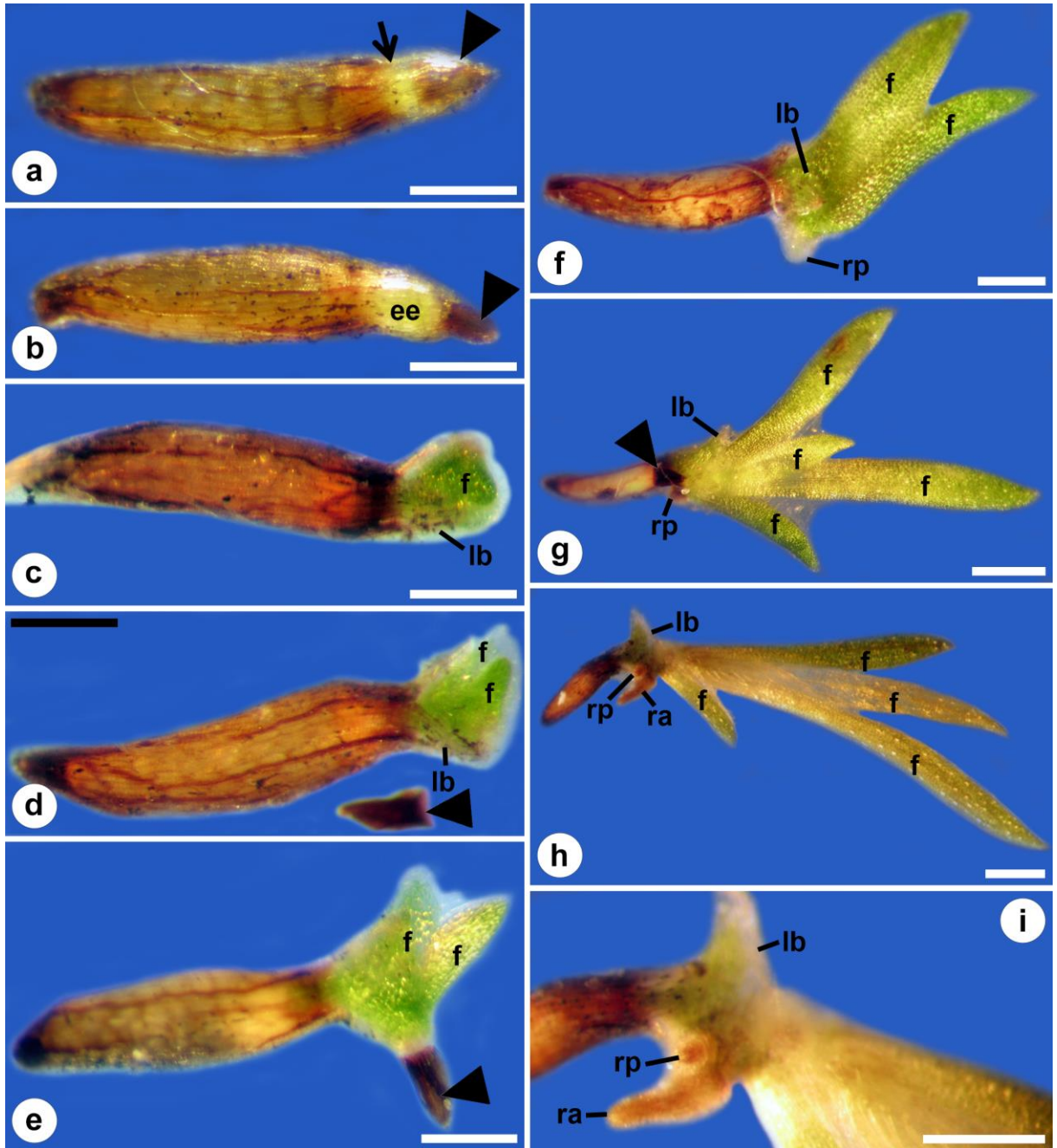


Fig 8 Desenvolvimento pós-seminal de *Xyris fallax*, sob microscopia eletrônica de varredura. **a**, Germinação da semente com a protrusão do eixo embrionário. **b**, Formação do hipocótilo e desprendimento do opérculo da semente. **c-f**, Detalhes mostrando alongamento limitado do hipocótilo, desenvolvimento dos lobos da bainha do cotilédone apresentando tricomas nas margens e diferenciação do colar de rizóides na extremidade do hipocótilo. Em **d** e **e** é possível observar também a formação da primeira folha. **g**, Lobos da bainha envolvendo as primeiras folhas, colar de rizóides e raiz primária. **h**, Detalhe do colar de rizóides. **i**, Em estágio posterior de desenvolvimento, plântula apresentando colar de rizóides, folhas e lobos da bainha do cotilédone desenvolvidos. Cabeça de seta: opérculo. cr: colar de rizóides. ee: eixo embrionário. f: folha. h: hipocótilo. lb: lobos da bainha. rp: raiz primária. Barras: a, h: 150 μm ; b 180 μm ; c: 200 μm ; d-e: 60 μm ; f: 45 μm ; g: 120 μm ; i: 30 μm .

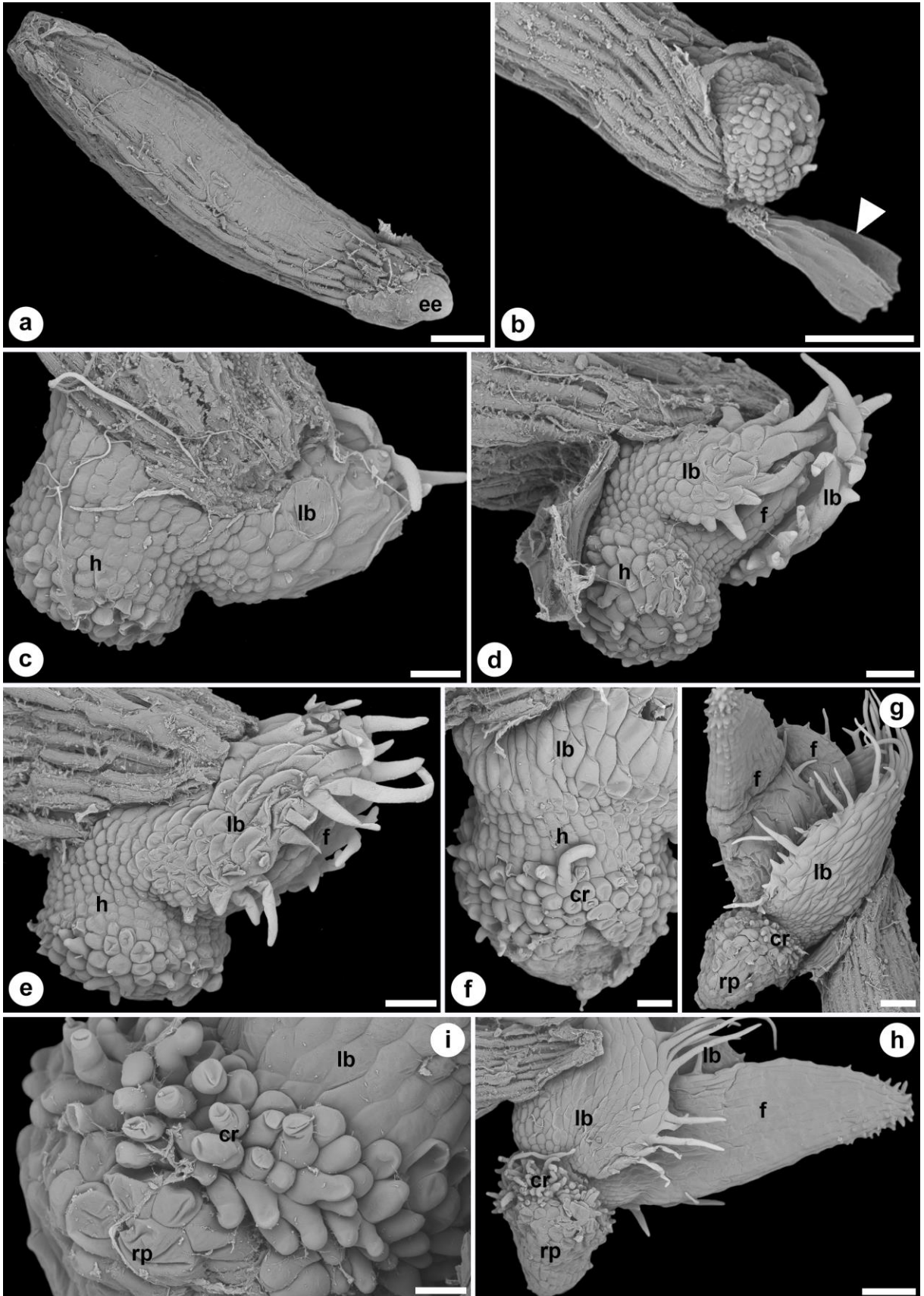


Fig 9 Desenvolvimento pós-seminal de *Xyris fallax*, sob microscopia de luz. a-c, Início do desenvolvimento da plântula, podendo-se observar o meristema apical caulinar na extremidade do eixo embrionário e o hiperfilo hastorial. d, Formação dos primeiros primórdios foliares e, Cotilédone compacto com lobos da bainha envolvendo os primórdios foliares; note o tegumento externo (testa) aderido à semente. f, Diferenciação do colar de rizóides, e desenvolvimento das folhas e dos lobos da bainha do cotilédone. g-h, Formação de folhas em roseta a partir do epicótilo reduzido. i, Detalhe do desenvolvimento da primeira raiz adventícia. Cabeça de seta: opérculo. *: meristema apical caulinar. cr: colar de rizóides. e: epicótilo. f: folha. h: hipocótilo. lb: lobos da bainha. ra: raiz adventícia. Barras: a-d: 20 µm; e, i: 40 µm; f-h: 80 µm.

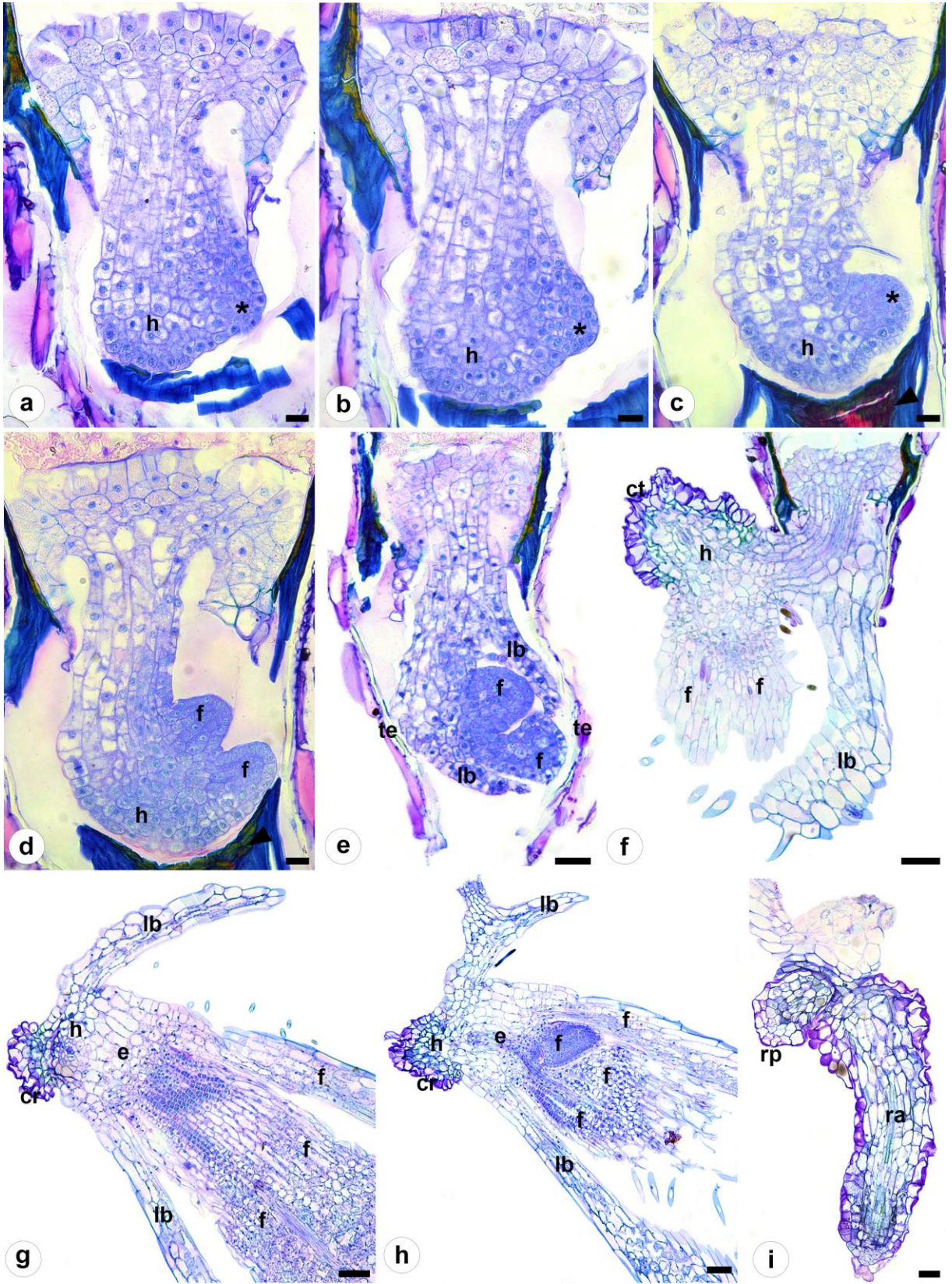


Fig 10 Otimização dos estados de caráter do cotilédone na filogenia de Xyridaceae obtida por Mota (2014), a partir de sequências de genes mitocondriais e plastidiais.

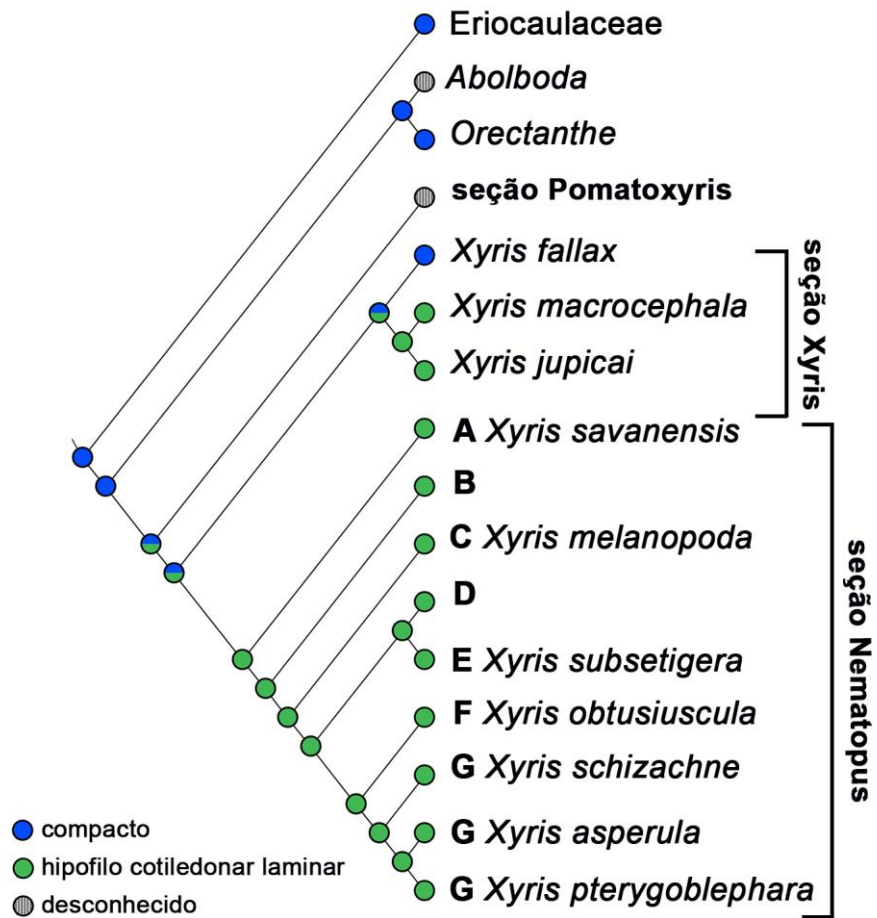


Tabela 1 Porcentagem de germinação ($n=100$) e tempo médio para surgimento das diferentes estruturas da plântula em espécies de *Xyris* (Xyridaceae)

Espécie	Germinação (%)	Tempo para início e final da germinação (dias)	Tempo médio (em dias) para surgimento das estruturas							
			Colar de rizóides	1ª folha	2ª folha	3ª folha	4ª folha	5ª folha	Raiz primária	1ª raiz adventícia
<i>Xyris</i> sect. <i>Xyris</i>										
<i>Xyris fallax</i>	92	28-42	4,30 ± 0,97	4,30 ± 0,97	4,30 ± 0,97	7,98 ± 2,93	8,75 ± 2,37	13,28 ± 5,41	9,21 ± 3,39	30,36
<i>Xyris jupicai</i>	95	6-9	5,85 ± 0,55	15,75 ± 0,35	*	*	*	*	16,77 ± 0,92	*
<i>Xyris macrocephala</i>	96	8-15	5,36 ± 0,67	23,04 ± 2,04	39 ± 3,04	58	*	*	12,28 ± 0,98	40,12 ± 3,71
<i>Xyris</i> sect. <i>Nematopus</i>										
<i>Xyris melanopoda</i>	70	5-37	3,67 ± 0,54	16,93 ± 0,68	*	*	*	*	8,38 ± 2,67	*
<i>Xyris obtusiuscula</i>	3	15-32	5,25 ± 0,35	11 ± 1,41	*	*	*	*	12,5	*
<i>Xyris subsetigera</i>	25	15-45	6,55 ± 1,97	11,85 ± 2,47	20,5 ± 6,36	*	*	*	9,25 ± 2,62	*
<i>Xyris asperula</i>	90	7-35	7,74 ± 1,95	17,21 ± 2,73	30,59 ± 7,12	46,12 ± 5,65	54	*	12,33 ± 2,49	25,08 ± 14,15
<i>Xyris pterygoblephara</i>	4	17-35	10	15	*	*	*	*	12	*
<i>Xyris savanensis</i>	96	18-22	4,02 ± 0,30	5,23 ± 0,29	15,50 ± 1,26	26,86 ± 2,98	37,65 ± 1,13	*	10,93 ± 1,02	19,03 ± 0,81
<i>Xyris schizachne</i>	39	4-33	5,51 ± 0,90	14,64	23,65 ± 4,45	41,5	*	*	10,77 ± 1,32	*

* estrutura não observada

Capítulo 3

Desenvolvimento pós-seminal em Mayacaceae: as sementes de *Mayaca* são operculadas e o cotilédone é do tipo compacto?

Kaire de O. Nardi e Aline Oriani

Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, CP 199,
13506-900 Rio Claro, SP, Brasil

✉ Kaire O. Nardi

Autor para correspondência: kairenardi@gmail.com

Destaques

- As sementes de Mayacaceae não são operculadas e apresentam baixa porcentagem de germinação.
- Ocorre aumento na porcentagem de germinação de sementes quando submetidas à secagem antes da embebição.
- A luminosidade influencia na morfologia da plântula.
- A morfologia da plântula de Mayacaceae suporta seu posicionamento no clado cyperídeo em Poales.

Resumo

Mayacaceae é uma família monogénérica, incluindo cerca de 4-10 espécies aquáticas ou anfíbias, de distribuição principalmente neotropical. Sua posição filogenética é incerta e a presença de opérculo micropilar em suas sementes ainda é controversa e carece de estudos investigativos. Neste trabalho analisamos a germinação de sementes sob diferentes condições de umidade, luz e temperatura e buscamos esclarecer a presença ou não do opérculo em *Mayaca fluavitis* e *M. sellowiana*. Também analisamos o desenvolvimento pós-seminal sob microscopia de luz e eletrônica de varredura, a fim de descrever as estruturas da plântula, interpretando-as em um contexto evolutivo, através de análise filogenética. A secagem das sementes antes da embebição e a alta disponibilidade de água e luz interferem positivamente na porcentagem de germinação. As sementes não são operculadas e o desenvolvimento pós-seminal difere do descrito na literatura. Quando as sementes germinam, o coleótilo cresce atravessando a micrópila, empurrando as células do tégmen, que secretam mucilagem. Posteriormente, ocorre o alongamento do mesocótilo (que corresponde ao epicótilo fundido à bainha do coleótilo), do qual se originam as folhas. Plântulas apresentam entrenós alongados quando expostas à alternância de luz e entrenós curtos quando expostas à luz constante,

indicando que a luz influencia na morfologia da plântula. Cotilédone compacto é o estado de caráter ancestral e mais comum em Poales, enquanto o coleóptilo teve mais de uma origem na ordem. O coleóptilo também ocorre em Cyperaceae e pode representar uma sinapomorfia dessas famílias, dando suporte ao posicionamento de Mayacaceae no clado cyperídeo.

Palavras chave: coleóptilo; cotilédone compacto; mesocótilo; opérculo; plântula; Poales; sementes.

1. Introdução

Mayacaceae Kunth inclui apenas um gênero, *Mayaca* Aubl., com 4-10 espécies de distribuição neotropical. A maioria das espécies ocorre na América do Sul, com exceção de *Mayaca baumii* Gurke, que é encontrada no continente africano (Stevenson, 1998; Stevens, 2018).

Os representantes da família são ervas perenes, aquáticas ou anfíbias, encontradas em brejos, lagos e rios (Stevenson, 1998). Algumas delas têm valor econômico, como *Mayaca fluviatilis* Aubl., que tem sido comercializada para uso em aquários, provavelmente desde o início dos anos 90 (Yakandawala e Dissanayake, 2010; Queensland, 2016). Devido à sua alta capacidade de se propagar vegetativamente, essa espécie também representa um problema em potencial, pois pode bloquear drenos e infraestruturas de irrigação e superpovoar lagos de água doce, lagoas e córregos, como observado na Austrália (Queensland, 2016), na Flórida (EUA) (Hanlon et al., 2000) e no Sri Lanka (Yakandawala e Dissanayake, 2010). Assim, o conhecimento sobre aspectos reprodutivos de Mayacaceae poderá futuramente contribuir com dados importantes para o manejo dessas espécies que se comportam como invasoras.

Morfológicamente, as espécies de *Mayaca* apresentam caule alongado com entrenós evidentes, ereto quando emerso, ou rastejante, com canais aeríferos; as folhas são espiraladas e as flores bissexuais ocorrem isoladas ou formando inflorescências terminais; o fruto é do

tipo cápsula 3-valvar e as sementes são ovóides a globosas e escobirculadas (Lourteig, 1952; Stevenson, 1998).

Carvalho (2007), na revisão taxonômica da família reconheceu apenas quatro espécies: *Mayaca fluviatilis*, *M. sellowiana* Kunth., *M. baumii* e *M. longipes* Gand., diferenciadas entre si pela morfologia da antera e pelo arranjo das flores. Porém, a delimitação e o reconhecimento das espécies na fase vegetativa são dificultados pela heterofilia, uma vez que indivíduos anfíbios têm a habilidade de produzir diferentes tipos de folhas acima e abaixo da água (Wells e Pigliucci, 2000).

Filogeneticamente, Mayacaceae apresenta posição instável, sendo incluída em diferentes clados de Poales nas análises cladísticas da ordem baseadas em dados morfológicos e moleculares (Linder e Rudall, 2005; Givnish et al., 2010). Na maioria dessas análises, no entanto, Mayacaceae aparece agrupada com Xyridaceae e Eriocaulaceae, formando o clado xyrídeo (Chase et al., 2000, 2006; Givnish et al., 2005, 2006, 2010). Já em análise filogenética mais recente de Poales, baseada em dados plastídias (*rbcL* e *ndhF*), Mayacaceae emerge no clado cyperídeo, juntamente com Rapateaceae, Thurniaceae, Juncaceae e Cyperaceae, porém com baixo suporte filogenético, enquanto o clado xyrídeo aparece formado apenas por Xyridaceae e Eriocaulaceae (Bouchenak-Khelladi et al., 2014).

Uma característica importante de Mayacaceae, porém controversa, é a presença de opérculo nas sementes, apontada como possível sinapomorfia do clado xyrídeo (Oriani e Scatena, 2014). Diversos autores sugerem a presença dessa estrutura em *Mayaca* baseados na morfologia da região micropilar (Hutchinson, 1934; Horn af Rantzien, 1946; Stevenson, 1983; Dahlgren et al., 1984), enquanto outros autores afirmam que a estrutura anatômica da micrópila não caracteriza um opérculo (Hamann, 1961; Venturelli e Bouman, 1986). Venturelli e Bouman (1986) relatam que Hutchinson (1934), ao adaptar a ilustração da semente de *Mayaca* de Seubert (1885), interpretou erroneamente o embrião como um

opérculo. Venturelli e Bouman (1986) relatam ainda que apesar de as ilustrações de Poulsen (1886) e as descrições de Hamman (1961) serem claras quanto à ausência de opérculo, diversos autores seguiram Hutchinson (1934), acreditando na presença do opérculo na família (Horn af Rantzien, 1964; Stevenson, 1983; Dahlgren et al., 1984). Segundo Venturelli e Bouman (1986), que analisaram a embriologia de *Mayaca fluviatilis*, incluindo o desenvolvimento do óvulo e da semente, as sementes não são operculadas, pois a estrutura que se forma na região micropilar não apresenta células de paredes espessadas. No entanto, a o opérculo é definido como uma estrutura que se abre semelhante a uma tampa e que varia em sua ontogenia, estrutura, formato e função (Werker, 1997).

Outras características importantes de Mayacaceae, pois têm valor filogenético, referem-se à morfologia da plântula, principalmente em relação ao tipo de cotilédone, que varia muito dentre as Poales (Tillich, 2007). O desenvolvimento pós-seminal foi estudado em *Mayaca fluviatilis* e em Eriocaulaceae por Tillich (2007), que descreveu o cotilédone como do tipo compacto e reduzido à sua parte haustorial dentro da semente, sem indicação de uma bainha cotiledonar nessas duas famílias, e uma forte tendência à miniaturização e redução dos órgãos.

Já em Xyridaceae, *Orectanthe* possui cotilédone compacto com bainha reduzida (Tillich, 2007), enquanto *Xyris* pode apresentar cotilédone compacto com os lobos da bainha desenvolvidos (Nardi e Oriani, capítulo 2), ou, predominantemente, hipofilo cotiledonar laminar (Kraus et al., 1994; Tillich, 2007; Nardi e Oriani, capítulo 2). Destaca-se que o trabalho de Tillich (2007) corresponde a um estudo morfológico comparativo do desenvolvimento pós-seminal em vários representantes de Poales, fornecendo dados úteis à taxonomia e filogenia da ordem, uma vez que busca estabelecer homologias. Diante disso, o estudo do desenvolvimento pós-seminal de espécie de Mayacaceae permitirá identificar as estruturas da plântula e analisar se tais caracteres são compartilhados com as demais famílias

do clado xyrídeo ou cyperídeo, possibilitando realizar inferências filogenéticas, bem como avaliar a evolução de caracteres.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos: a) avaliar a germinação de sementes de *Mayaca fluviatilis* e *M. sellowiana*; b) verificar a porcentagem de germinação das sementes de *M. fluviatilis* sob diferentes condições de luz, umidade e temperatura; c) confirmar se as sementes de Mayacaceae apresentam opérculo e se este é funcional; d) analisar o desenvolvimento pós-seminal e as estruturas da plântula de *Mayaca fluviatilis* e *M. sellowiana*, comparando-as ao que ocorre nas demais famílias do clado xyrídeo e cyperídeo; e) avaliar a evolução do tipos de cotilédone em Poales, por meio de análises filogenéticas.

2. Material e métodos

2.1 Material botânico

As espécies estudadas foram *Mayaca fluviatilis* Aubl. (Coan & Oriani 51, 56; Nardi et al. 77; Oriani et al. 20) e *M. sellowiana* Kunth (Coan & Oriani 53; Nardi et al. 78). Sementes de ambas as espécies foram coletadas em campos úmidos de cerrado, no município de Itirapina (São Paulo, Brasil). Os vouchers foram identificados e depositados no Herbarium Rioclarense (HRCB) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista. A identificação das espécies foi feita com base na chave diagnóstica de Carvalho (2007).

2.2 Germinação de sementes e desenvolvimento pós-seminal

Para a análise do desenvolvimento pós-seminal, logo após a coleta 100 sementes maduras de cada espécie foram colocadas para germinar em cinco placas de Petri, com 20 sementes cada. As placas de Petri foram forradas com papel filtro umedecido com água destilada, acondicionadas em sala climatizada com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e luz fluorescente ($\approx 40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR) constantes. A observação das sementes foi realizada a cada 24 horas e

a germinação foi considerada a partir da protrusão do coleóptilo. Após a germinação, acompanhou-se o tempo de surgimento das estruturas em uma plântula de cada espécie. A documentação dos resultados foi feita com imagens obtidas com câmera digital Canon Power Shot S80, acoplada a estereomicroscópio Leica EZ4. Para a edição de imagens, utilizou-se o programa Adobe Photoshop CS6. Para descrição das estruturas da plântula, seguiu-se a terminologia utilizada por Tillich (2007).

Para verificar se diferentes condições de umidade, luz e temperatura influenciam na porcentagem de germinação, foram realizados os seguintes tratamentos com *Mayaca fluviatilis*: 20 sementes foram acondicionadas em saco de papel por 45 dias e outras 20 sementes por 70 dias. Essas sementes foram colocadas para germinar em sala de germinação a $25\pm 2^\circ\text{C}$ e luz fluorescente ($\approx 40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR) constantes, em placas de Petri com papel filtro umedecido. Além disso, 20 sementes foram acondicionadas em saco de papel por 70 dias e colocadas para germinar em sala climatizada a $22^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$, com alternância de luz (12 horas de luz e 12 horas de escuro), também em placas de Petri com papel filtro umedecido. A porcentagem de germinação foi determinada após 60 dias do início do experimento.

Outros três experimentos com *Mayaca fluviatilis* foram realizados em sala climatizada a $22\pm 2^\circ\text{C}$ com alternância de luz (12 horas de luz e 12 horas de escuro), com registro diário da porcentagem de germinação. Os tratamentos foram os seguintes: 40 sementes acondicionadas em saco de papel por 7 dias em temperatura ambiente; 40 sementes submetidas a 60°C em estufa por 48 horas + 7 dias em saco de papel em temperatura ambiente; e 40 sementes submetidas a 60°C em estufa por 72 horas. Das 40 sementes de cada tratamento, 20 sementes foram colocadas para germinar em placa de Petri forrada com papel filtro umedecido (placa úmida), e 20 sementes foram colocadas em placa de Petri forrada com papel filtro, sendo as sementes recobertas por água (placa encharcada). Curvas de germinação acumulada foram

utilizadas para descrever a germinação em função do tempo (em dias) nesses três diferentes tratamentos.

2.3 Microscopia de luz (ML)

Para o estudo anatômico, sementes e plântulas em diferentes fases de desenvolvimento foram fixadas em FAA 50 (37% formaldeído, ácido acético glacial, 70% etanol, 1:1:18 v/v, Johansen, 1940) por 24 horas e posteriormente transferidas para álcool 70%. As amostras foram incluídas em (2-hidroxietil)-metacrilato (Leica Historesin Embedding Kit) (Gerrits e Smid, 1983) e seccionadas (5-7µm de espessura) em micrótomo rotativo (RM 2245, Leica). As secções anatômicas foram coradas com ácido periódico - reativo de Schiff (PAS) e azul de toluidina a 0,05% em borato de sódio (O'Brien et al., 1964; Feder e O'Brien, 1968) e montadas em lâminas permanentes com Entellan (Merck). As secções anatômicas escolhidas foram registradas com capturador de imagens (Leica, DFC 450) acoplado ao microscópio (Leica, DM 4000B), utilizando-se o programa de digitalização de imagens LAS (Leica Application Suite V4.0.0).

2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para o estudo micromorfológico, sementes e plântulas em diferentes fases de desenvolvimento foram desidratadas em série de álcool etílico e em acetona e submetidas à secagem ao ponto crítico em gás carbônico (Balzers, CPD 030). Posteriormente, as amostras foram afixadas em stubs, metalizadas com ouro (Bal-Tec, SCD 050) e analisadas sob microscópio eletrônico de varredura (Zeiss LEO 435VP SEM, com 20 kV). As imagens foram obtidas com programa de digitalização de imagens SEM LEO Interface.

2.5 Análise filogenética e reconstrução do estado de caráter ancestral

A filogenia foi reconstruída utilizando-se sequências de DNA plastidial (*ndhF*) e nuclear (*rbcL*) disponíveis a partir de estudo molecular recente (Bouchenak-Khelladi et al., 2014). As sequências utilizadas foram extraídas do repositório GenBank (Benson et al., 2013). Foram incluídas 39 espécies representando as 16 famílias de Poales e Arecaceae (*Aphandra natalia*, *Livistona speciosa* e *Mauritia flexuosa*), essa última utilizada como grupo externo (Tabela Suplementar 1). As sequências dos dois marcadores foram alinhadas utilizando-se o MUSCLE (Edgar, 2004), ajustadas manualmente e concatenadas por meio do Geneious v10.0.9 (Kearse et al., 2012). Com base nessa matriz concatenada realizou-se a inferência filogenética por meio de uma análise de Máxima Verossimilhança no RAxML-HPC2 (Stamatakis, 2006), utilizando-se o modelo evolutivo GTR + G + I, implementado no Portal CIPRES (Miller et al., 2010) com parâmetros padrão. Uma árvore de Consenso de Maioria foi gerada para rodar a análise de reconstrução de caracteres.

A reconstrução do estado de caráter ancestral foi realizada para analisar a evolução dos tipos de cotilédone encontrados em Poales. Os estados de caráter analisados foram: cotilédone compacto, hipofilo cotiledonar laminar, coleóptilo e fanerômero, seguindo-se a terminologia proposta por Tillich (2007). A codificação dos estados de caráter nas diferentes famílias baseou-se nos resultados de Tillich (1994; 2007). Também foram consultados Henderson (2006) para Arecaceae; Pate e Meney (1999) para Anarthriaceae e Ecdeiocoleaceae; Pereira et al. (2008) e Rios et al. (2016) para Bromeliaceae.

A reconstrução foi executada com o pacote *ape* (Paradis et al., 2004), com a função *ace* (*ancestral character estimation*), assumindo o parâmetro de caracteres discretos (“type=discrete”) por meio do R (R Development Core Team, 2017). A função “drop.tip” do mesmo pacote foi utilizada para excluir o grupo externo (Arecaceae) dessa análise, eliminando potenciais ruídos.

3. Resultados

3.1 Germinação

Tanto *Mayaca sellowiana* quanto *M. fluviatilis* apresentaram baixa porcentagem de germinação, 5% e 4%, respectivamente (Fig. 1a). As sementes de *Mayaca fluviatilis* acondicionadas em saco de papel por 70 dias e colocadas para germinar a 25°C e luz constante apresentaram germinação de 60%, enquanto aquelas submetidas a 22°C em alternância de luz (12 horas/claro 12 horas/escuro), apresentaram porcentagem de germinação de 5% (Fig. 1b). Já as sementes acondicionadas em saco de papel por 45 dias e submetidas a 25°C e luz constante apresentaram porcentagem de germinação igual a 10% (Fig. 1b).

Comparando-se diferentes condições de umidade (placas úmidas x placas encharcadas) observa-se que em dois dos três tratamentos conduzidos a germinação foi maior nas placas encharcadas em relação às placas úmidas (Fig. 2a-b). As sementes acondicionadas em saco de papel por 7 dias apresentaram 15% de germinação na placa encharcada, enquanto que nenhuma semente germinou na placa úmida (Fig. 2a). As sementes acondicionadas em estufa a 60°C por 48 horas e 7 dias em saco de papel apresentaram porcentagem de germinação de 30% na placa encharcada e de 10% na placa úmida (Fig. 2b). Já as sementes acondicionadas em estufa a 60°C por 72 horas e não colocadas em saco de papel apresentaram a mesma porcentagem de germinação (10%) nas duas condições de umidade (Fig 2c).

3.2 Desenvolvimento pós-seminal

O tempo para início da germinação e para surgimento das diferentes estruturas da plântula em *Mayaca fluviatilis* e *M. sellowiana* está indicado na Tabela 1.

As sementes são globosas e enegrecidas, com uma protuberância na região micropilar de coloração clara (Fig. 3a). Após a embebição ocorre a protrusão do coleóptilo (Fig. 3b) através do afastamento dos tecidos do envoltório seminal na região micropilar (Fig. 3c). A

parte basal do coleóptilo é congenitamente fundida com o epicótilo, formando assim o mesocótilo, enquanto que a parte apical do coleóptilo é livre, formando um lobo mediano (Fig. 3d-e). Após o alongamento do coleóptilo ocorre a diferenciação do colar de rizóides na extremidade do hipocótilo curto (Fig. 3e), seguida da formação da primeira folha e do desenvolvimento da raiz primária e da primeira raiz adventícia, essa última a partir do mesocótilo (Fig. 3f-g). Plântulas submetidas à alternância de luz (12 horas na luz e 12 horas no escuro) apresentaram mesocótilo e entrenós mais alongados (Fig. 3h), enquanto que plântulas expostas à luz constante apresentaram mesocótilo e entrenós mais curtos (Fig. 3i).

Sob microscopia eletrônica de varredura, observa-se na semente madura que a estrutura presente na região micropilar, de formato cônico, é formada pelo prolongamento do tégmen (Fig. 4a-b), cujas células se afastam com a protrusão do coleóptilo (Fig. 4c-e). Este se alonga podendo-se distinguir, já no início do desenvolvimento, sua parte livre (lobo mediano da bainha) e sua parte fundida ao epicótilo, que formará o mesocótilo (Fig. 4f-g). Entre essas partes observa-se a formação de tricomas e de um primórdio foliar no ápice do epicótilo (Fig. 4f, h). Observa-se também os rizóides alongados, abundantes (Fig. 4i-j). Ocorre o desenvolvimento do lobo mediano da bainha do coleóptilo (Fig. 4j), seguido do alongamento do mesocótilo (Fig. 4k) e da primeira folha, envolvida em sua base pela bainha do coleóptilo (Fig. 4l). A raiz primária tem desenvolvimento limitado, sendo substituída pelas raízes adventícias que se formam a partir do mesocótilo (Fig. 4m).

Sob microscopia de luz observa-se que as células da endotesta são espessadas, enquanto as células do tégmen possuem paredes finas e são alongadas na região micropilar (Fig. 5a). Essas últimas secretam mucilagem, que facilita o desenvolvimento do coleóptilo dentro do canal micropilar (Fig. 5b-d). Ressalta-se que as células do tégmen que delimitam o canal micropilar não se desprendem do envoltório seminal com a germinação (Fig. 5e); ocorre apenas um afastamento dos tecidos enquanto o coleóptilo atravessa a micrópila. Parte do

cotilédone fica retida no interior da semente (hiperfilo), com função haustorial (Fig. 5b-d). A presença de tricomas no ápice do epicótilo e a formação do primeiro primórdio foliar, bem como a diferenciação do colar de rizóides podem ser observadas já no início do desenvolvimento da plântula (Fig. 5f-g). O mesocótilo alongado é parenquimático e atravessado por raízes adventícias (Fig. 5j-k). O meristema apical caulinar inserido na bainha do coleóptile pode ser observado com detalhe na Fig. 5l. As Figs. 5m e 5n mostram, respectivamente, a anatomia de plântulas submetidas à alternância de luz, com entrenós alongados, e de plântulas expostas à luz constante, com entrenós curtos.

3.3 Análise filogenética e evolução dos estados de caráter

Bromeliaceae, Typhaceae e Rapateaceae são as primeiras linhagens a divergir consecutivamente, sendo Rapateaceae grupo-irmão das demais famílias de Poales (Fig. 6). Essas emergem em dois clados, um deles correspondendo ao clado cyperídeo (com Mayacaceae, Thurniaceae, Juncaceae e Cyperaceae) e o outro formado por três subclados correspondendo aos clados xyrídeo (com Xyridaceae e Eriocaulaceae), restídeo (com Anarthriaceae, Restionaceae e Centrolepidaceae) e graminídeo (com Flagellariaceae, Joinvilleaceae, Ecdeiocoleaceae e Poaceae) (Fig. 6). Desses quatro clados apenas o restídeo e o graminídeo foram resgatados com baixo suporte, com valores de bootstrap igual a 59 e 38, respectivamente.

A reconstrução do estado de caráter ancestral mostra que o cotilédone do tipo compacto é o estado mais provável na base de Poales (Fig. 6). O hipofilo cotiledonar laminar surgiu duas vezes independentemente, uma em Bromeliaceae e outra em *Xyris* (Xyridaceae) (Fig. 6). O cotilédone do tipo fanerômero também teve várias origens independentes, aparecendo em Typhaceae, no ancestral mais recente das restídeas e no ancestral mais recente do clado formado por Thurniaceae, Juncaceae e Cyperaceae (Fig. 6). Já o coleóptile surgiu

independentemente nos clados graminídeo e cyperídeo, sendo que neste último clado pode ter tido duas origens independentes em Mayacaceae e Cyperaceae, ou pode, com menor probabilidade, ter surgido no ancestral mais recente do clado cyperídeo, sendo homólogo nessas duas famílias (Fig. 6).

4. Discussão

Os resultados aqui obtidos mostram que tanto *Mayaca sellowiana* quanto *M. fluviatilis* apresentam baixa porcentagem de germinação de sementes, indicando que essas espécies reproduzem-se principalmente por propagação vegetativa. Yakandawala e Dissanayake (2010), em um estudo investigativo sobre a capacidade de propagação de partes vegetativas de *Mayaca fluviatilis*, demonstraram que partes do caule em qualquer estágio de desenvolvimento são capazes de rebrotar formando indivíduos inteiros. De acordo com os autores, as porções caulinares mais apicais têm significativamente uma maior capacidade de propagação do que as porções basais e intermediárias, e fragmentos de caule de apenas 2 cm de comprimento já são capazes de produzir novas raízes e partes aéreas. Desta forma, considerando que as espécies de *Mayaca* formam grandes populações e que apresentam baixa porcentagem de germinação de sementes, acredita-se que a maioria dos indivíduos das populações seja clonal.

De acordo com Costa (2010), plantas de *Mayaca fluviatilis* possuem tolerância tanto ao sombreamento quanto a altas intensidades de luz. As sementes de Mayacaceae são fotoblásticas positivas e a luminosidade influencia na morfologia das plântulas, uma vez que plântulas submetidas à alternância de luz apresentaram mesocótilo e entrenós alongados, enquanto que aquelas submetidas à luz constante apresentaram essas estruturas reduzidas. Entrenós alongados devido à diminuição da irradiância também foram observados em plântulas de *Potamogeton pectinatus* (Potamogetonaceae, Alismatales) (Santamaría, 2002).

De acordo com Tillich (2007) a iniciação meristemática recente de um epicótilo que inclui a base do coleótilo e produz a fusão conhecida como mesocótilo pode se alongar consideravelmente por um meristema intercalar, dependendo das condições de luz ou da profundidade da sementeira. Deste modo, acredita-se que estas alterações morfológicas possam representar diferentes estratégias de sobrevivência das plântulas, uma vez que varia a disponibilidade de luz por crescerem em regiões onde ocorrem flutuações do nível de água ao longo do ano.

Ludwig (1886) aponta que sementes de Mayacaceae precisam de um período de seca antes de serem capazes de germinar, assim como relatado em algumas plantas aquáticas, como *Eichhornia*, *Heteranthera* (Pontederiaceae, Commelinales), *Alisma* e *Sagittaria* (Alismataceae, Alismatales) (Crocker, 1906). No presente trabalho verificamos que as sementes de Mayacaceae germinam após a coleta, mas quando submetidas à secagem essas sementes apresentam porcentagem de germinação mais elevada.

O fato da germinação de sementes ser baixa ou atrasada em algumas espécies geralmente ocorre devido a influências do envoltório seminal, que limita ou exclui o suprimento de água ou oxigênio (Crocker, 1907). A secagem de sementes seguida de sua imersão em água pode causar rachaduras ou a ruptura do envoltório seminal, facilitando a embebição, como observado em espécies de *Eichhornia* (Pontederiaceae) e *Potamogeton* (Potamogetonaceae, Alismatales) (Crocker, 1907). Em *Mayaca fluviatilis*, Venturelli e Bouman (1986) relatam que a superfície das sementes apresenta cristas irregulares e longitudinais, que são originadas das paredes anticlinais espessadas e radialmente alongadas das células da exotesta, enquanto que a parede periclinal externa é fina. Como observado por esses autores sob microscópio eletrônico de varredura e confirmado no presente trabalho, na semente madura a parede periclinal externa das células da exotesta são planas ou ligeiramente côncavas, enquanto que na semente seca essas paredes externas entram em colapso, o que

provavelmente facilita a embebição e poderia explicar o aumento da germinação com a secagem das sementes. Além disso, as células exotestais podem conter ar, facilitando assim a flutuação e mantendo por algum tempo as sementes maduras emersas (Venturelli e Bouman, 1986), o que facilita a dispersão de sementes a maiores distâncias da planta-mãe em ambientes lóticos.

Nos experimentos em que comparamos a germinação em placas úmidas e encharcadas, as placas úmidas representaram uma superfície de solo úmido, enquanto que placas encharcadas representaram um local alagado. Observamos que a porcentagem de germinação das sementes nas placas encharcadas foi mais elevada, indicando que sementes submersas apresentam maior porcentagem de germinação. O mesmo foi observado em outras espécies aquáticas, como *Acorus calamus* (Acoraceae, Acorales) (Pai e McCarthy, 2010), *Alisma pantago* e *Potamogeton* (Potamogetonaceae, Alismatales) (Crocker e Davis, 1914), que necessitam estar recobertas por água para que ocorra a embebição e germinação. Acredita-se que em Mayacaceae isso seja uma adaptação a locais onde ocorrem flutuações no nível de água: nos períodos de seca, em que as sementes ficam expostas sobre o solo, ocorre a secagem das mesmas, promovendo o colapso das células da exotesta o que, posteriormente, facilita a embebição e germinação nos períodos chuvosos, quando o nível de água aumenta, recobrando as sementes.

A estrutura diferenciada presente na região micropilar da semente madura de Mayacaceae corresponde ao alongamento das células da endotesta e do tégmen (exo e endotégmen), como já havia sido descrito por Venturelli e Bouman (1986). Esses autores apontam que esta estrutura não corresponde a um opérculo, uma vez que as paredes de suas células não são espessadas. No entanto, o opérculo pode variar em sua ontogenia, forma e função e é definido como uma estrutura que se abre semelhante a uma tampa com a germinação (Werker, 1997). Nossos resultados mostram que essa estrutura não se abre como

uma tampa durante a germinação, mas que ocorre um afastamento dos tecidos do envoltório seminal na região micropilar da semente com o desenvolvimento do coleóptilo, o que não caracteriza um opérculo.

O opérculo foi reportado em Xyridaceae, que possui sementes endotestais (Nardi et al., 2015), e em Eriocaulaceae, que possui sementes exotestais (Scatena e Bouman, 2001). Nessas famílias o opérculo se origina de células do tegumento interno e se rompe de modo circular semelhante a uma tampa (Scatena e Bouman, 2001; Coan et al., 2007, 2010; Dugarte et al., 2015; Nardi e Oriani, capítulo 2). De acordo com Hamann (1961), em Mayacaceae, os tecidos que compõem o envoltório seminal na região micropilar se degeneram antes da germinação da semente e fornecem um canal para a emergência da plântula. No entanto, conforme aqui observado, esses tecidos não se degeneram, mas são apenas empurrados pelo coleóptilo em desenvolvimento durante a germinação. Além disso, observou-se que as células do envoltório seminal que delimitam o canal micropilar secretam mucilagem, diminuindo o atrito e protegendo os meristemas apicais caulinar e radicular, mesma função atribuída à epístase em Eriocaulaceae e Xyridaceae (Nardi e Oriani, capítulos 1 e 2).

Demonstramos aqui, sob microscopia de luz e eletrônica de varredura, que o desenvolvimento pós-seminal em Mayacaceae é marcado pela protrusão do coleóptilo, cuja parte proximal se alonga fusionada ao epicótilo (mesocótilo), enquanto a porção apical é livre. O crescimento da raiz primária é tardio e limitado. O hipocótilo é curto e apresenta um denso colar de rizóides em sua extremidade, com desenvolvimento precoce. Ocorre a formação de raízes adventícias na região do mesocótilo e o meristema apical do caule forma diversas folhas com filotaxia espiralada. Esses dados são inéditos para a família, pois diferem do que foi descrito por Tillich (2007) para *Mayaca fluviatilis*. Segundo esse autor, que realizou estudo apenas morfológico, as plântulas apresentam cotilédone compacto sem bainha cotiledonar visível, a raiz primária não se desenvolve, a primeira folha é um catafilo e a

primeira raiz adventícia surge semanas após a germinação. No nosso trabalho apenas uma semente de *M. fluviatilis* apresentou desenvolvimento semelhante ao descrito por Tillich (2007) e acredita-se que essa seja uma condição anômala de desenvolvimento.

Com relação às estruturas da plântula, Tillich (2007) enfatiza que o cotilédone é um dos caracteres mais consistentes em Poales para ser analisado em um contexto evolutivo. O cotilédone pode ser considerado uma folha que se origina diretamente dos tecidos do embrião em desenvolvimento, enquanto que as outras folhas surgem como primórdios a partir do meristema apical do caule (Tillich, 2007).

Para as monocotiledôneas, Tillich (2007) descreve quatro tipos principais de cotilédones: compacto, coleóptilo, hipofilo cotiledonar laminar e fanerômero. O cotilédone compacto é constituído pelo hiperfilo haustorial e pelo hipofilo com uma pequena bainha cotiledonar; o hipofilo cotiledonar é a parte basal sempre bifacial do cotilédone, a qual pode ser expandida, formando uma estrutura de assimilação semelhante a uma lâmina (hipofilo cotiledonar laminar); ou se diferenciar no coleóptilo, uma estrutura tubular produzida pela atividade meristemática do tecido marginal da bainha cotiledonar, e que por meio desse processo de crescimento a margem foliar cotiledonar é elevada e forma uma abertura distal no coleóptilo de onde as primeiras folhas emergem a partir do epicótilo. Já o fanerômero compreende a parte proximal do hiperfilo cotiledonar que eleva a semente bem acima da superfície do solo, sendo, nesse caso, o primeiro órgão de assimilação da plântula (Tillich, 2007).

De acordo com as definições propostas por Tillich (2007), nossos resultados indicam que o cotilédone encontrado em Mayacaceae é do tipo coleóptilo. A parte basal do coleóptilo é congenitamente fundida com o epicótilo, formando assim o mesócotilo, uma estrutura alongada entre o haustório e a parte apical do coleóptilo que é alongada e livre formando o lobo mediano da bainha. Ressalta-se que em muitas espécies de Cyperoideae (Cyperaceae), o

coleóptilo é o primeiro órgão de assimilação eficaz (Tillich, 2007), assim como aqui observado em Mayacaceae.

Tillich (2007) ainda propõe uma hipótese evolutiva do cotilédone em Poales na qual o tipo compacto seria a condição ancestral e que teria derivado diretamente nos outros três tipos. Nossas análises também mostram que o hipofilo cotiledonar laminar, o fanerômero e o coleóptilo derivaram diretamente do cotilédone compacto, corroborando a hipótese evolutiva desse autor. A reconstrução do estado de caráter ancestral mostra que o cotilédone do tipo compacto é a condição ancestral em Poales. O hipofilo cotiledonar laminar, o fanerômero e o coleóptilo surgiram mais de uma vez independentemente dentro da ordem, os dois primeiros derivando diretamente do cotilédone do tipo compacto. Já o coleóptilo derivou do cotilédone compacto no clado graminídeo, enquanto que no clado cyperídeo pode ter derivado, com maior probabilidade, do fanerômero.

Ressalta-se que a análise filogenética aqui realizada resgatou os quatro principais clados de Poales que emergem na maioria das análises da ordem (Linder e Rudall, 2005; Givnish et al., 2011; Bouchenak-Khelladi et al., 2014), que são os clados xyrídeo, restídeo, graminídeo e cyperídeo. Rapateaceae aparece como uma linhagem basal, como na maioria das análises da ordem (Bremer et al., 2002; Linder e Rudall, 2005; Givnish et al., 2010), mas diferente do encontrado na análise mais recente, em que aparece incluída no clado cyperídeo (Bouchenak-Khelladi et al., 2014). Já Mayacaceae, que aparece em diferentes posições em análises anteriores (Linder e Rudall, 2005; Givnish et al., 1999; 2010), emergiu em nossa análise no clado cyperídeo, com valor de bootstrap igual a 71, corroborando os resultados da análise mais recente (Bouchenak-Khelladi et al., 2014).

O desenvolvimento do coleóptilo combinado com o desenvolvimento tardio da raiz primária era apontado como característica exclusiva de Cyperaceae dentre as Poales (Tillich, 2007). No entanto, o presente trabalho mostra que essas características são compartilhadas por

Cyperaceae e Mayacaceae, enquanto que espécies de Xyridaceae e Eriocaulaceae, famílias que compõem o clado xyrídeo, compartilham cotilédone o tipo compacto e a formação de um caule curto com folhas dispostas em roseta (Scatena et al., 1993, 1996; Kraus et. al., 1996; Dugarte et al., 2015; Tillich, 2007; Nardi e Oriani, capítulo 2). A presença do lobo mediano da bainha do coleóptilo é característica exclusiva de Mayacaceae dentre as Poales. Acredita-se que o apêndice relatado em Cyperaceae, como uma pequena extensão do coleóptilo no topo de sua abertura distal, corresponda ao lobo mediano da bainha, mas extremamente reduzido nessa família em relação à Mayacaceae. Dentre as monocotiledôneas, o desenvolvimento do lobo mediano da bainha do coleóptilo foi observado em *Acorus* (Acoraceae, Acorales) e representa um alto grau de evolução do cotilédone (Tillich, 2000).

Comparando os dados obtidos para Mayacaceae com aqueles encontrados para outras famílias de Poales e considerando sua posição filogenética instável, a presença de sementes não-operculadas, coleóptilo como primeiro órgão eficaz de assimilação e formação de mesocótilo, desenvolvimento tardio da raiz primária e caule com entrenós evidentes na plântula diferem Mayacaceae das xyrídeas (Eriocaulaceae e Xyridaceae) e suportam seu posicionamento no clado das cyperídeas.

5. Conclusões

As espécies estudadas apresentaram baixa porcentagem de germinação, indicando que a reprodução ocorra principalmente por propagação vegetativa. Sementes de Mayacaceae são fotoblásticas positivas, sendo que a luminosidade também influencia na morfologia das plântulas, pois quando são submetidas à alternância de luz apresentaram mesocótilo e entrenós mais alongados em relação aos das plântulas submetidas à luz constante. A umidade também influencia na germinação, uma vez que sementes submersas apresentaram maior porcentagem de germinação em relação às sementes não recobertas por água. A secagem das

sementes antes da embebição também mostrou influenciar positivamente a porcentagem de germinação, por alterar a estrutura do envoltório seminal, facilitando a embebição.

As sementes não são operculadas, pois com a germinação ocorre a protrusão do coleóptilo pelo afastamento dos tecidos do envoltório seminal na região micropilar, sem haver o desprendimento de parte do envoltório seminal como uma tampa, o que, portanto, não caracteriza um opérculo. O desenvolvimento pós-seminal com a formação do coleóptilo é um dado inédito para a família, pois difere do descrito na literatura. Sementes não-operculadas, coleóptilo como primeiro órgão eficaz de assimilação, formação do mesocótilo, desenvolvimento tardio da raiz primária e caule com entrenós evidentes na plântula são caracteres compartilhados por Mayacaceae e Cyperaceae, dando suporte ao posicionamento de Mayacaceae no clado cyperídeo. Cotilédone compacto é o estado de caráter ancestral em Poales, enquanto os estados de caráter derivados como coleóptilo, hipofilo cotiledonar laminar e fanerômero tiveram mais de uma origem na ordem.

Agradecimentos

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (processos n°. 160640/2014-8 à K.O.N e 168277/2014-0 à A.O) e à CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PNPD à A.O.), pelo auxílio financeiro. Agradecemos também ao Dr. Augusto Giaretta de Oliveira, pelo auxílio com as análises filogenéticas, e ao Dr. Luis Felipe Daibes de Andrade, pelo auxílio com as análises estatísticas.

Referências

- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W. 2013. GenBank. *Nucleic Acids Research* 41, 36-42.
- Bouchenak-Khelladi, Y., Muaya, A.M., Linder, H.P. 2014. A revised evolutionary history of Poales: origins and diversification. *Bot. J. Linn. Soc.* 175, 4-16.
- Bremer, K. 2002. Gondwanan evolution of the grass alliance of families (Poales). *Evolution* 56, 1374-1387.
- Carvalho, M.L.S. 2007. Estudos taxonômicos em *Mayacaceae* Kunth. Dissertação de Mestrado: Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Chase, M.W., Fay M.F., Devey, D.S., Maurin O., Ronsted, N., Davies, T.J., Pillon, Y. 2006. Multigene analyses of monocot relationships: a summary. *Aliso* 22, 63-75.
- Chase, M.W., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Rudall, P.J., Fay, M.F., Hahn, W.H., Sullivan, S. 2000. Higher-level systematics of the monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification. In: Wilson, K.L., Morrison, D.A. eds. *Monocots: systematics and evolution*. CSIRO, Melbourne, pp. 3-16.
- Coan, A.I., Rosa, M.M., Scatena, V.L. 2007. Embryology and seed development of *Syngonanthus caulescens* (Poir.) Ruhland (Eriocaulaceae-Poales). *Aquat. Bot.* 86, 148-156.
- Coan, A.I., Scatena, V.L. 2010. Comparative embryology and taxonomic considerations in Eriocaulaceae (Poales). *Fedd. Repp.* 122, 1-17.
- Costa, U.M.P. 2010. Características fotossintéticas de *Mayaca fluviatilis* Aubl. (Mayacaceae) em resposta à variação de temperatura e luminosidade. Dissertação de Mestrado: Universidade do Estado do Mato Grosso, Nova Xavantina.
- Crocker, W. 1906. Role of seed coats in delayed germination. *Int. J. Pl. Sci.* 42, 265-291.
- Crocker, W. 1907. Germination of seeds of water plants. *Bot. Gaz.* 44, 375-380.

- Crocker, W., Davis, W.E. 1914. Delayed germination in seed of *Alisma pantago*. Bot. Gaz. 58, 285-321.
- Dahlgren, R.M.T., Clifford, H.T., Yeo, P.F. 1984. The families of the monocotyledons. Structure, evolution, and taxonomy. Springer, Berlin.
- Dugarte, B.A.C., Escobar, D.F.E., Scatena, V.L. 2015. Morfología de semillas y desarrollo post-seminal de especies de *Comanthera* (Eriocaulaceae). Rev. Biol. Trop. 63, 1127-1135.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC bioinformatics 5, 113.
- Feder, N., O'Brien, T.P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. Am. J. Bot. 55, 123-142.
- Hanlon, S.G., Hoyer, M.V., Cichra, C.E., Canfield, D.E. 2000. Evaluation of macrophyte control in 38 Florida lakes using triploid grass carp. J. Aquat. Plant Manag. 38, 48-54.
- Henderson, F.M., 2006. Morphology and anatomy of palm seedlings. Bot. Rev. 72, 273-329.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28, 1647-1649.
- Gerrits, P.O., Smid, L. 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. J. Micros. 132, 81-85.
- Givnish, T.J., Ames, M., McNeal, J.R., McKain, M.R., Steele, P.R., dePamphilis, C.W., Graham, S.W. 2010. Assembling the tree of the monocotyledons: plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. Ann. Miss. Bot. Gard. 97, 584-616.

- Givnish, T.J., Evans, T.M., Pires, J.C., Sytsma, K.J. 1999. Polyphyly and convergent morphological evolution in Commelinales and Commelinidae: evidence from *rbcL* sequence data. *Mol. Phyl. Evol.* 12, 360-385.
- Givnish, T.J., Pires, J.C., Graham, S.W., McPherson, M.A., Prince, L.M., Patterson, T.B., Rai, H.S. 2005. Repeated evolution of net venation and fleshy fruits among monocots in shaded habitats confirms a priori predictions: evidence from an *ndhF* phylogeny. *Proc. R. Soc. B* 272, 1481-1490.
- Givnish, T.J., Pires, J.C., Graham, S.W., McPherson, M.A., Prince, L.M., Patterson, T.B., Rai HS. 2006. Phylogenetic relationships of monocots based on the highly informative plastid gene *ndhF*: evidence for widespread concerted convergence. *Aliso* 22, 28-51.
- Givnish, T.J., Barfuss, M.H.J., Ee, B.V., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., Gonsiska, P.A., Jabaily, R.S., Crayn, D.M., Smith, J.A.C., Winter, K., Brown, G.K., Evans, T.M., Holst, B.K., Luther, H., Till, W., Zizka, G., Berry, P.E., Sytsma, K.J. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *Am. J. Bot.* 98, 872-895.
- Hamann, U. 1961. Merkmalsbestand und verwandtschaftsbeziehungen der Farinosae. *Willdenowia* 2, 639-768.
- Hanlon, S.G., Hoyer, M.V., Cichra, C.E., Canfield-JR, D.E. 2000. Evaluation of macrophyte control in 38 Florida lakes using triploid grass carp. *J. Aquat. Plant Manag.* 38, 48-54.
- Henderson, F.M. 2006. Morphology and anatomy of palm seedlings. *Bot Rev* 72, 273-329.
- Horn af Rantzien, H. 1946. Notes on the Mayacaceae of the Regnellian Herbarium in the Riksmuseum, Stockholm. *Svensk. Bot. Tidskr.* 40, 405-424.
- Hutchinson, J. 1934. The families of flowering plants. II. Monocotyledons. Mac Millan & Co, London.
- Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.

- Kraus, J.E., Sajo, M.G., Dias-Leme, C.L., Wanderley, M.G.L. 1994. Aspectos morfológicos do desenvolvimento pós-seminal em espécies de *Xyris* L. (Xyridaceae). *Hoehnea* 21, 29-38.
- Kraus, J.E., Scatena, V.L., Lewinger, M.E., Trench, K.U.S. 1996. Morfologia externa e interna de quatro espécies de *Paepalanthus* Kunth (Eriocaulaceae) em desenvolvimento pós-seminal. *Bol. Bot. Univ. São Paulo* 15, 45-53.
- Linder, H.P., Rudall, P.J. 2005. Evolutionary history of Poales. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36, 107-124.
- Lourteig, A. 1952. Mayacaceae. *Notulae Syst.* 14, 234-248.
- Ludwig, F. 1886. Ueber durch Austrocknen bedingte Keimfähigkeit der Samen einiger Wasserpflanzen. *Biol. Centralbl.* 6, 299-300.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop, GCE*. New Orleans: LA. pp. 1–8.
- Nardi, K.O., Oriani, A. 2018. Germinação e desenvolvimento pós-seminal em *Xyris* (Xyridaceae, Poales) e sua importância taxonômica e filogenética. *Plant Reprod.* (*in prep.*).
- Nardi, K.O., Scatena, V.L., Oriani, A. 2015. Development of ovule, fruit and seed of *Xyris* (Xyridaceae, Poales) and taxonomic considerations. *Bot. J. Linn. Soc.* 177, 619-628.
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368-373.
- Oriani, A., Scatena, V.L. 2014. Ovule, fruit and seed development in *Abolboda* (Xyridaceae, Poales): implications for taxonomy and phylogeny. *Bot. J. Linn. Soc.* 175, 144-154.
- Pai, A., McCarthy, B.C. 2010. The influence of environmental factors on the germination of *Acorus calamus* seeds. *Seed Sci. Technol.* 38, 390-398.

- Pate, J.S., Meney K.A., 1999. Morphological features of Restionaceae and allied families. In: Meney, K.A., Pate, J.S., eds. Australian rushes: biology, identification and conservation of Restionaceae and allied families. Nedlands: CSIRO. pp. 3-24.
- Paradis, E., Claude, J., Strimmer, K. 2004. APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20, 289-290.
- Pereira, A.R., Pereira, T.S., Rodrigues, A.S., Andrade, A.C.S. 2008. Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. *Acta Bot. Bras.* 22, 1150-1162.
- Poulsen, V.A. 1886. Anatomiske studier over *Mayaca* Aubl. (in Danish with French summary). *Overs. Kongel. Danske. Vidensk. Selsk. Forh. Medlemmers Arbejder* 85-100.
- Queensland, G. 2016. Invasive plant risk assessment: Bog moss *Mayaca fluviatilis* Aubl. Department of Agriculture and Fisheries Biosecurity Queensland. pp.19.
- Rios, P.A.F., Araújo-Neto, J.C., Ferreira, V.M., Neves, M.I.R.S. 2016. Seed morphometry and germination of *Aechmea costantinii* (Mez)L.B.Sm. (Bromeliaceae). *Rev. Caatinga* 29, 85-93.
- Santamaría, L. 2002. Why are most aquatic plants widely distributed? Dispersal, clonal growth and small-scale heterogeneity in a stressful environment. *Acta Oecologica* 23, 137-154.
- Scatena, V.L., Bouman, F. 2001. Embryology and seed development of *Paepalanthus* sect. *Actinocephalus* (Koern.) Ruhland (Eriocaulaceae). *Plant Biol.* 3, 341-350.
- Scatena, V.L., Lemes-Filho, J.P., Lima, A.A.A. 1996. Morfologia do desenvolvimento pós-seminal de *Syngonanthus elegans* e *S. niveus* (Eriocaulaceae). *Acta Bot. Bras.* 10, 85-91.
- Scatena, V.L., Menezes, N.L., Stützel, T. 1993. Embryology and seedling development in *Syngonanthus rufipes* Silveira (Eriocaulaceae). *Beitr. Biol. Pflanzen* 67, 333-343.
- Seubert, M. 1885. Mayacaceae. In: Martius, C.P.F. ed. *Flora Brasílica* 3 (I). pp. 225-232.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses

- with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688-2690.
- Stevens, P.F. 2018. Angiosperm phylogeny website.
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- Stevenson, D.W. 1983. Systematic implications of the floral morphology of the Mayacaceae. *Am. J. Bot.* 70 suppl, 32.
- Stevenson, D.W. 1998. Mayacaceae. In: K Kubitzki, ed. *The families and genera of vascular plants: Monocotyledons*. Vol. 4. Springer, Berlin. pp. 294-296.
- Team, R.D.C. 2017. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. ISBN 3-900051-07-0, Vienna, Austria. Available from: <http://www.r-project.org>.
- Tillich, H.J. 1994. Untersuchungen zum Bau der Keimpflanzen der Philydraceae und Pontederiaceae (Monocotyledoneae). *Sendtnera* 2, 171-186.
- Tillich, H.J. 2000. Ancestral and derived character states in seedlings of monocotyledons. In: Wilson, K.L., Morrison, D.A. eds. *Monocots: systematics and evolution*. Melbourne: CSIRO. pp. 221-229.
- Tillich, H.J. 2007. Seedling diversity and the homologies of seedling organs in the order Poales (Monocotyledons). *Ann. Bot.* 100, 1413-1429.
- Venturelli, M., Bouman, F. 1986. Embryology and seed development in *Mayaca fluviatilis* (Mayacaceae). *Acta Bot. Neerl.* 35, 497-516.
- Wells, C., Pigliucci M. 2000. Adaptive phenotypic plasticity: the case of heterophylly in aquatic plants. *Perspect. Plant Ecol. Syst.* 3, 1-18.
- Werker, E. 1997. Seed anatomy. *Encyclopedia of plant anatomy*. Spezieller Teil, Borntraeger, Berlin.
- Yakandawala, K., Dissanayake, D.M.G.S. 2010. *Mayaca fluviatilis* Aubl.: an ornamental aquatic with invasive potential in Sri Lanka. *Hydrobiologia* 656, 199-204.

ILUSTRAÇÕES

Fig. 1 a Porcentagem de germinação de sementes de *Mayaca sellowiana* e *M. fluviatilis* em sala climatizada com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e luz fluorescente ($\approx 40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR) constantes. **b** Porcentagem de germinação de sementes de *M. fluviatilis* submetidas à secagem em sacos de papel em temperatura ambiente e colocadas para germinar sob diferentes condições de temperatura e luz.

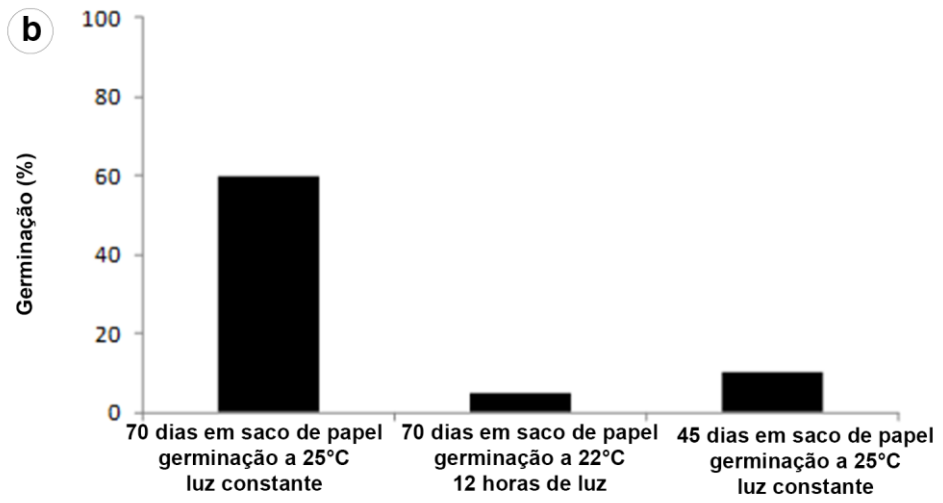
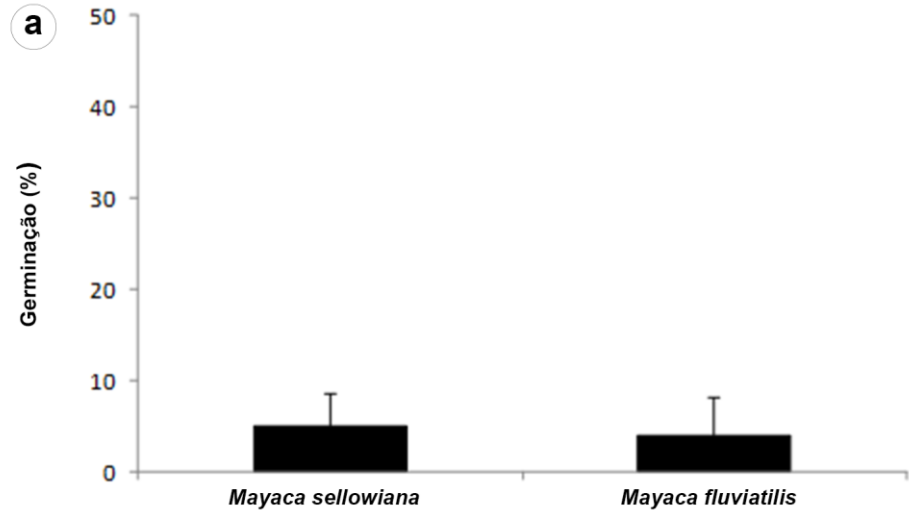


Fig. 2 Germinação acumulada de sementes de *Mayaca fluviatilis* submetidas a diferentes condições de secagem antes da embebição. **a** Sementes acondicionadas por 7 dias em saco de papel em temperatura ambiente. **b** Sementes submetidas a 60°C por 48 horas + 7 dias em saco de papel em temperatura ambiente. **c** Sementes submetidas a 60°C por 72 horas.

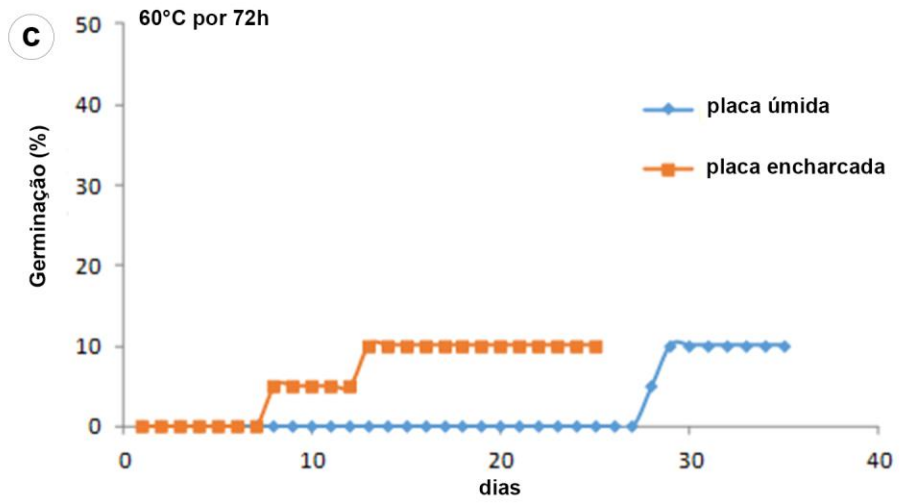
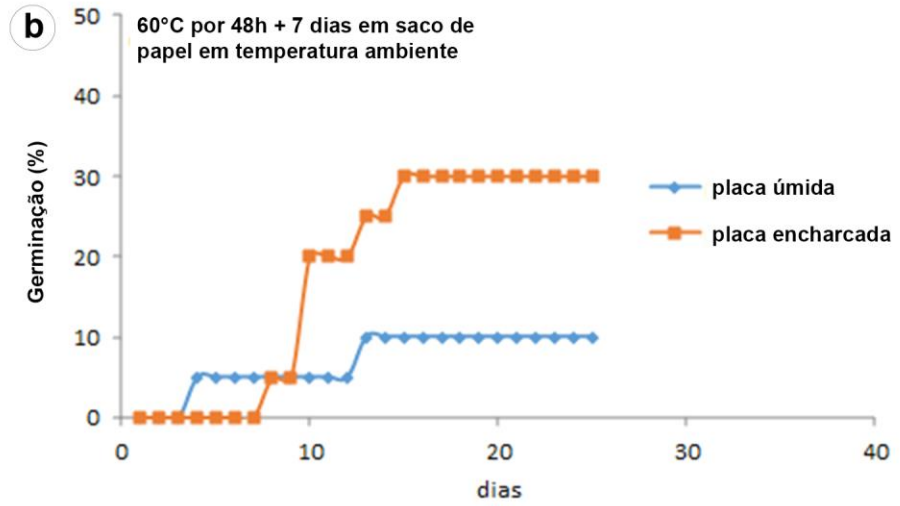
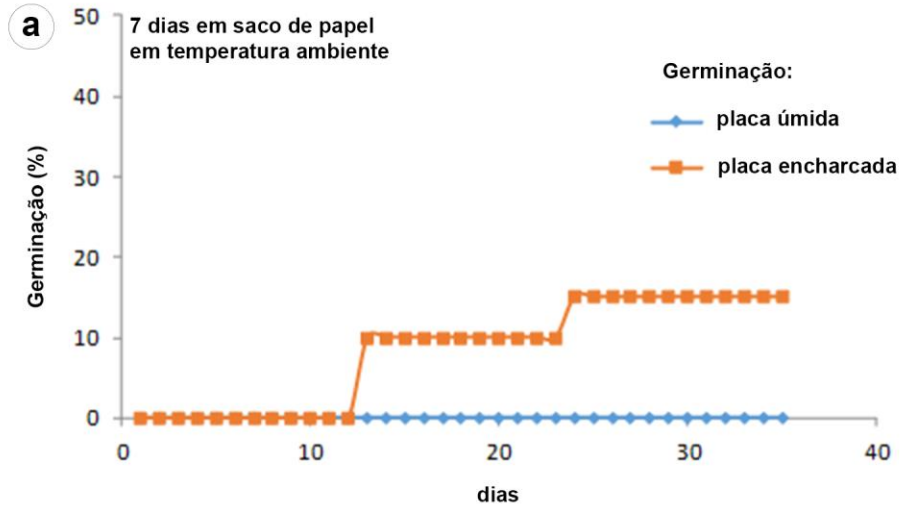


Fig. 3 Morfologia do desenvolvimento pós-seminal de *Mayaca sellowiana* (a, i) e *M. fluviatilis* (b-h). **a** Semente madura enegrecida e região micropilar de coloração clara. **b** Protrusão do coleóptilo. **c** Detalhe do afastamento dos tecidos do envoltório seminal na região micropilar. **d** Alongamento do mesocótilo e do lobo mediano da bainha do coleóptilo. **e** Diferenciação do colar de rizóides. **f-g** Alongamento do primeiro entrenó (asterisco) e desenvolvimento da raiz primária (cabeça de seta) e da primeira raiz adventícia a partir do mesocótilo. **h** Plântula submetida à alternância de luz (12 horas de luz e 12 horas de escuro), com mesocótilo e entrenós alongados. **i** Plântula exposta à luz constante, com mesocótilo e entrenós mais curtos. asterisco: entrenó; cabeça de seta: raiz primária; seta: região micropilar; cp: coleóptilo; cr: colar de rizóides; f: folha; lb: lobo mediano da bainha; mc: mesocótilo; ra: raiz adventícia. Barras: **a, b** 0,3 mm; **c-g** 0,11 mm; **h-i** 1,2 mm.

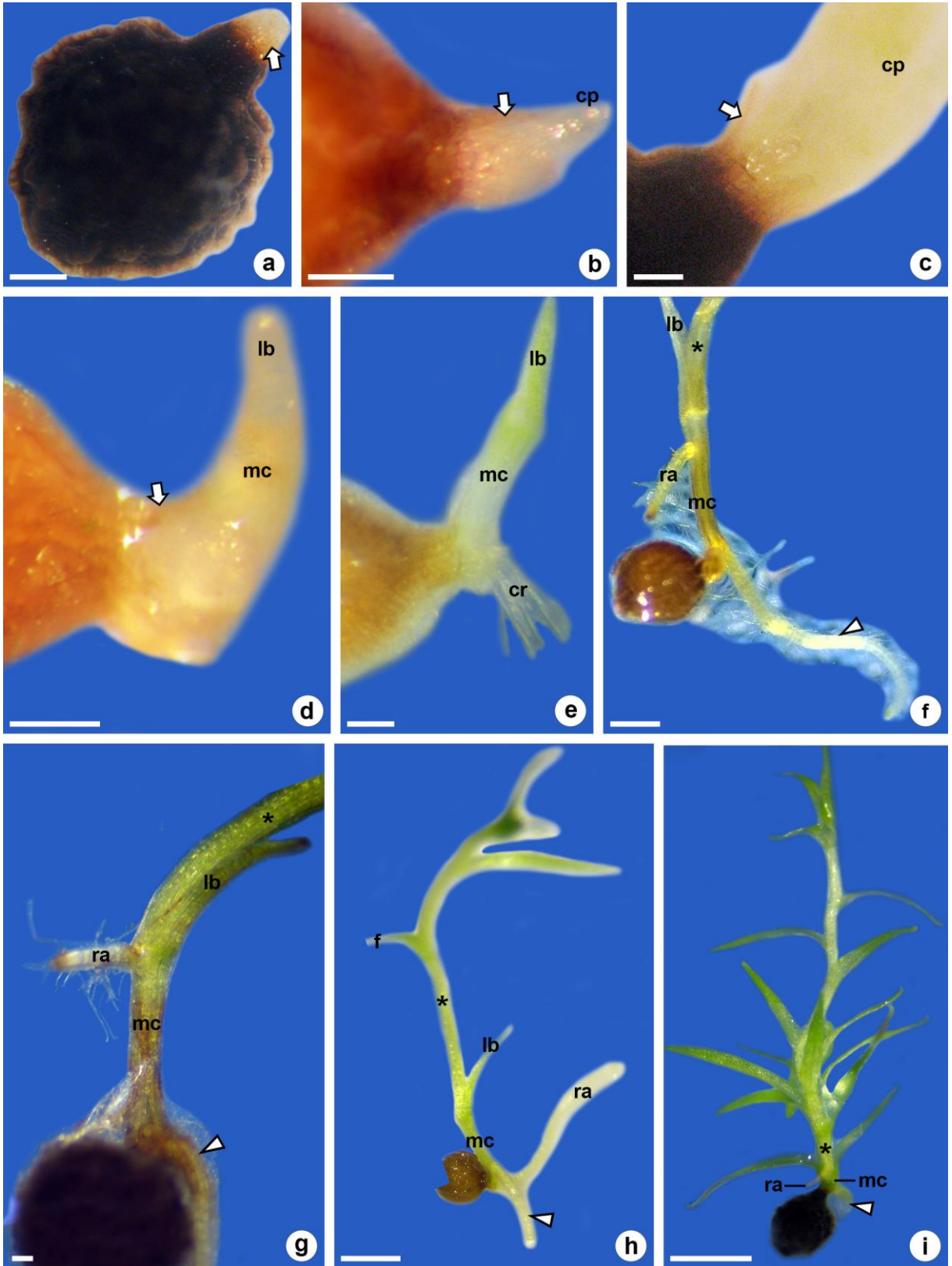


Fig. 4 Micromorfologia do desenvolvimento pós-seminal de *Mayaca fluviatilis*. **a** Semente madura. **b** Detalhe da região micropilar. **c-d** Afastamento dos tecidos do envoltório seminal na região micropilar devido à protrusão do coleóptilo. **e** Alongamento do coleóptilo. **f** Formação do mesocótilo, da primeira folha a partir do meristema apical do caule protegido por tricomas. **g** Diferenciação do colar de rizóides. **h** Alongamento do lobo mediano da bainha do coleóptilo. **i** Desenvolvimento do colar de rizóides. **j** Alongamento da primeira folha. **k** Desenvolvimento do mesocótilo e formação da primeira raiz adventícia **l** Alongamento do entrenó, envolvido em sua base pela bainha do coleóptilo. **m** Desenvolvimento das raízes adventícias. asterisco: entrenó; cabeça de seta: raiz primária; seta: região micropilar; cp: coleóptilo; cr: colar de rizóides; f: folha; lb: lobo mediano da bainha; mc: mesocótilo; ra: raiz adventícia. Barras: **a, i-j** 200 μm ; **b-h** 100 μm ; **k-m** 400 μm .

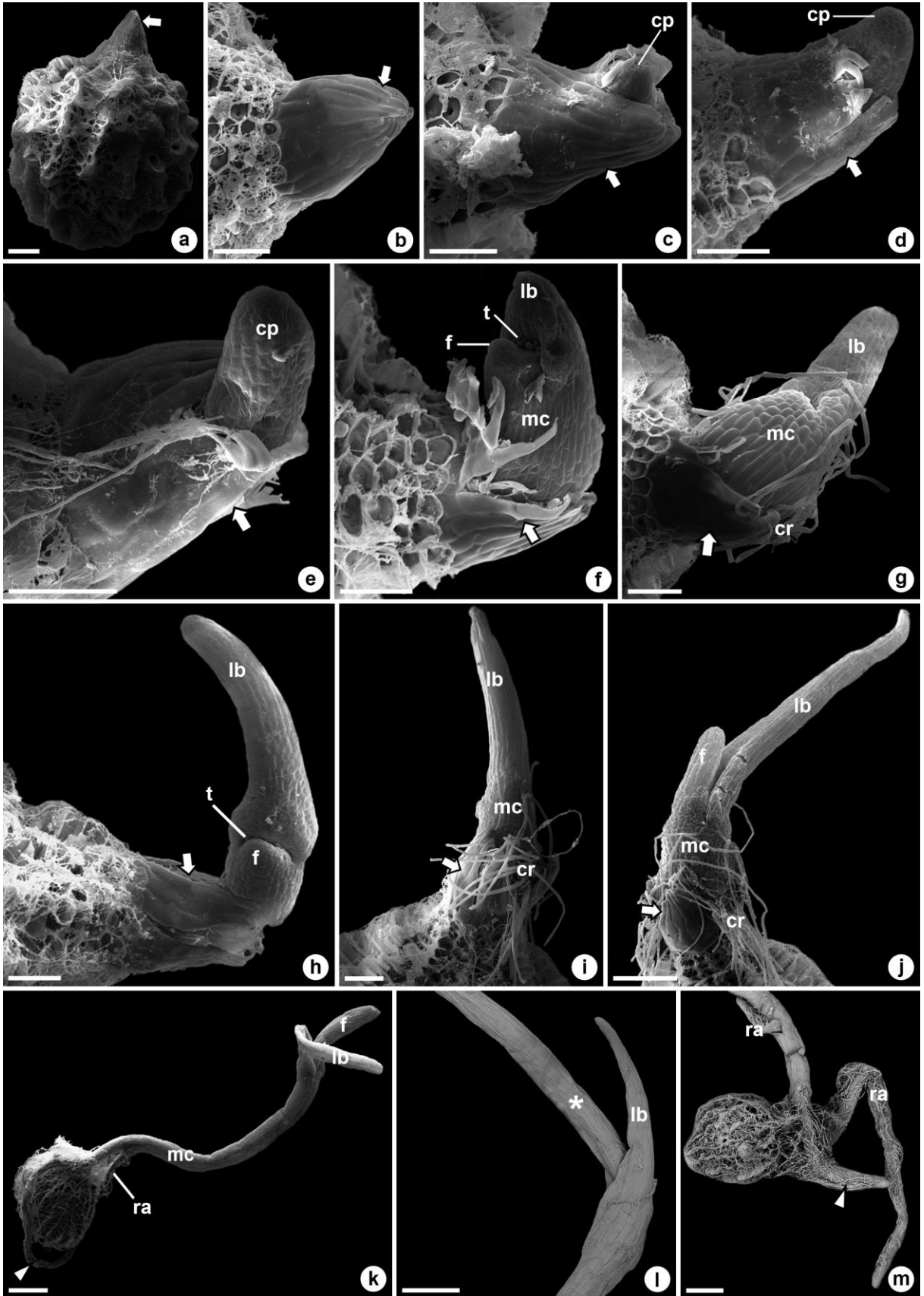


Fig. 5 Anatomia do desenvolvimento pós-seminal de *Mayaca sellowiana* (a, h-i, k-l) e *M. fluviatilis* (b-g, j, m-n). **a** Detalhe da região micropilar, anteriormente à germinação, formada pelo alongamento radial das células da endotesta, do exotégmen e do endotégmen. **b-d** Desenvolvimento do cotilédone dentro do canal micropilar e secreção de mucilagem pelas células do envoltório seminal que delimitam o canal; note hiperfilo haustorial. **e** Detalhe da região micropilar após a germinação. **f-g** Diferenciação do mesocótilo e formação do primeiro primórdio foliar no ápice do epicótilo; note tricomas protegendo o meristema apical do caule. **h-i** Alongamento do mesocótilo. **j-k** Formação de raízes adventícias. **l** Mesocótilo e meristema apical do caule com primórdios foliares. **m** Plântula submetida à alternância de luz (12 horas de luz e 12 horas de escuro), com mesocótilo e entrenós alongados. **n** Plântula exposta à luz constante, com mesocótilo e entrenós mais curtos. asterisco: entrenó; cabeça de seta: raiz primária; seta: região micropilar; cp: coleótilo; cr: colar de rizóides; f: folha; mac: meristema apical do caule; lb: lobo mediano da bainha; mc: mesocótilo; ra: raiz adventícia; t: tricomas. Barras: **a, e** 50 μm ; **b-d, f-l** 100 μm ; **m-n** 25 μm .

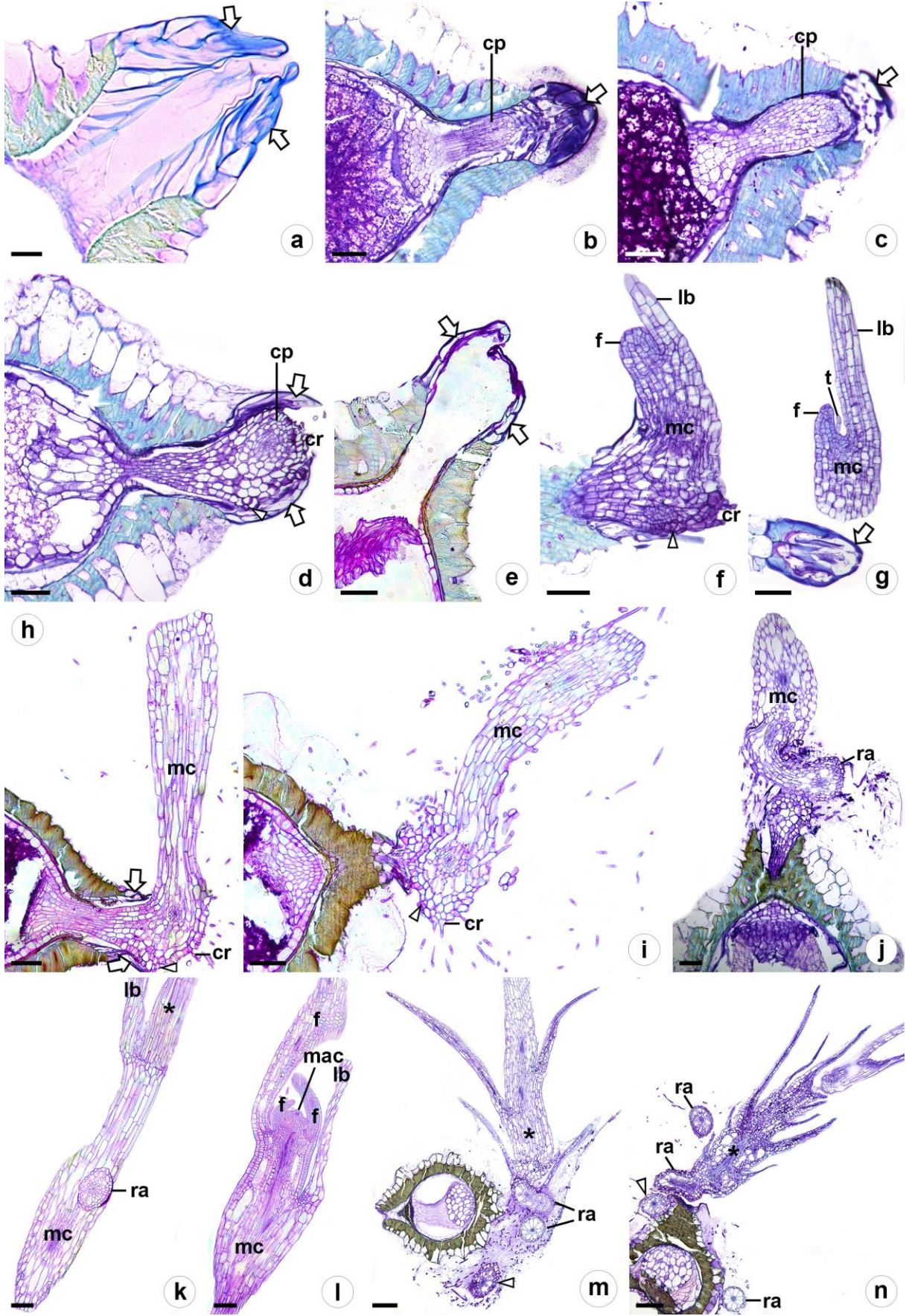


Fig. 6 Evolução do cotilédone em Poales com base na árvore de máxima verossimilhança obtida a partir de sequências de DNA plastidial (*ndhF*) e nuclear (*rbcL*). Os números indicados nos nós indicam os valores de bootstrap < 90.

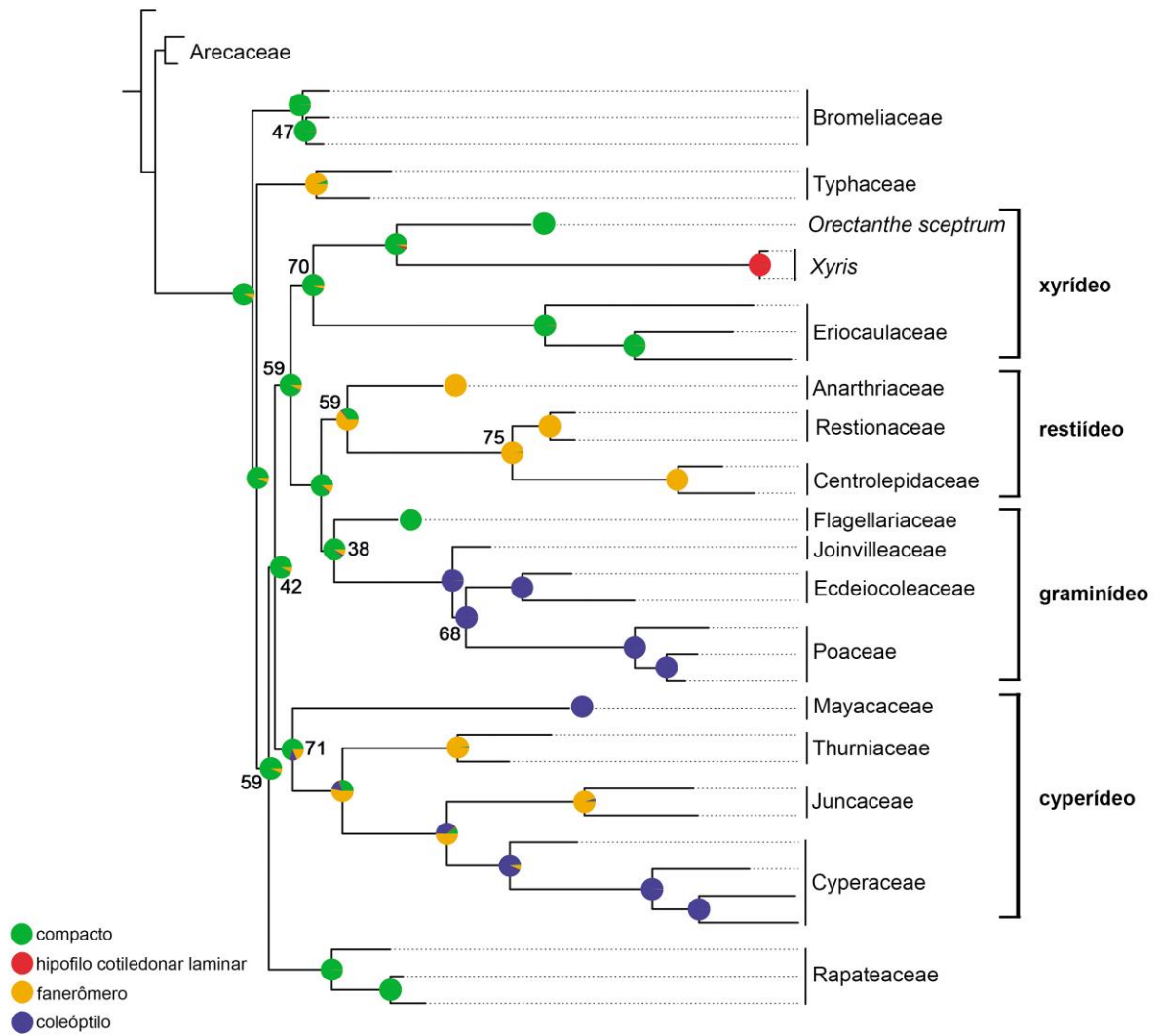


Tabela 1 Tempo para início da germinação e para surgimento das diferentes estruturas de plântulas em espécies de *Mayaca* (Mayacaceae)

	<i>Mayaca fluviatilis</i>	<i>Mayaca sellowiana</i>
Tempo para início da germinação (dias)	47	55
Tempo para surgimento das estruturas (em dias)		
Colar de rizóides	3	5
1ª folha	7	8
2ª folha	17	13
3ª folha	31	25
4ª folha	44	36
5ª folha	55	48
Raiz primária	8	9
1ª raiz adventícia	19	22

Tabela S1 Tabela de taxa, números de acesso para o GenBank de 36 espécies de Poales e 03 espécies de Arecaceae usadas como grupo-externo.

Taxon	<i>ndhF</i>	<i>rbcL</i>
ARECALES		
Arecaceae		
<i>Aphandra natalia</i> (Balslev & A.J.Hend.) Barfod	AY044532	AY044621
<i>Livistona speciosa</i> Kurz	AY044528	AY012463
<i>Mauritia flexuosa</i> L.f.	AY044524	AY012473
POALES		
Anarthriaceae		
<i>Anarthria prolifera</i> R.Br.	—	DQ307438
Bromeliaceae		
<i>Aechmea allenii</i> L.B.Sm.	L75897	L19978
<i>Pitcairnia corallina</i> Linden & André	AY438608	AY614387
<i>Tillandsia bergeri</i> Mez	L75898	AY614500
Centrolepidaceae		
<i>Aphelia cyperoides</i> R.Br.	—	GQ408939
<i>Centrolepis monogyna</i> (Hook.f.) Benth.	—	HQ182420
Cyperaceae		
<i>Bulbostylis barbata</i> (Rottb.) C.B.Clarke	AB261628	KY626977
<i>Carex pendula</i> Huds.	FM160522	KC584889
<i>Diplasia karatifolia</i> Rich. ex Pers.	FM160543	MF786304
<i>Isolepis cernua</i> (Vahl) Roem. & Schult.	AM999934	MG227786
Ecdeiocoleaceae		
<i>Ecdeiocolea monostachya</i> F.Muell.	—	AJ286559
<i>Georgeantha hexandra</i> B.G.Briggs & L.A.S.Johnson	EU832889	DQ307442
Eriocaulaceae		
<i>Eriocaulon aquaticum</i> (Hill) Druce	DQ188990	AF036877
<i>Lachnocaulon anceps</i> (Walter) Morong	EF394003	KY626777
<i>Syngonanthus flavidulus</i> (Michx.) Ruhland	DQ188989	KY627568
Flagellariaceae		
<i>Flagellaria indica</i> L.	AY465643	AF206769
Joinvilleaceae		
<i>Joinvillea plicata</i> (Hook.f.) Newell & B.C.Stone	EF422919	EF423010

Juncaceae

<i>Juncus acutus</i> L.	AM999975	HM850083
<i>Juncus effusus</i> L.	HQ181118	KT695546

Mayacaceae

<i>Mayaca fluviatilis</i> Aubl.	AY147770	HQ182438
---------------------------------	----------	----------

Poaceae

<i>Panicum maximum</i> Jacq.	AY029649	GU135169
<i>Panicum capillare</i> L.	AM849174	MG225969
<i>Sporobolus michauxianus</i> (Hitchc.) P.M. Peterson & Saarela	GU222706	MF597044

Rapateaceae

<i>Duckea flava</i> (Link) Maguire	AF207624	AF036884
<i>Rapatea paludosa</i> Aubl.	AF207623	MF786263
<i>Stegolepis hitchcockii</i> Maguire	AF207629	—

Restionaceae

<i>Elegia capensis</i> (Burm.f.) Schelpe	AM999976	AY881429
<i>Elegia fenestrata</i> Pillans	AF547016	AY881435
<i>Willdenowia incurvata</i> (Thunb.) H.P.Linder	—	KP110509

Thurniaceae

<i>Prionium serratum</i> (L.f.) Drège	EU832896	EU832959
<i>Thurnia sphaerocephala</i> (Rudge) Hook.f.	AY208986	MF786411

Typhaceae

<i>Sparganium eurycarpum</i> Engelm.	HQ181134	KJ841592
<i>Typha angustifolia</i> L.	U79230	GQ436381

Xyridaceae

<i>Orectanthe sceptrum</i> (Oliv.) Maguire	AY438616	AY123241
<i>Xyris caroliniana</i> Walter	—	KY627410
<i>Xyris jupicai</i> Rich.	AF547021	MF786442

Capítulo 4

Inferences on the gynoecium evolution in *Xyris* (Xyridaceae) based on floral anatomy and development

Kaire de Oliveira Nardi ^{(1)*}; Lisa M. Campbell ^(2,3); Aline Oriani ⁽¹⁾

⁽¹⁾Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brazil. kairenardi@gmail.com

^(2,3)The New York Botanical Garden, Bronx, New York 10458, USA. Present address: lmcampell2@gmail.com

✉ Kaire O. Nardi

*Corresponding author: kairenardi@gmail.com

Abstract

The floral anatomy and development of species belonging to all sections of *Xyris* (*Xyris*, *Nematopus* and *Pomatoxyris*) were comparatively studied to elucidate the gynoecium evolution in the genus, since placentation has been one the key characters in recognizing its taxonomic sections. Most of the species examined exhibit three peripheral groups of vascular bundles, and a central cylinder from which the carpellary bundles diverge. In the species of section *Pomatoxyris*, the ovary consists of a fertile synascidiate zone, whereas the symplicate zone is fertile in its lower portion or completely sterile. In the species of section *Xyris* the ovary has a short almost sterile synascidiate zone, whereas the symplicate zone is longer and fertile. In the ovary of the species of section *Nematopus*, the synascidiate zone is extremely short and sterile. Such differences are related to different patterns of gynoecium development. Considering the phylogeny of *Xyris*, the axile placentation is the most likely ancestral condition, from which parietal and free central placentation have derived by shortening and sterilization of the synascidiate zone and elongation of the fertile symplicate zone during the evolution of the genus. The basal placentation has derived from free-central placentation and appeared independently several times within the section *Nematopus*.

Key words: flower, ontogeny, ovary, placentation, vasculature.

INTRODUCTION

Xyridaceae include ca. 450 species and comprise two subfamilies: Abolbodoideae, including *Abolboda* Bonpl. (23 spp), *Achlyphila* Maguire & Wurdack (1 sp.), *Aratitiopea* Steyerl. & P.E. Berry (1 sp.), and *Orectanthe* Maguire (2 spp), restricted to South America, and Xyridoideae, represented by *Xyris* (ca. 400 spp), with a pantropical distribution (Kral, 1992, 1998; Campbell, 2004; Campbell *et al.*, 2009). These two subfamilies are very distinct morphologically and anatomically (Carlquist, 1960; Tomlinson, 1969; Kral, 1992, 1998; Rudall and Sajo, 1999; Campbell and Stevenson, 2005, 2007; Scatena *et al.*, 2011; Oriani and Scatena, 2012). Species are adapted to a variety of usually oligotrophic and seasonally humid habitats, such as savannas, bogs, and rocky outcrops (Kral, 1998; Campbell *et al.*, 2009).

The infrafamilial relationships in Xyridaceae are not well resolved (Campbell *et al.*, 2009). In the phylogenetic analysis of the family based exclusively on morphological data, the species appear grouped into two main clades, one of them including the species of *Xyris* and the other one including the species of the remaining genera (Campbell, 2004). In this last clade, *Achlyphila* is the first genus to diverge and, according to Campbell (2004), studies involving *Achlyphila disticha* Maguire & Wurdack, the only species of the genus, could be useful in the resolution of intergeneric relationships, since this species shares characters with representatives of both subfamilies.

In the most recent and large phylogenetic analysis of Poales, based on plastid sequences (*rbcL* e *ndhF*) and including four of the five genera of Xyridaceae (*Achlyphila* not included), the genera also appears grouped into two clades (Bouchenak-Khelladi *et al.*, 2017, pers. com.), recovering the results obtained in the morphological phylogeny by Campbell (2004).

Currently, *Xyris* species are circumscribed into three formal sections, based on morphology, including characteristics of the ovary such as the number of locules and

placentation type. *Xyris* sect. *Xyris* Endl. comprises species with unilocular ovary and parietal placentation; *Xyris* sect. *Nematopus* Seub. comprises species with unilocular ovary and free-central or basal placentation; and *Xyris* sect. *Pomatoxyris* Endl. comprises species with tri- or incompletely trilocular ovary and axile placentation (Doust and Conn, 1994). Within Abolbodoideae, species of *Abolboda*, *Aratitiopea* and *Orectanthe* have intrusive parietal placentation (Campbell and Stevenson, 2007; Oriani and Scatena, 2012). Although it has not been critically evaluated, placentation type has been emphasized in the taxonomy of *Xyris* (Endlicher, 1836; Conn and Doust, 1997).

Among the sections of *Xyris*, *Nematopus* is the most species-rich, including about 250 species, with a Neotropical distribution (Mota, 2014). *Xyris* sect. *Xyris* includes about 155 species distributed in tropical, subtropical, and temperate regions (Mota, 2014; Flora do Brasil, 2018). *Xyris* sect. *Pomatoxyris* comprises 18 species endemic to Australia (Conn and Doust, 1997).

In a recent phylogenetic analysis of *Xyris*, based on mitochondrial (*cox3* e *orf25*) and plastid data (*matK*, *ndhF* and *rbcL*), the genus and its three sections emerge as monophyletic, with high phylogenetic support (Mota, 2014). *Xyris* sect. *Pomatoxyris*, which comprises the Australian species, appears as the first diverging lineage, as sister to the American species included in the sections *Xyris* and *Nematopus* (Mota, 2014). In addition, species belonging to the section *Nematopus* appear grouped into seven clades named A, B, C, D, E and F (Mota, 2014).

The flowers of *Xyris* are heterochlamydeous, monoclinous, with the outer whorl of stamens reduced to trichomatous staminodes; the abaxial sepal is membranous, and the other two adaxial sepals are subopposite and keeled; the anthers are tetrasporangiate; and the ovary is superior, tricarpeal. They differ from the flowers of Abolbodoideae by the actinomorphic

symmetry; dialypetalous corolla; absence of trichomatous staminodes and stylar appendages; tripartite style; and orthotropous ovules (Kral, 1992, 1998; Oriani and Scatena, 2012).

An anatomical study of flowers of *Xyris asperula* Mart., *X. filifolia* L.A. Nilsson, *X. hymenachne* Mart., *X. macrocephala* Vahl., *X. paradisiaca* Wanderley, *X. seubertii* L.A. Nilsson and *X. veruina* Malme showed that the vascular supply of all floral parts diverge from four vascular complexes: three peripheral ones forming the sepal-petal-staminode complexes and a central one corresponding to the petal-stamen-carpel complex (Sajo *et al.*, 1997). More recently, Sajo *et al.* (2017) conducted a comparative study on floral anatomy of *Abolboda*, *Orectanthe* and *Xyris* and concluded that although the flower vascularization is different among these genera the gynoecium has three dorsal bundles that supply the ovary wall, style and stigmas, and many ventral bundles that supply the ovules.

Remizowa *et al.* (2012) analyzed the floral anatomy and development of *Xyris grandis* Ridl. (included in the *Xyris* sect. *Xyris*) and contributed with the information that the gynoecium is initiated as a solid triangular structure and that within the ovary, the placentae appear on the radii of the carpels. According to Remizowa *et al.* (2012), the ovary of *X. grandis* exhibits a short sterile synascidiate zone and a fertile symplicate zone, with parietal placentation. These authors also suggested that a greater focus should be given to the structure of the ovary in *Xyris* species because its characters are important for infrageneric classification.

Considering the wide morphological diversity in the gynoecium of Xyridaceae, the paucity of ontogenetic studies on this structure, and its taxonomic value, this study aimed to analyze the floral anatomy and development in species belonging to the three sections of *Xyris*, in a comparative approach, to understand the evolutionary processes that resulted in the different types of gynoecium found in the genus.

MATERIALS AND METHODS

Taxon sampling

The species studied are listed in the Table 1 and they were chosen for representing the three formally recognized sections of *Xyris*. The samples were field collected in FAA 50 (37% formaldehyde, glacial acetic acid, 50% ethanol, at 1:1:18 v/v, Johansen, 1940) and stored in 70% ethanol. Voucher specimens were deposited in the Herbarium Rioclarense (HRCB) of the Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, or in the Herbarium of the New York Botanical Garden (NY) and National Herbarium of the New South Wales (SYD).

Developmental and anatomical studies

We analyzed flowers from at least three inflorescences from each species. For scanning electron microscopy (SEM), the material was either dehydrated to 100% ethanol and rinsed in a hexamethyldisilazane (HMDS) series (33.3, 50.0, and 66.6% v/v in 100% ethanol), or dehydrated to 100% acetone and critically point dried (Denton Vacuum LLC, Moorestown, NJ). Samples were coated with gold-palladium in a sputter coating system (Hummer 6.2, Anatech USA, Union City, CA) and observed at 10 kV in a JEOL JSM-5410LV microscope (JEOL USA, Inc., Peabody, MA). Images were obtained using ORION software (ver. GA02870/1, ©2000–2004 JEOL USA, Inc.) and edited using Adobe Photoshop CS6.

For light microscopy (LM), the material was dehydrated in an ethanol alcohol series, embedded in glycolmethacrylate resin (Technovit 7100) and sectioned at 7-10 μm on a rotary microtome (Micron HM 355 and Leica RM 2245). The anatomical sections were stained with periodic acid–Schiff's reagent (PAS) and toluidine blue in 0.05% sodium borate (Feder and O'Brien, 1968) and mounted on permanent slides using Entellan® (Merck). The results were

documented by photomicrographs obtained with a Leica DM 4000B microscope fitted with a Leica DFC 450 capturing device and a digital imaging software (Leica Application Suite, version 4.0.0) and edited using Adobe Photoshop CS6.

Reconstruction of the ancestral character state

To analyze the evolution of placentation types within *Xyris*, character states were optimized in the phylogeny of Xyridaceae published by Mota (2014). The reconstruction of the ancestral character state was performed using the parsimony method in the software Mesquite 3.40 (Maddison and Maddison, 2018). The character states were coded as follows: axile: 0; intrusive-parietal: 1; parietal: 2; free-central: 3; basal: 4. To code the character states for the other genera of Xyridaceae, and Eriocaulaceae used as outgroup, the following references were consulted, respectively: Oriani and Scatena (2012) and Ramaswamy *et al.* (1983); for other species of *Xyris* we consulted Wanderley (2011).

RESULTS

Floral development

The floral primordia exhibit spiral arrangement in the inflorescence axis (Fig. 1A). Each floral primordium is covered by a bract (Fig. 1A). The sepals are the first organs to be initiated on the dome-shaped floral primordium; the two adaxial ones are initiated earlier, as triangular protuberances (Fig. 1A), and the third one is initiated later, as a bar-shaped bulge (Fig. 1B). Soon after the initiation of all sepals and alternating to them, three rounded protuberances appear, two abaxial and one adaxial (Fig. 1B). These protuberances enlarge and are divided by a constriction into an outer petal and an inner stamen (Figs. 1C-D, 3A-B, G-H). The adaxial petal-stamen protuberance is initiated first, followed by the two adaxial ones,

which are initiated at the same time as the three staminodes opposite to the sepals (Fig. 1B, 3G-H). Only in *Xyris ptariana* the staminodes are absent (Fig. 1D). The sepals and petals grow rapidly, have a broader base than the inner floral organs and encircle the floral bud, enclosing the developing stamens and staminodia (Figs. 1E-G, 2F, 3A-C). Concomitantly to the development of stamens and staminodes, the gynoecium is initiated with an enlargement of the floral meristem. Our results show some differences on the gynoecium development among the species studied (Fig. 1C-D).

In *Xyris ptariana*, *X. teinosperma* and *X. ustulata*, species belonging to the *Xyris* sect. *Pomatoxyris*, the gynoecium appears as a triangular-shaped structure (Fig. 1C-D). Three single hemispherical protuberances opposite to the sepals/staminodes extended in a transverse direction, corresponding to the apices of the carpels (Fig. 1G). Each carpel apex becomes horseshoe-shaped with a bulge on the dorsal side (Fig. 1E, H), and subsequently the carpels elongate to close the ovary (Fig. 1F, I). The placenta is not differentiated until the closure of ovary.

In *Xyris jupicai* (*Xyris* sect. *Xyris*), a tri-radiate groove in the centre of the young gynoecium appears (Fig. 2A) and enlarges (Fig. 2B) and three rounded placentae emerge on the commissural portion of carpels (Fig. 2C); the carpels elongate to close the ovary (Fig. 2D). In *Xyris fallax* (*Xyris* sect. *Xyris*), the gynoecium appears as a triangular-shaped structure (Fig. 2E); the placenta appears as a rounded bulge in the centre of carpels (Fig. 2F-G), which subsequently elongate to close the ovary (Fig. 2H). Three stigma primordia develop on the top of the ovary wall (Fig. 2I).

In *Xyris bialata* and *X. trachyphylla* (*Xyris* sect. *Nematopus*), species with free-central placentation, a central rounded protuberance appears at early stages of gynoecium development (Fig. 3A). The carpels are initiated as three triangular-shaped bulges (Fig. 3B-C)

that rapidly fuse forming an annular protuberance (Fig. 3D). The carpels elongate to close the ovary and three stigma primordia develop on the top of the ovary wall (Fig. 3E-F).

In *Xyris asperula*, *X. oblata*, and *X. pilosa* (*Xyris* sect. *Nematopus*), species with basal placentation, the gynoecium appears as a triangular central dome (Fig. 3G-H). The carpels are initiated as a ring surrounding a central rounded placenta (Fig. 3I). Contrary to the other species in which we could not identify the ovule primordia until the closure of ovary (Fig. 3J), in *X. oblata* the ovule primordia may be observed on the placenta at early stages of gynoecium development (Fig. 3K-L).

Three stigma branches are formed, initially as triangular mounds on the tips of the carpels (Fig. 4A). Each stigma branch extends upwards (Fig. 4B), become twisted and recurved (Fig. 4C-E).

The development of the stigma branches, style and ovary occur concomitantly (Fig. 4E-P). The style and ovary elongate by intercalary growth. Only *Xyris fallax* possess thichomes among their flower buds (Fig. 4N).

Floral vasculature

In most of the species studied, at the receptacle, four groups of vascular bundles are formed: a central group corresponding to the petal-stamen-carpel complex (encircled in yellow), and three peripheral groups forming the sepal-petal-staminode complex (encircled in red) (Fig. 5A). Each peripheral group supplies a sepal, a staminode and two adjacent petals (petal lateral traces) (Fig. 5A-F).

From the central group the petal-stamen traces diverge (Fig. 5B) and subsequently split into the petal median bundle and the stamen bundle (Fig. 5C). Thus, each petal is supplied by three vascular traces: a median one originated from the central group and two lateral ones originated from the peripheral groups (Fig. 5B-F). The remaining bundles of the

central group supply the gynoecium. Three dorsal carpellary traces diverge opposite to the sepals and staminodes (Fig. 5D), whereas the remaining bundles corresponding to the ventral carpellary bundles (Fig. 5D-F) supply the ovules.

Only in *Xyris ustulata* the vascular bundles are organized into two rings at the flower receptacle (Fig. 6A-B). From the outer ring the traces of sepal, petal (lateral traces) and staminodes diverge (Fig. 6A-F). Each petal receives four lateral traces (Fig. 6C-D). From the inner ring (encircled in yellow) (Fig. 6B) the petal median-stamen traces diverge (Fig. 6C-E), followed by the divergence of the dorsal carpellary bundles (Fig. 6F). The remaining bundles correspond to the ventral carpellary bundles and supply the ovules.

Placentation types

In the species of *Xyris* sect. *Pomatoxyris*, we can observe the ovules attached to an axile placenta under scanning electron microscopy (Fig. 7). In ovaries at successive developmental stages of *Xyris ptariana* (Fig. 7A-D) we can also observe the ovule development: the inner integument develops before than the outer integument (Fig. 7B), which grows reaching the inner integument and forming the micropyle (Fig. 7C), followed by the elongation of funicle (Fig. 7D). In the three studied species of *X.* sect. *Pomatoxyris* the synasciadiate zone of the ovary is fertile. The ovules are attached to the axile placenta throughout the ovary in *X. ptariana* (Fig. 7A-E), and restrict to the ovary lower portion in *X. teinosperma* (Fig. 7G).

The Figure 8 presents serial cross sections trough the ovary of *X. ptariana*, *X. ustulata* and *X. teinosperma*, showing the fertile synasciadiate zone (Fig. 8A, C-D, G) and the symplicate zone (Fig. 8B, E, F, H), which is fertile in *X. ustulata* (Fig. 8E) and sterile in *X. ptariana* (Fig. 8B) and *X. teinosperma* (Fig. 8H). In *X. ptariana* the fertile synasciadiate zone (Fig. 8A) is much longer than the very short sterile symplicate zone (Fig. 8B), whereas in

Xyris ustulata the fertile synascidiate zone (Fig. 8C-D) is slightly longer than the symplicate zone, which is also fertile in its lower portion (Fig. 8E). On the other hand, in *Xyris teinosperma* the fertile synascidiate zone (Fig. 8G) is smaller than the sterile symplicate zone (Fig. 8H).

In the species of *Xyris* sect. *Xyris*, the symplicate zone is much longer than the synascidiate zone (Fig. 9A-D). The lower portion of the short synascidiate zone is sterile (Fig. 10A), and the upper portion is fertile (Fig. 10B, D). In *Xyris jupicai*, with parietal placentation (Fig. 9A-C, L), the symplicate zone is completely fertile (Fig. 10C). In *Xyris fallax*, only the lower portion of the symplicate zone is fertile (Fig. 10E), whereas the upper portion is sterile (Fig. 10F), characterizing a parietal-basal placentation (Fig. 9D).

In the species of *Xyris* sect. *Nematopus*, the symplicate zone is also much longer than the synascidiate zone (Fig. 9E-K). At early stages of ovary development both *Xyris trachyphylla* and *X. pilosa* have a central ovule-bearing column (Fig. 9E-I); however only in *Xyris trachyphylla* this column extends up and the ovules are attached along this central column, characterizing the free-central placentation (Fig. 9F-H, M). Under light microscopy, we can observe the extremely reduced and sterile synascidiate zone (Fig. 11A), and the fertile symplicate zone, with the central column (Fig. 11B-C). In *X. pilosa* the ovules are attached to the base of ovary (Fig. 9J-K, N). Such as *X. trachyphylla* the gynoecium of this species has an extremely reduced and sterile synascidiate zone (Fig. 11D) and a fertile symplicate zone (Fig. 11E-F).

Character evolution

The ancestral character-state reconstruction shows that the axile placentation is the most likely state at the base of Xyridaceae, also presents in the outgroup, Eriocaulaceae (Fig. 12). The intrusive-parietal placentation appeared in the most recent ancestor of *Abolboda* and

Orectanthe (Abolbodoideae), whereas parietal placentation most probably appeared in the most recent ancestor of *Xyris* sect. *Xyris* (Fig. 12). The free-central placentation is the most likely state at the base of *Xyris* sect. *Nematopus*, from which the basal placentation derived independently several times within the section (Fig. 12).

DISCUSSION

The floral vasculature pattern herein described for most of the species studied is similar to that observed in other species of *Xyris* (Sajo *et al.*, 1997, 2017) and in species of *Abolboda* with staminodes (Sajo *et al.*, 2017), in which a central cylinder and three peripheral vascular groups are formed in the pedicel by the joining of the vascular traces from all floral parts. Only *Xyris ustulata* differs from the remaining species of *Xyris* due to the presence of an outer ring of vascular bundles in the pedicel, from which the traces of sepal, petal (lateral traces) and staminodes diverge, similar to *Orectanthe* (Sajo *et al.*, 2017).

Xyris ustulata is also differentiated from other species of *Xyris* by the number of vascular traces that each petal receives, namely five in *X. ustulata* and three in the remaining species. Within Abolbodoideae, each petal in *Achlyphila* also receives three vascular traces, but in *Abolboda*, *Aratitiopea* and *Orectanthe* each petal receives five to several vascular traces. The presence of many vascular traces supplying each petal can be explained by the size of flowers, since larger flowers tend to have more vascular bundles (Endress, 1994). At organ initiation the floral size may be relatively similar in small and large flowers; as a rule, at first a simple median vascular bundle is formed in each organ, and later, secondary bundles may develop in lesser or greater numbers depending on the flower size (Endress, 1994).

In buds there is a conflict between the tendency of single organs to expand and the tendency of the entire bud to keep the organs in a restricted space (Endress, 1994). There is

always dense packing in bud with minimal space between organs, as reported in other Poales such as Cyperaceae (Monteiro *et al.*, 2017), Restionaceae (Decraene *et al.*, 2002) and Poaceae (Phillipson, 1985), whose flowers are grouped in congested inflorescences.

In some species, hairs are used as “packing material” in the free space between the organs, and may be long or short depending on the amount of free space (Endress, 1994). In some cases, organ packing is not tight but the young organs are immersed in a protective fluid (Endress, 1994).

In Xyridaceae, only *Xyris fallax* possess trichomes among the flower buds, which probably secrete mucilage. The presence of mucilage-secreting trichomes has also been reported in flowers of Rapateaceae in which they probably allow gliding of flowers and floral parts over each other during growth (Oriani and Scatena, 2013; Ferrari and Oriani, 2017). Another hypothesis is that the presence of a mucilage covering the floral parts probably plays a protective role against fungi since these species occur in humid habitats.

In relation to the gynoecium, while its vasculature pattern is similar in all of the studied species of *Xyris*, its development shows a remarkable variation related to the different placentation types.

While in the species of *Xyris* sect. *Pomatoxyris* the synascidiate zone of gynoecium develops firstly with axile placentae, in the species of *Xyris* sect. *Xyris*, with parietal placentation, the synascidiate zone is reduced and the placentae are formed on the commissural portion of carpels in the symplicate zone at early stages of gynoecium development. In species of *Xyris* sect. *Nematopus* a rounded protuberance appears at the centre of ovary at early stages of development, and corresponds to the placenta in the species with basal placentation, or later develops into a central column, in species with free-central placentation.

During the evolution of the angiosperms, the parietal and free-central placentation probably derived from the axile placentation, whereas the basal placentation may be derived from the free-central, axile or parietal placentation (Weberling, 1989). Developmental and anatomical studies in Caryophyllaceae (Caryophyllales) and Primulaceae (Ericales) demonstrate clearly that parietal placentation is derived from the axile placentation in these families (Eames, 1961). According to Eames (1961), the central placenta consists typically of the fused placentae and ventral margins of the united carpels, freed from the dorsal section by loss of the lateral walls, which connected them.

In some genera of the Caryophyllaceae and Portulacaceae (Caryophyllales), axile placentation is transformed during development of the flower into free central in which the lateral walls of the carpels break down, leaving the united placental areas free, except at the base (Eames, 1961). We did not observe the same ontogenetic process in *Xyris trachyphylla*, with free-central placentation, but its gynoecium exhibits a very short and sterile synascidiate zone and a long and fertile symplicate zone.

The basal placentation, in which the ovules borne directly at the base of the locule, may be a result of reduction from free central placentation (Weberling, 1989), as found here in *Xyris pilosa*. Therefore, our results are in agreement with the evolutionary hypothesis of the gynoecium. Our analysis of ancestral character state reconstruction shows that the axile placentation is the ancestral condition in *Xyris* and probably shifts to parietal placentation in *Xyris* sect. *Xyris* and to free-central placentation in *Xyris* sect. *Nematopus*. The basal placentation has derived from free-central placentation and appeared several times within the section *Nematopus*.

The axile-basal placentation reported in *Xyris teinosperma* may indicate a transitional condition between axile and basal placentation, whereas the parietal-basal placentation reported in *X. fallax* may indicate a transitional condition between parietal and basal

placentation. The basal position of the ovules probably allowed an increase in the size of the ovules during the evolution of the genus, as observed in the studied species.

In Abolbodoideae the types of placentation is controversy. The ovary of *Abolboda* and *Orectanthe* has been described as trilocular and containing ovules with axile placentation (Smith and Downs, 1968; Kral 1992, 1998); however, Oriani and Scatena (2012) demonstrated that the ovary in these genera is unilocular, with an intrusive parietal placentation given that the carpels' septa are not fused in the central region of the ovary. Intrusive-parietal placentation can also be observed in anatomical sections of the ovary of *Achlyphila* (Carlquist, 1960) and in *Aratitiopea*, whose ovary has numerous anatropous ovules born on intruded placentae (Campbell and Stevenson, 2007). According to Campbell and Stevenson (2007), a trilocular ovary with intruded placentae is common but not uniform within the family, and is usually described as axile placentation. We suggest that although the synascidiate zone is present in the lower portion of the ovary, the placentation is of the intrusive-parietal type, since the symplicate zone longer and fertile. Thus, intrusive parietal placentation can be pointed out as a synapomorphy of Abolbodoideae.

Since the axile placentation is the most likely ancestral condition in Xyridaceae, intrusive-parietal, parietal and free-central placentation have derived from this type by the shortening and sterilization of the synascidiate zone and elongation of the fertile symplicate zone during the evolution of the family. The basal placentation has derived from free-central placentation and evolved independently several times within *Xyris* sect. *Nematopus*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (process n°. 160640/2014-8 to K.O.N) and CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PDSE process n°. 88881.132211/2016-01 to K.O.N and PNPd to A.O.) for

financial support. We also thank the New York Botanical Garden where we performed part of this work.

REFERENCES

- Campbell LM. 2004.** Anatomy and systematics of Xyridaceae, with special reference to *Aratitiopea* Steyererm. & P.E. Berry. Doctoral thesis. The City University of New York, New York, United States of America.
- Campbell LM, Stevenson DW. 2005.** Vegetative anatomy of *Aratitiopea lopezii* (Xyridaceae). *Acta Botanica Venezuelica* **28**: 395-407.
- Campbell LM, Stevenson DW. 2007.** Inflorescence architecture and floral morphology of *Aratitiopea lopezii* (Xyridaceae). *Aliso* **23**: 227-233.
- Campbell LM, Wanderley MGL, Oliveira G. 2009.** *Xyridaceae. Neotropikey: interactive key to the flowering plants of the Neotropics*. Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey.htm>.
- Carlquist S. 1960.** Anatomy of Guayana Xyridaceae: *Abolboda*, *Orectanthe* and *Achlyphila*. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **10**: 65–117.
- Conn BJ, Doust AN. 1997.** *Xyris* L. Section *Pomatoxyris* Endl. (Xyridaceae) in Australia. *Australian Systematic Botany* **10**: 189-248.
- Decraene LPR, Linder HP, Smets EF. 2002.** Ontogeny and evolution of the flowers of South African Restionaceae with special emphasis on the gynoecium. *Plant Systematics and Evolution* **231**: 225-258.
- Doust AN, Conn BJ. 1994.** *Xyris* L. section *Xyris* (Xyridaceae) in Australia. *Australian Systematic Botany* **7**: 455-484.
- Eames AJ. 1961.** *Morphology of the Angiosperms*. McGraw-Hill Co., New York.
- Endlicher SL. 1836-40.** *Genera Plantarum: secundum ordines naturales disposita*. Fr. Beck, Wien.
- Endress PK. 1994.** *Diversity and Evolutionary Biology of Tropical Flowers*. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Feder N, O'Brien TP. 1968.** Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* **55**: 123-142.

- Ferrari RC, Oriani A. 2017.** Floral anatomy and development of *Saxofridericia aculeata* (Rapateaceae) and its taxonomic and phylogenetic significance. *Plant Systematics and Evolution* **303**: 187-201.
- Flora do Brasil. 2018.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB130430>.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. Mc Graw-Hill, New York.
- Kral R. 1992.** A treatment of American Xyridaceae exclusive of *Xyris*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **79**: 819-885.
- Kral R. 1998.** Xyridaceae. In: Kubitzki, K. eds. *The families and genera of vascular plants. IV. Flowering plants. Monocotyledons: Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae)*. Berlin: Springer, 461-469.
- Maddison WP, Maddison DR. 2018.** Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.4005. <http://mesquiteproject.org/>
- Monteiro MM, Oriani VL, Scatena VL. 2017.** Comparative floral anatomy of *Rhynchospora consanguinea* and *Rhynchospora pubera* (Cyperoideae, Cyperaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **303**: 283-297.
- Mota NFO. 2014.** *Filogenia e diversidade de Xyridaceae Neotropicais, com ênfase no gênero Xyris*. Doctoral thesis. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
- Oriani A, Scatena VL. 2012.** Floral anatomy of xyrids (Poales): contributions to their reproductive biology, taxonomy and phylogeny. *International Journal Plant Sciences* **173**: 767-779.
- Oriani A, Scatena VL. 2013.** The taxonomic value of floral characters in Rapateaceae (Poales-Monocotyledons). *Plant Systematics and Evolution* **299**: 291-303.
- Phillipson, WR. 1985.** Is the grass gynoeceum monocarpellary? *American Journal of Botany* **72**:1854-1961.
- Ramaswamy SN, Arekal GD, Raju MV. 1983.** Developmental anatomy of seed coat and pericarp in two species of *Eriocaulon* L. (Eriocaulaceae). *Bulletin of Torrey Botanical Club* **110**: 287-291.
- Remizowa MV, Kuznetsov AN, Kuznetsova SP, Rudall PJ, Nuraliev MS, Sokoloff DD. 2012.** Flower development and vasculature in *Xyris grandis* (Xyridaceae, Poales); a case study for examining petal diversity in monocot flowers with a double perianth. *Botanical Journal of the Linnean Society* **170**: 93-111.

- Rudall PJ, Sajo MG. 1999.** Systematic position of *Xyris*: flower and seed anatomy. *International Journal Plant Sciences* **160**: 795-808.
- Sajo MG, Oriani A, Scatena VL, Rudall PJ. 2017.** Floral ontogeny and vasculature in Xyridaceae, with particular references to staminodes and stylar appendages. *Plant Systematics and Evolution* **303**: 1293-1310
- Sajo MG, Wanderley MGL, Menezes NL. 1997.** Observações anatômicas sobre a vascularização floral em *Xyris* L. (Xyridaceae). *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* **16**: 15-19.
- Scatena VL, Formiga CC, Oriani A. 2011.** On the taxonomic value of the anatomical structure of vegetative organs and inflorescence axis of *Abolboda* species (Xyridaceae - Poales). *The Journal of the Torrey Botanical Society* **138**: 381-390.
- Smith LB, RJ Downs 1968** Xyridaceae. In: Teixeira, AR. eds. *Flora Brasílica*. Vol 9. Instituto de Botânica, São Paulo, 1–215.
- Tomlinson PB. 1969.** Commelinales-Zingiberales. In: Metcalfe CR. eds. *Anatomy of the monocotyledons*. Clarendon Press, Oxford, 92-127.
- Wanderley MGL. 2011.** Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Xyridaceae. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* **29**: 69-134
- Weberling F. 1989.** *Morphology of flowers and inflorescences*. Cambridge University. Press: Cambridge.

ILUSTRATIONS

Fig 1. Early stages of flower development in *Xyris asperula* (A) (*Xyris* sect. *Nematopus*), *X. fallax* (B) (*Xyris* sect. *Xyris*), *X. teinosperma* (C, G-I) and *X. ptariana* (D-F) (*Xyris* sect. *Pomatoxyris*), under scanning electron microscopy. (A) Inflorescence axis with floral primordia (B) Three rounded protuberances appear, two abaxial and one adaxial (asterisk) (C) Protuberances enlarge and are divided by a constriction into an outer petal and an inner stamen, and the gynoecium appears as a triangular-shaped structure (D) The staminodes are absent (E-F) The sepals and petals grow rapidly and encircle the floral bud, enclosing the developing stamens; the sepals were removed (G) Three single hemispherical protuberances opposite to the sepals/staminodes extended in a transverse direction, corresponding to the apices of the carpels (H) Each carpel apex becomes horseshoe-shaped with a bulge on the dorsal side (I) The carpels elongate to close the ovary. Abbreviations: b, bract; c, carpel; p, petal; s, sepal; st, stamen; stn, staminode; triangle: staminode primordium. Scale bars = 20 μm .

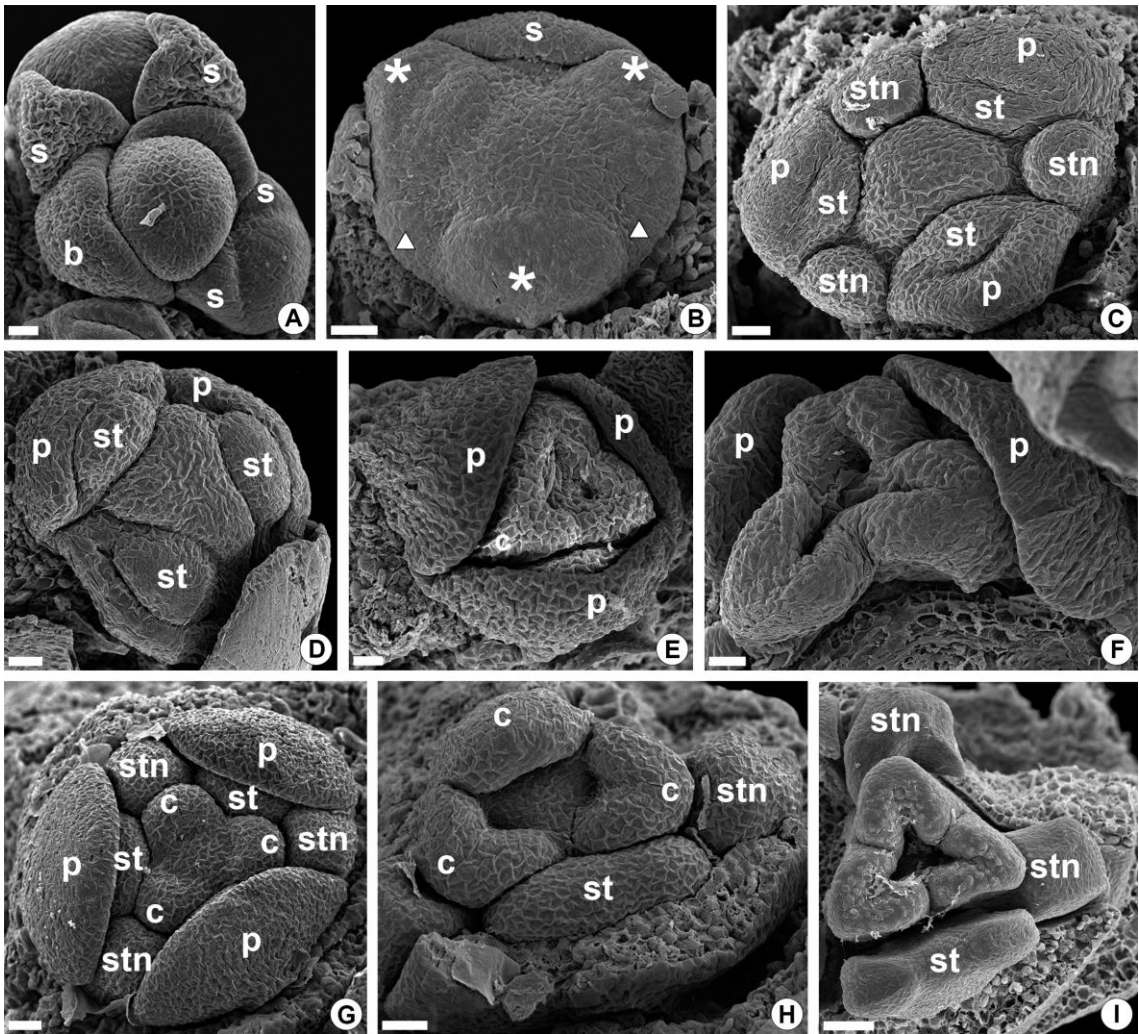


Fig 2. Early stages of flower development in *Xyris jupicai* (A-D) and in *X. fallax* (E-I) (*Xyris* sect. *Xyris*), under scanning electron microscopy. (A) A tri-radiate groove in the centre of the young gynoecium appears (B) The tri-radiate groove elongates (C) Three rounded placentae emerge on the commissural portion of carpels (D) The carpels elongate to close the ovary (E-F) The gynoecium appears as a triangular protuberance (G) The ovary wall extends up surrounding a central placenta (H) The carpels elongate to close the ovary (I) Three stigmas appear on the tip of the carpels. Abbreviations: b, bract; c, carpel; p, petal; s, sepal; st, stamen; stn, staminode. Scale bars = 20 μ m.

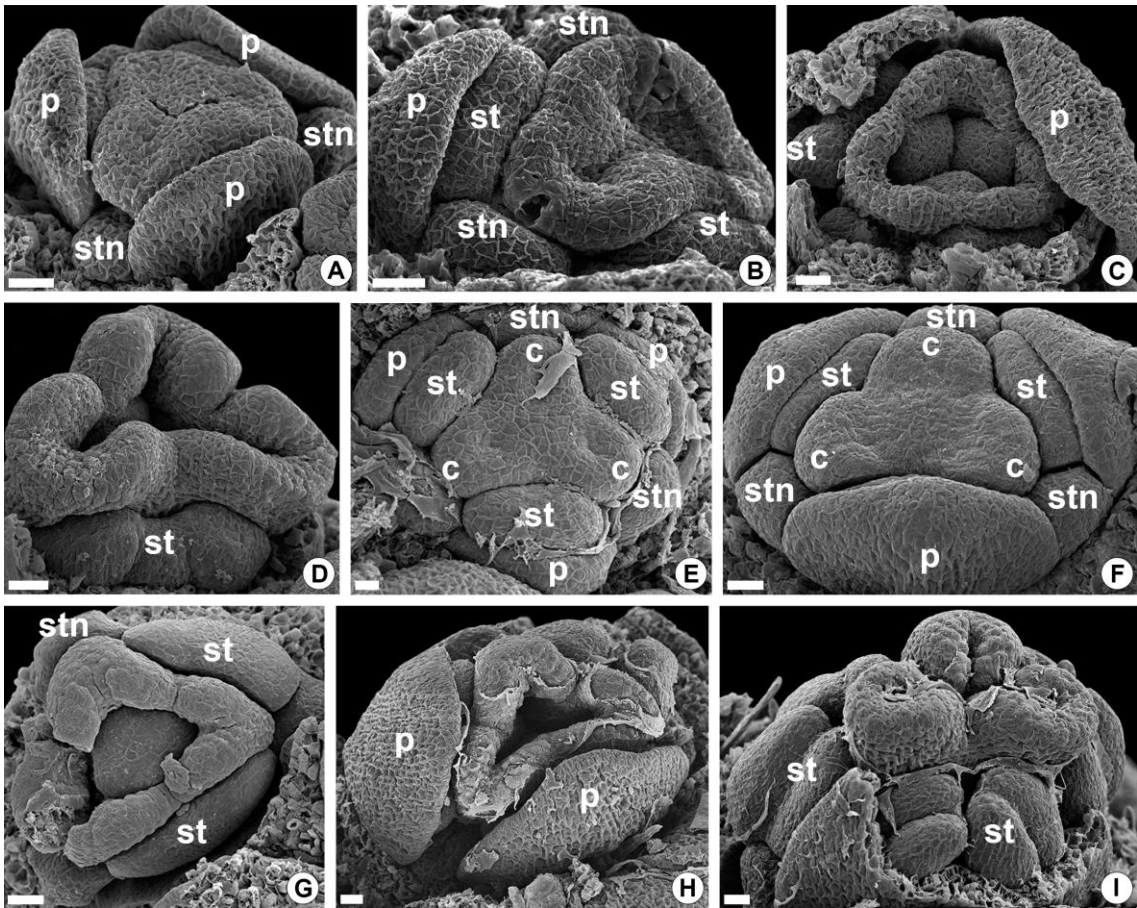


Fig 3. Early stages of flower development in *Xyris trachyphylla* (A-F) and in *X. asperula* (G-J) and *X. oblata* (*Xyris* sect. *Nematopus*) (K-L), under scanning electron microscopy. (A) A central rounded protuberance appears at early stages of gynoecium development (B-C) The carpels are initiated as three triangular-shaped bulges (D) During the development, the carpels fuse forming an annular protuberance (E-F) Later, the carpels elongate to close the ovary and the stigmas are differentiated (G) The adaxial petal-stamen primordium (asterisk) is initiated first, followed by the two adaxial ones, which are initiated at the same time as the staminodes (triangle) (H) The gynoecium appears as a triangular central dome (I) The carpels are initiated as a ring surrounding the central rounded placenta (J) The ovary wall extends up (K-L) Ovule primordia are formed on the placenta at early stages of gynoecium. Abbreviations: asterisk: petal-stamen primordium; b, bract; c, carpel; ov, ovule; p, petal; s, sepal; st, stamen; stn, staminode. Scale bars: A-B, G-K = 20 μm ; C-F = 50 μm .

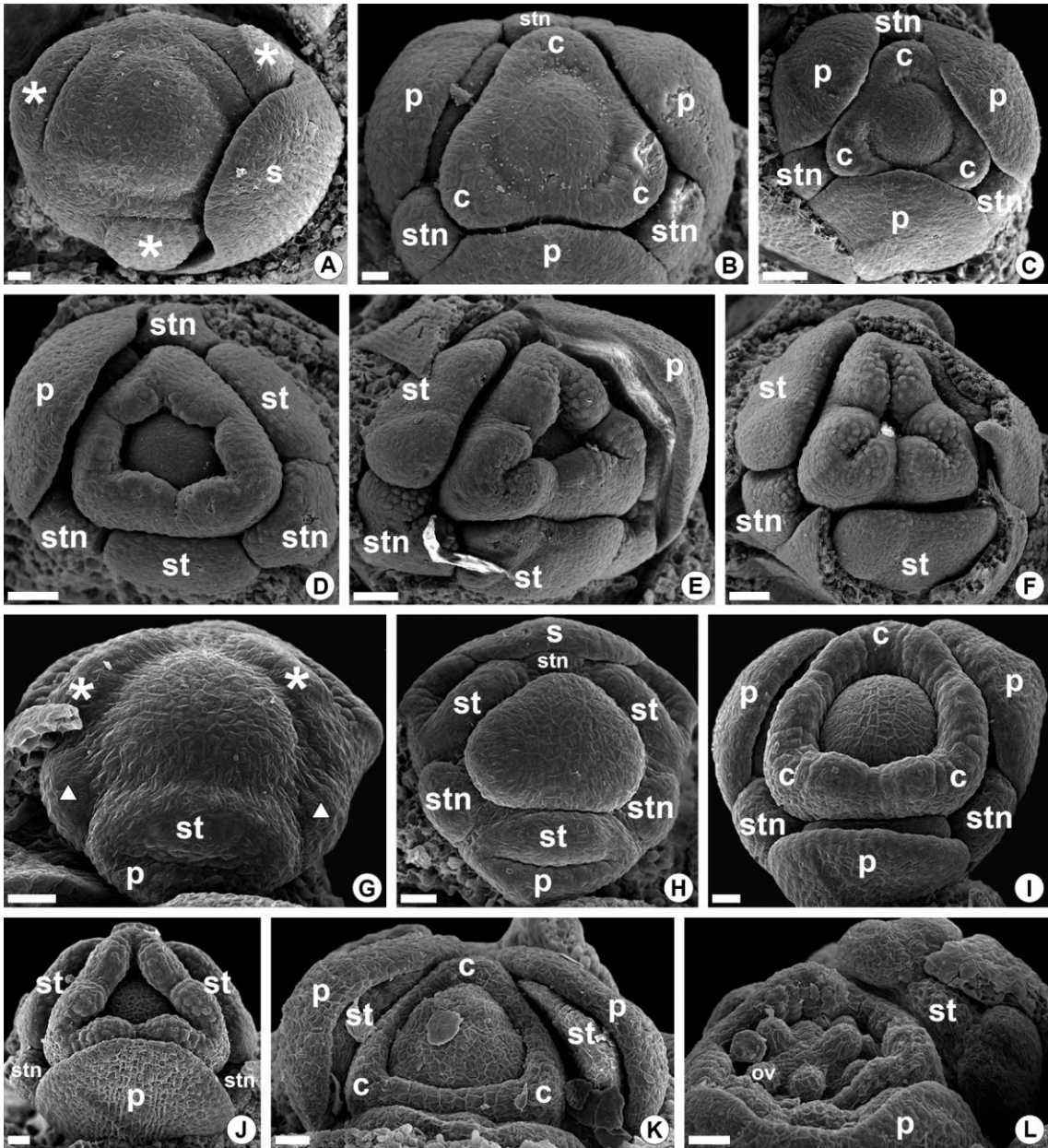


Fig 4. Successive stages of flower development in *Xyris pilosa* (A, C), *X. fallax* (B, N-O), *X. asperula* (D), *X. oblata* (E), *X. ptariana* (F), *X. trachyphylla* (G-H, M), *X. jupicai* (I-L) and *X. bialata* (P), under scanning electron microscopy. (A) Three stigma branches are formed, initially as triangular mounds on the tips of the carpels (B-F) Each stigma extends up and become twisted and recurved (G-P) The stigmas, style and ovary elongate concomitantly. Abreviattions: petal; st, stamen; stn, staminode; t: trichomes; arrow: boundary between ovary and style. Scale bars: A-D = 20 μm ; E-K, N = 50 μm ; L-M, O-P = 100 μm .

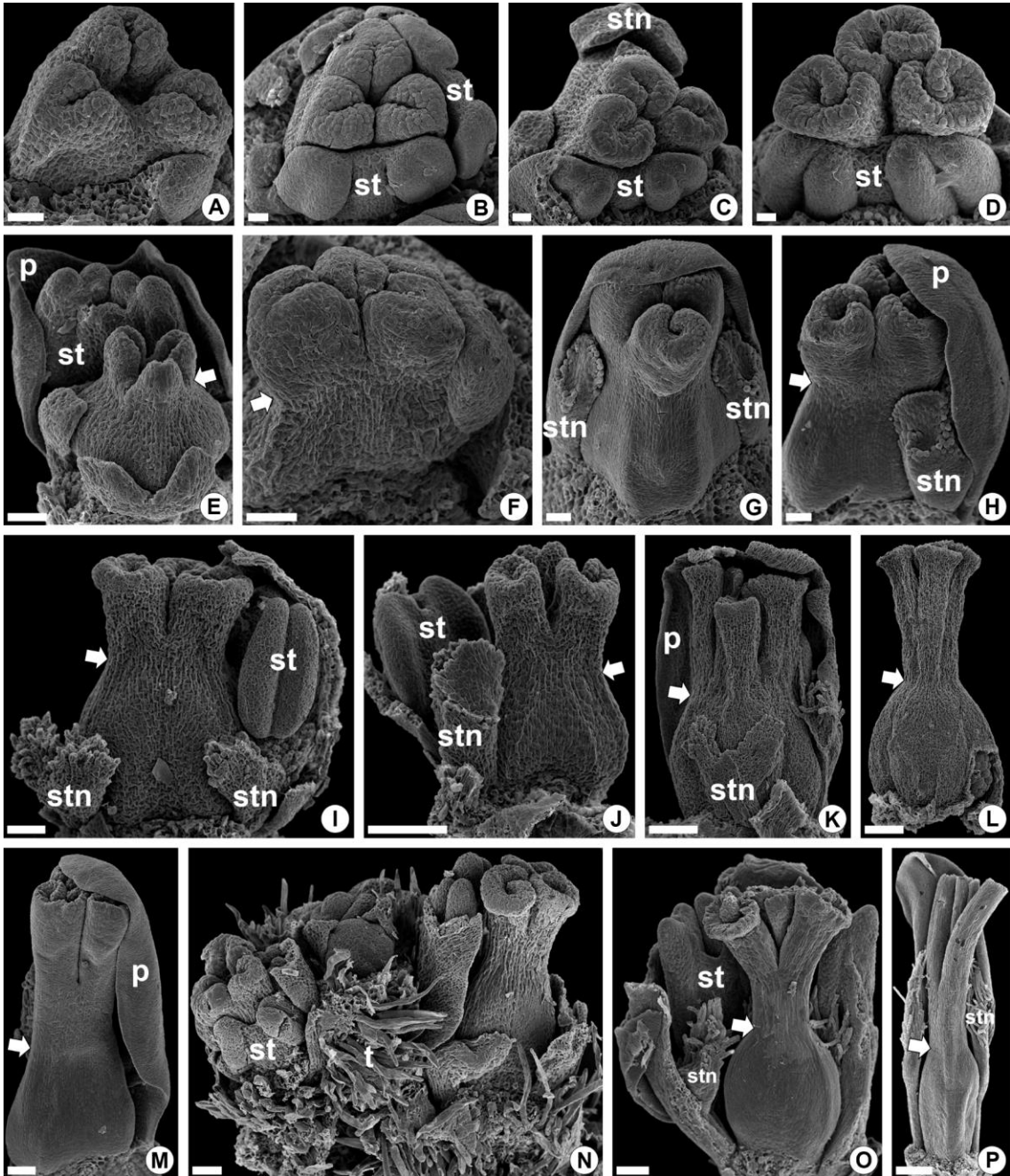


Fig 5. Serial cross sections of flower in *Xyris fallax* showing the vasculature pattern shared by most species of *Xyris*. (A) Receptacle with four groups of vascular bundles: three peripheral groups forming the sepal-petal-staminode complex (encircled in red) and a central group corresponding to the petal-stamen-carpel complex (encircled in yellow) (B) At upper level from the central group the petal-stamen traces diverge (C) The petal-stamen traces split into the petal median trace and the stamen trace (D) Three dorsal carpellary traces diverge opposite to the sepals and staminodes (E) Each peripheral group supplies a sepal, a staminode and two adjacent petals (petal lateral traces) (F) Each petal is supplied by three vascular traces: a median one originated from the central group and two lateral ones originated from the peripheral groups. Abbreviations: lp: lateral trace of petal; mp: median trace of petal; s: sepal; st: stamen; stn: staminode. Scale bars: 100 μm .

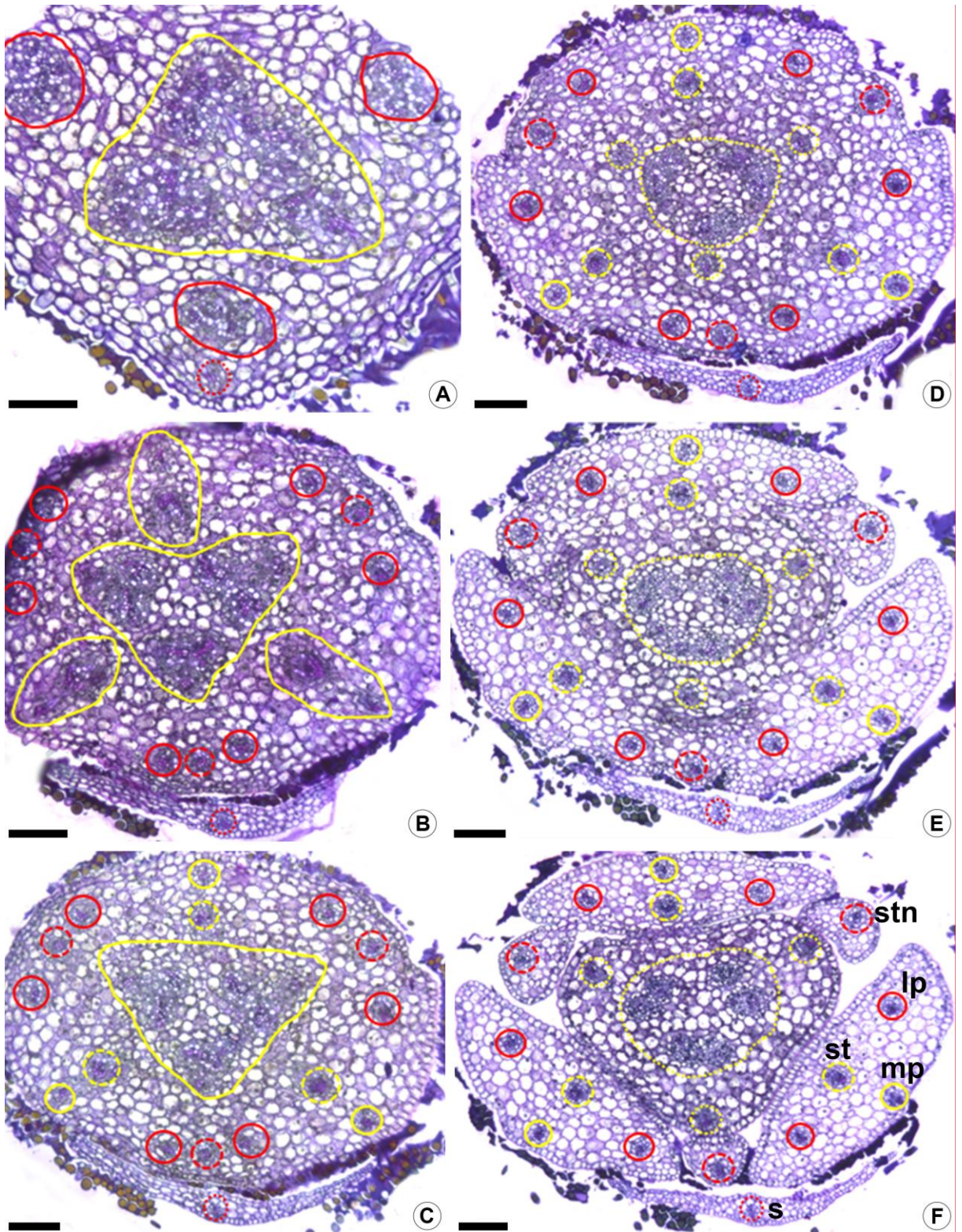


Fig 6. Serial cross sections of flower in *Xyris ustulata* showing the vasculature. (A) Sepal trace (encircle in red) (B) At the flower receptacle vascular bundles are organized into two rings (the inner one is encircled in yellow) (C-D) From the outer ring the traces of petal (lateral traces) and staminodes diverge (E-F) From the inner ring the traces of petal (median trace), stamens and carpels diverge. Scale bars: 50 μm .

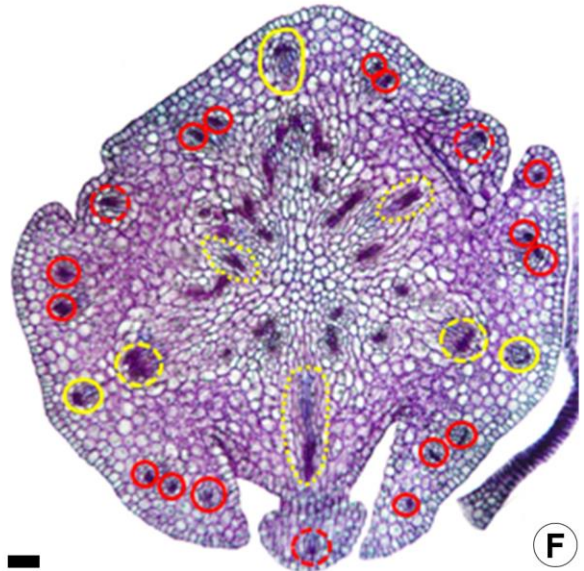
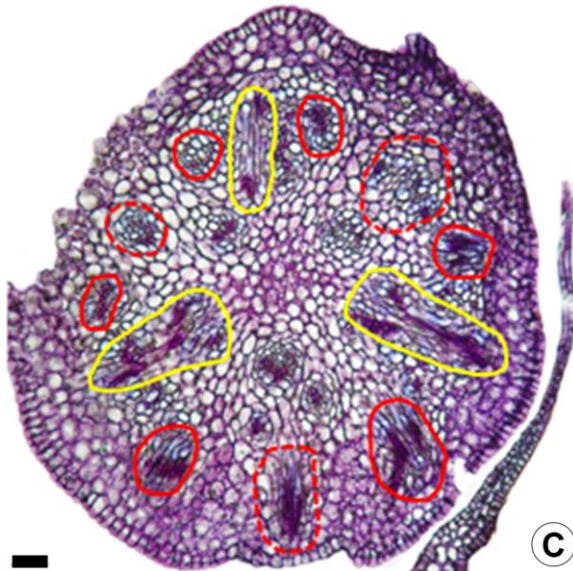
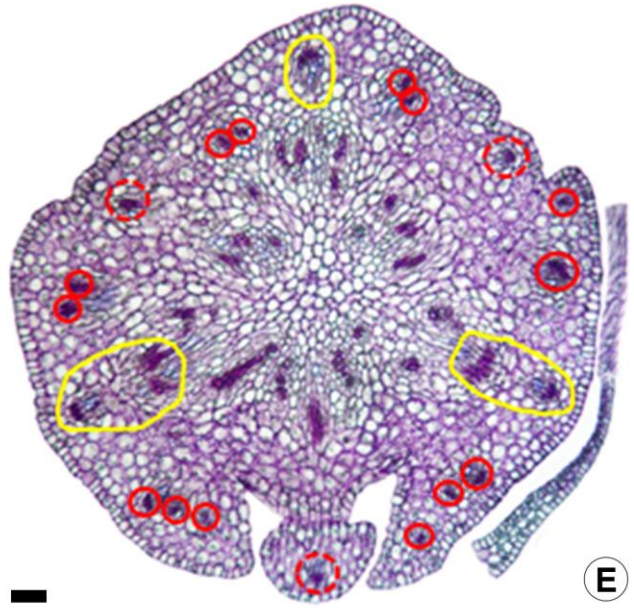
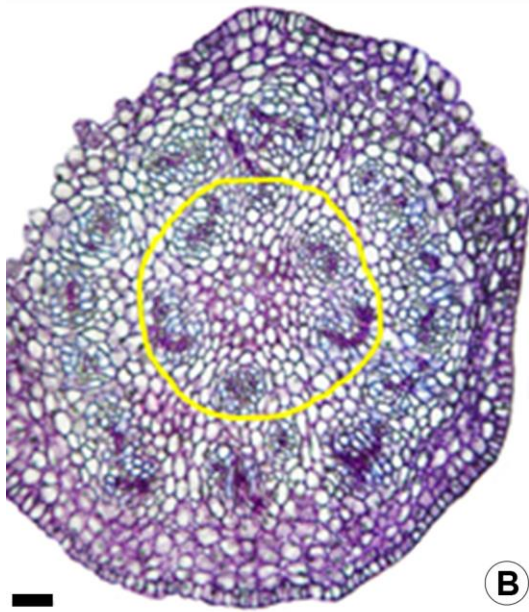
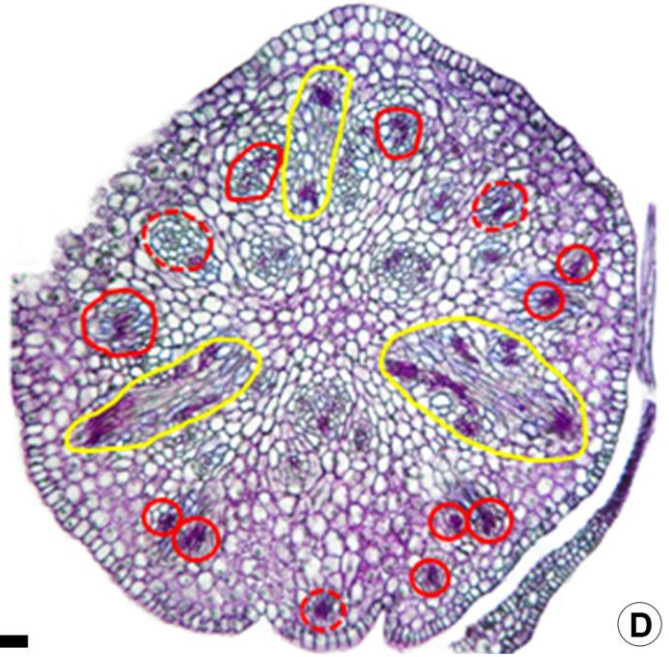
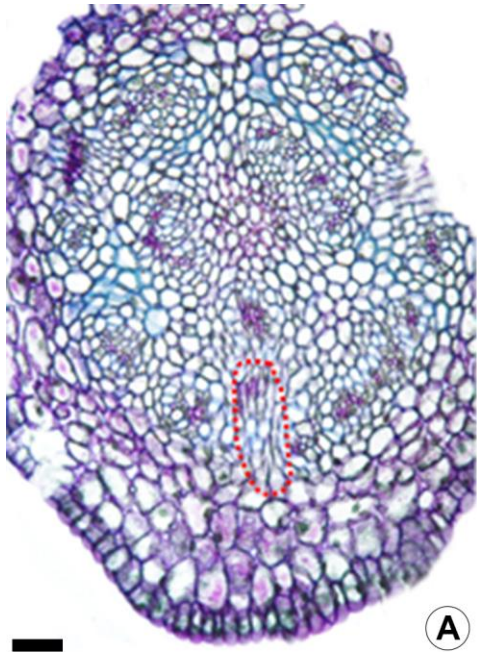


Fig 7. Ovary in *Xyris ptariana* (A-E) and *X. ustulata* (F) with axile placentation, and in *X. teinosperma* (G) with axile-basal placentation (*Xyris* sect. *Pomatoxyris*), under scanning electron microscopy. (A-D) Successive developmental stages of ovules attached to the axile placentae (E) Cross section showing the synascidiate zone (F) Detail of the fertile synascidiate and symplicate zones (G) Detail of the fertile synascidiate zone. Scale bars: A = 50 μm ; B-H = 100 μm .

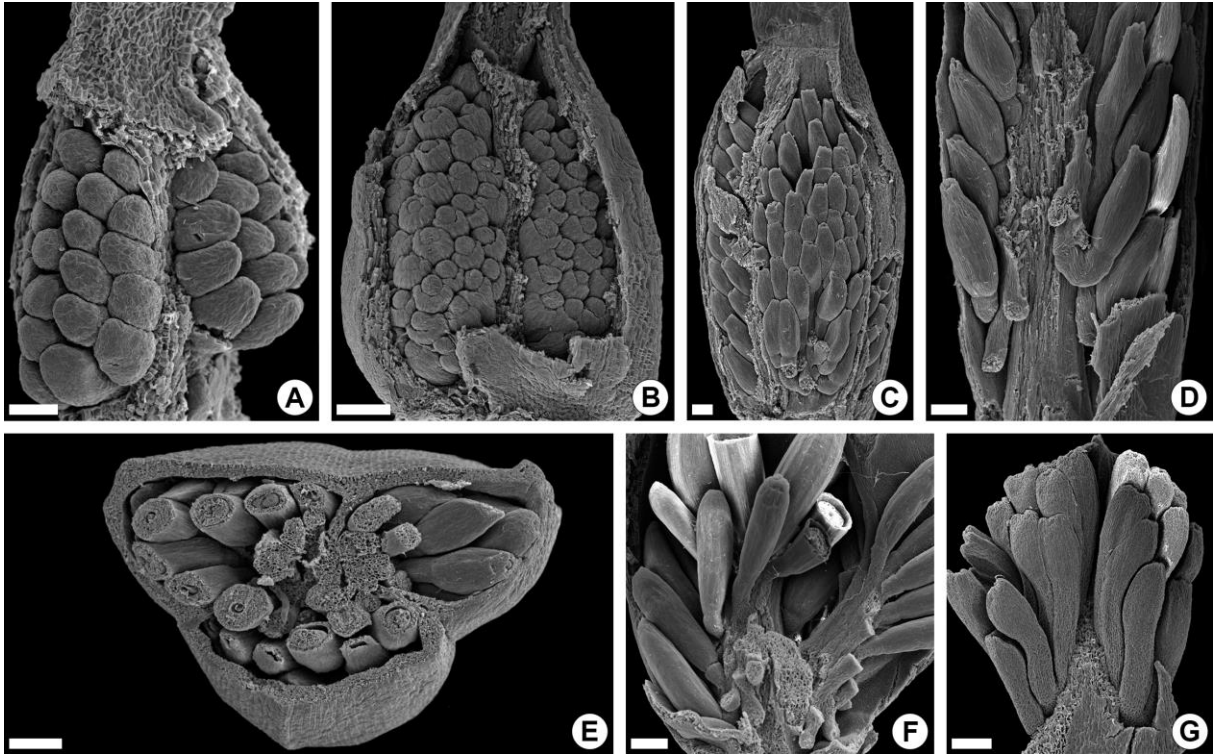
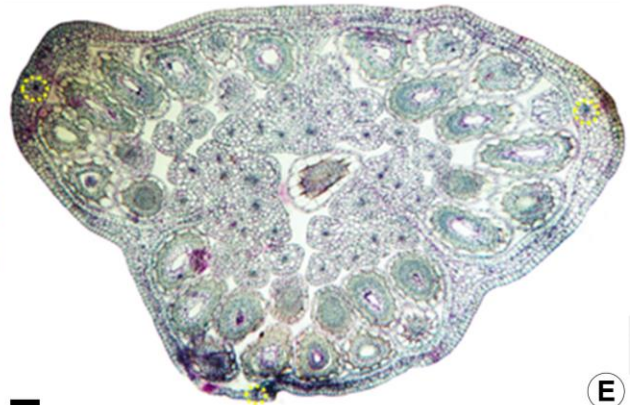


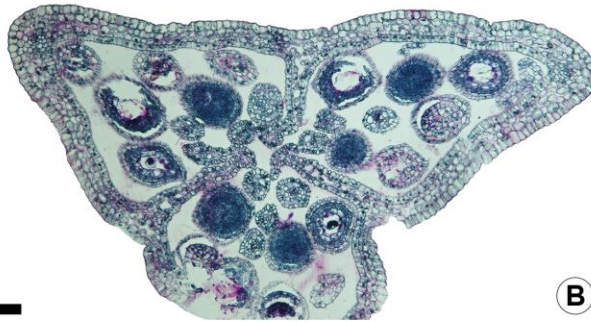
Fig 8. Serial cross sections of ovary in *Xyris ptariana* (A-B), *X. ustulata* (C-F) and *X. teinosperma* (G-H) (*Xyris* sect. *Pomatoxyris*), under scanning electron microscopy. (A) Fertile synascidiate zone (B) Sterile symplicate zone (C-D) Fertile synascidiate zone (E) Fertile symplicate zone (F) Sterile symplicate zone (G) Fertile synascidiate zone (H) Sterile symplicate zone. Scale bars: 50 μm .



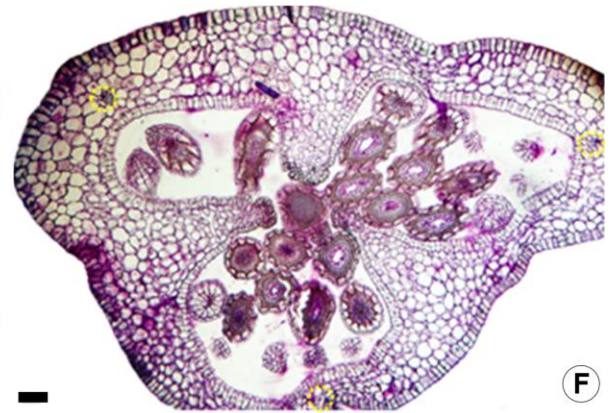
A



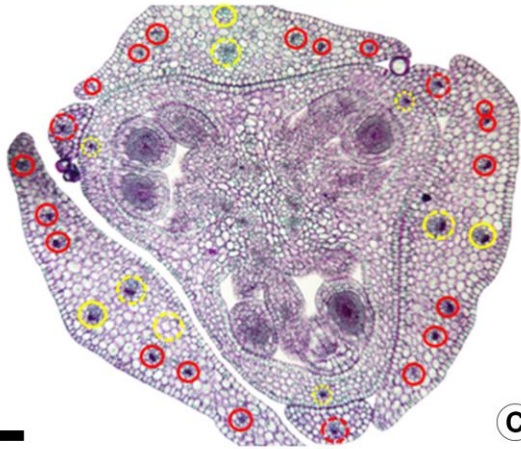
E



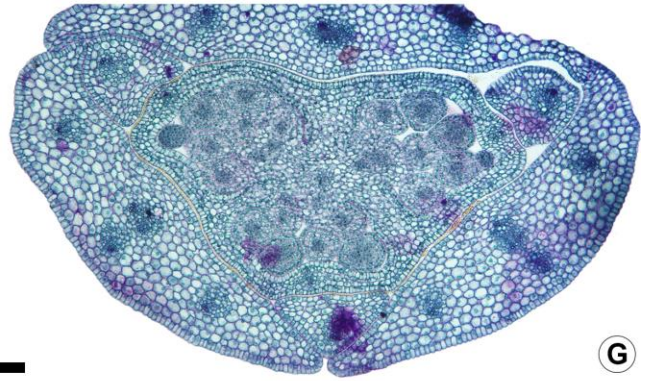
B



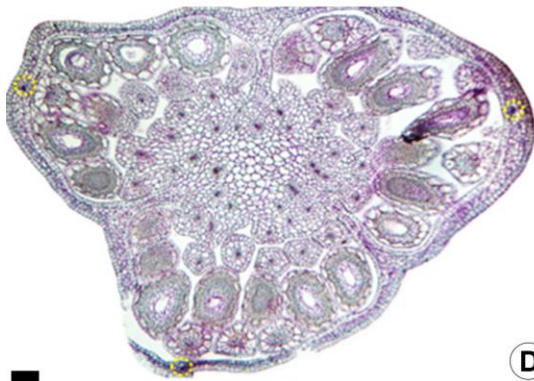
F



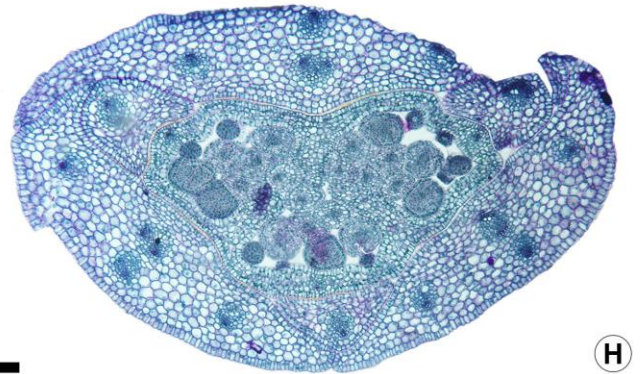
C



G



D



H

Fig 9. Ovary in *Xyris jupicai* (A-C, L) with parietal placentation, in *X. fallax* (D) with parietal-basal placentation (*Xyris* sect. *Xyris*); in *X. trachyphylla* (E-H, M) with free-central placentation and in *X. pilosa* (I-K, N) with basal placentation (*Xyris* sect. *Nematopus*), under scanning electron microscopy. (A-C) Successive stages of ovule development (B-C) Ovules attached to parietal placentae (D) Ovules attached to parietal-basal placentae (E-G) Successive stages of ovule development (H) Ovules attached to a central column (I-J) Successive stages of ovule development (K) Ovules attached to a basal placenta (L-N) Cross sections showing the fertile symplicate zone. Scale bars: A, L-M = 20 μm ; B-E, G-J, N = 100 μm ; F, K = 50 μm .

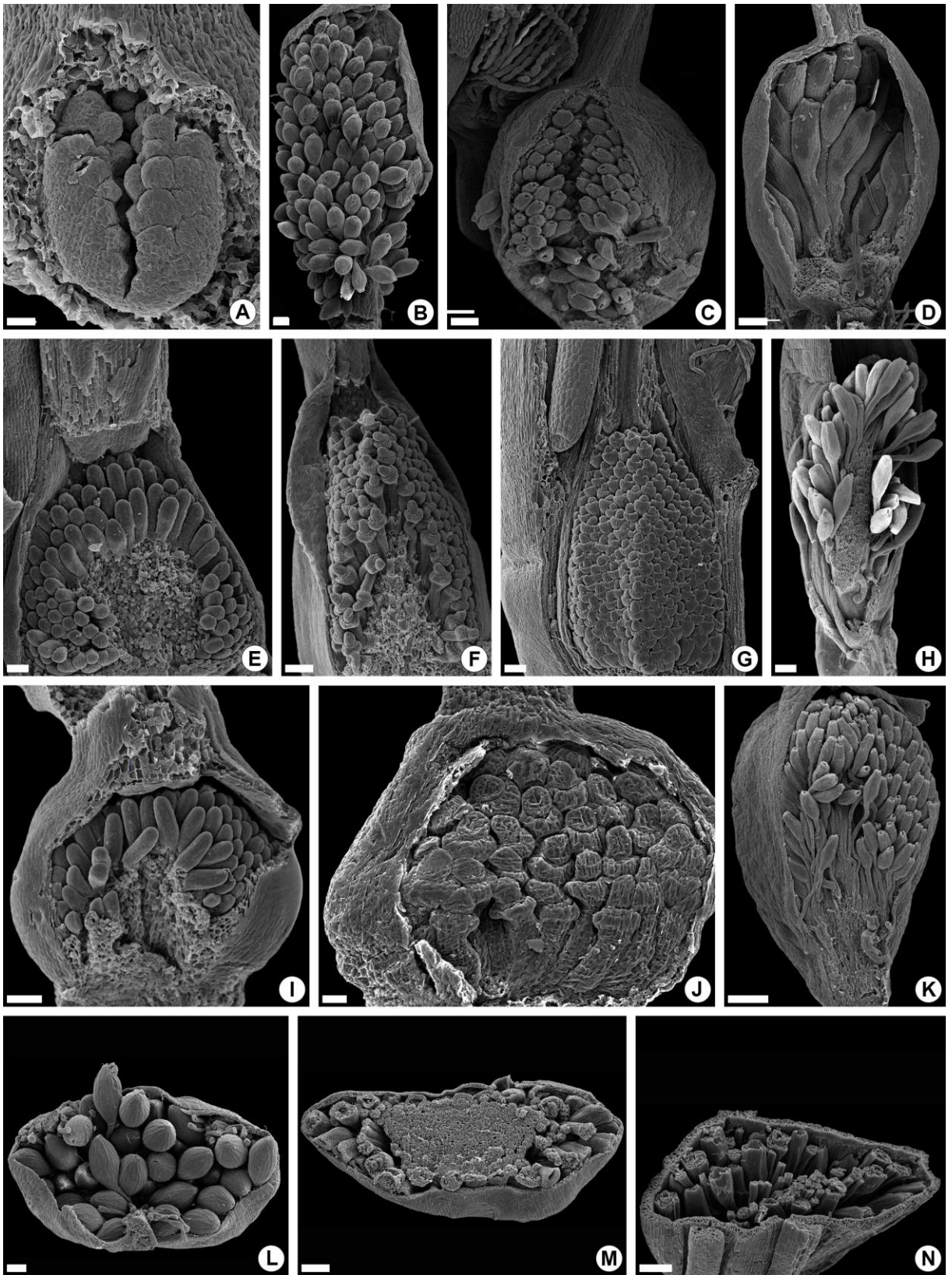
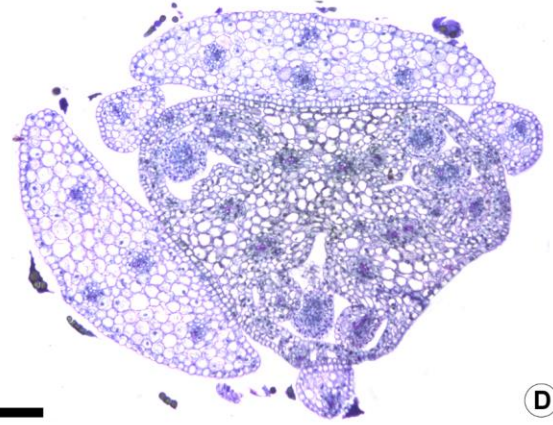


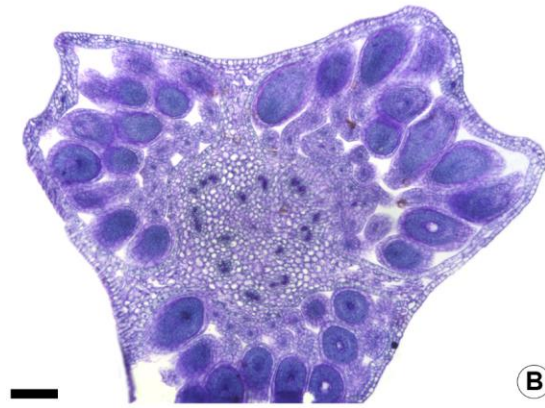
Fig 10. Serial cross sections of ovary in *Xyris jupicai* (A-C) and in *X. fallax* (D-F) (*Xyris* sect. *Xyris*), under scanning electron microscopy. (A) Sterile synascidiate zone (B) Fertile synascidiate zone (C) Fertile symplicate zone (D) Fertile synascidiate zone (E) Fertile symplicate zone (F) Sterile symplicate zone. Scale bars: 100 μm .



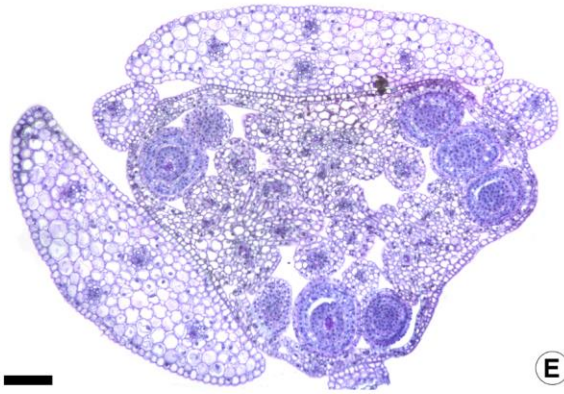
A



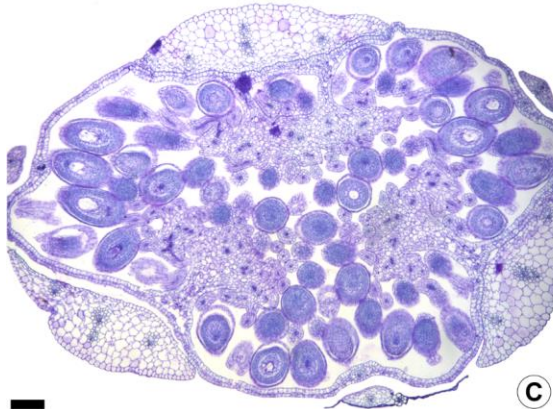
D



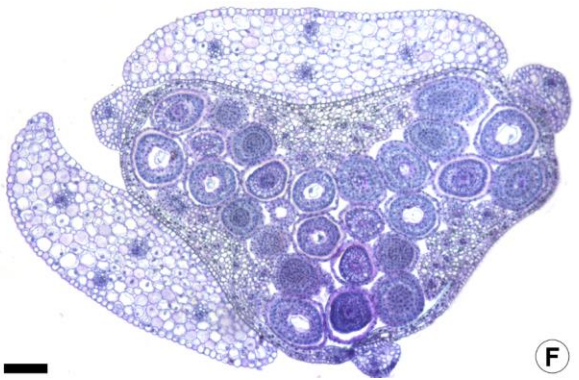
B



E



C



F

Fig 11. Serial cross sections of ovary in *Xyris trachyphylla* (A-C) and in *X. pilosa* (D-F) (*Xyris* sect. *Nematopus*), under scanning electron microscopy. (A) Sterile synascidiate zone (B-C) Fertile symplicate zone (D) Sterile synascidiate zone (E) Fertile symplicate zone (F) Sterile symplicate zone. Scale bars: A, C = 50 μm ; B, D = 100 μm .

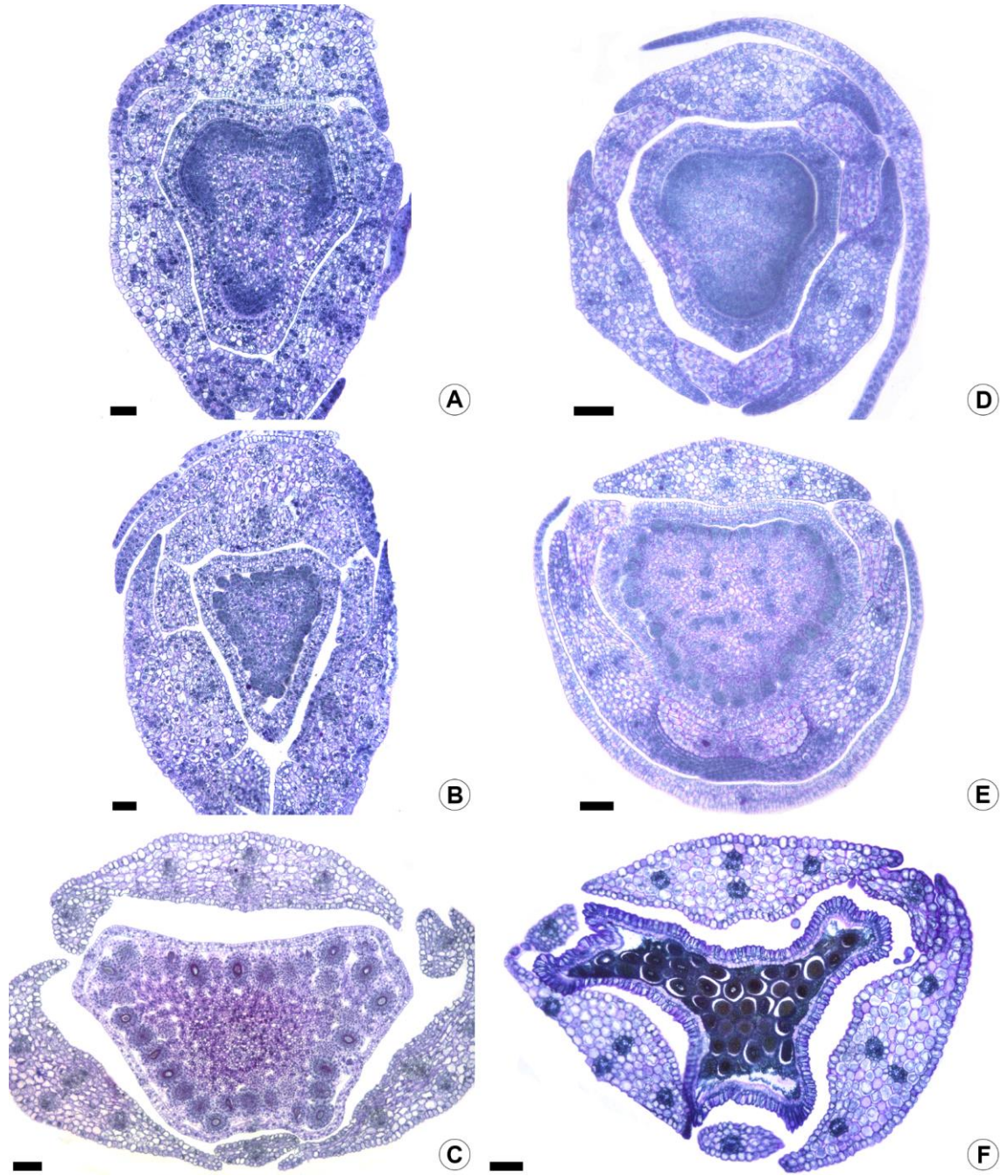


Fig 12. Otimização dos tipos de placentação na filogenia de Xyridaceae obtida por Mota (2014), a partir d sequências de genes mitocondriais e plastidiais.

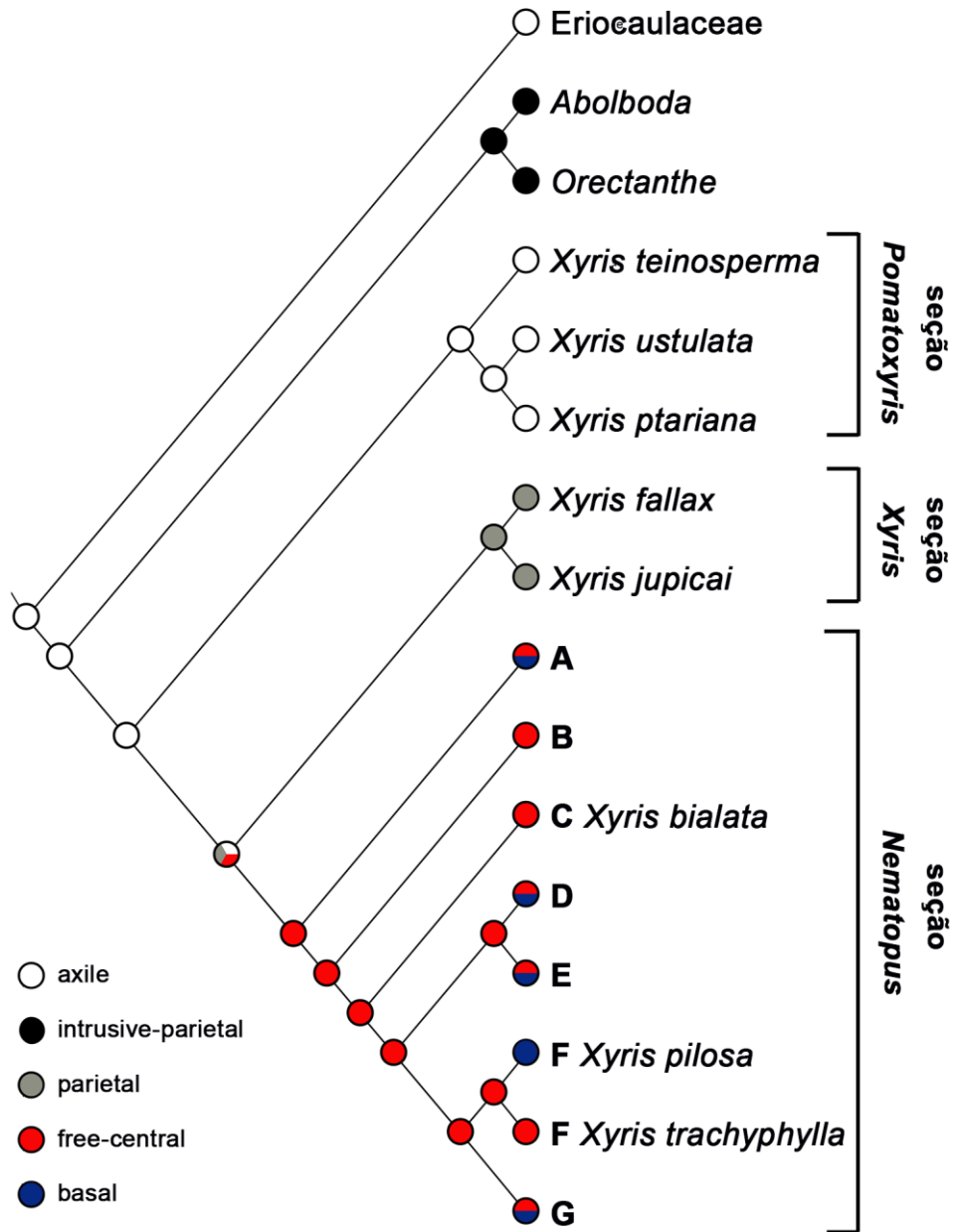


Table 1 List of *Xyris* species studied, their respective sections, placentation, vouchers and collection site.

Species	Section	Placentation	Vouchers	Collection site
<i>Xyris asperula</i> Mart.	<i>Nematopus</i> Seub.	basal	Nardi et al. 22	Serra do Cipó, Minas Gerais, Brazil
<i>X. pilosa</i> Kunth	<i>Nematopus</i> Seub.	basal	Nardi et al. 60	Serra do Cipó, Minas Gerais, Brazil
<i>X. oblata</i> Kral & L.B. Sm.	<i>Nematopus</i> Seub.	basal	Campbell et al. 652 (NY)	Amazonas, Venezuela
<i>X. bialata</i>	<i>Nematopus</i> Seub.	free-central	Nardi et al. 68	Serra do Cipó, Minas Gerais, Brazil
<i>X. trachyphylla</i> Mart.	<i>Nematopus</i> Seub.	free-central	Scatena et al. 449	Serra do Cipó, Minas Gerais, Brazil
<i>X. fallax</i> Malme	<i>Xyris</i> Endl.	parietal-basal	Nardi et al. 34	Itirapina, São Paulo, Brazil
<i>X. jupicai</i> Rich.	<i>Xyris</i> Endl.	parietal	Nardi et al. 36	Itirapina, São Paulo, Brazil
<i>X. ptariana</i> Steyerm.	<i>Pomatoxyris</i> Endl.	axile	Campbell et al. 802 (NY)	Amazonas, Venezuela
<i>X. teinosperma</i> Idrobo & L.B. Sm.	<i>Pomatoxyris</i> Endl.	axile-basal	Campbell et al. 638 (NY)	Amazonas, Venezuela
<i>X. ustulata</i> Auth.	<i>Pomatoxyris</i> Endl.	axile	Conn et al. 5699, 5707 (SYD)	New South Wales, Australia

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando as informações já disponíveis na literatura sobre os aspectos reprodutivos de Xyridaceae e Mayacaceae, nossos resultados trazem à luz do conhecimento que:

- A variação do tipo de embriogênese é *Muscari* em Xyridaceae e *Juncus* em Mayacaceae;

- Ocorre suspensor vestigial em Xyridaceae e Mayacaceae, o qual é formado pelas células *o* e *p*, com origem a partir da célula *n*.

- As sementes de Xyridaceae e Eriocaulaceae apresentam epístase, que corresponde a células nucelares persistentes na região micropilar, com provável função secretora e de proteção ao embrião;

- O cotilédone compacto apresenta os lobos da bainha desenvolvidos em *Xyris fallax* (seção *Xyris*) e o desenvolvimento das primeiras folhas precede o desenvolvimento de raízes adventícias na plântula dessa espécie, diferente do observado nas demais espécies de *Xyris*;

- As sementes de Mayacaceae não são operculadas, uma característica há tempos discutida na literatura;

- A secagem das sementes antes da embebição e a alta disponibilidade de água e luz interferem positivamente na porcentagem de germinação de sementes de Mayacaceae, relatada como muito baixa em trabalhos prévios;

- A luz influencia na morfologia da plântula de Mayacaceae; esta apresenta cotilédone do tipo coleóptilo e não do tipo compacto como descrito na literatura;

- A vascularização floral de *Xyris ustulata* é distinta da observada nas demais espécies de *Xyris* estudadas até o momento, devido à presença de dois anéis de feixes vasculares no receptáculo, sendo que do anel externo divergem os traços das sépalas, dos estaminódios e das pétalas (traços laterais), o que pode estar relacionado ao tamanho da flor;

- Em *Xyris fallax* ocorrem tricomas secretores entre os botões florais, similares aos observados em Rapateaceae; em *Xyris ptariana* os estaminódios tricomatosos estão ausentes;

- Ocorre variação na estrutura do gineceu entre as seções de *Xyris*: nas espécies da seção *Pomatoxyris*, o ovário consiste de uma zona sinascidiada fértil, enquanto que a zona simplicada é mais curta e fértil em sua porção inferior ou completamente estéril; já nas espécies das seções *Xyris* e *Nematopus*, o ovário tem uma zona sinascidiada curta, podendo ser fértil em sua porção superior em *X. sect. Xyris*, enquanto que a zona simplicada é mais longa e fértil.

Além disso, nossos resultados mostram que:

- O desenvolvimento do embrião do tipo Asterado, embrião diferenciado e formação de suspensor são condições ancestrais em Poales;
- A presença de epístase e de opérculo nas sementes de Xyridaceae e Eriocaulaceae podem ser apontadas como sinapomorfias do clado xyrídeo;
- Embriogênese do tipo Onagrado e presença de camada de aleurona na semente aproxima Mayacaceae das famílias incluídas no clado cyperídeo;
- Cotilédone compacto é o estado de caráter ancestral no clado xyrídeo (incluindo Xyridaceae e Eriocaulaceae), a partir do qual o hipofilo cotiledonar laminar derivou provavelmente no ancestral mais recente de *Xyris*;
- Cotilédone compacto é o estado de caráter ancestral e mais comum em Poales, enquanto o coleóptilo teve mais de uma origem na ordem;
- Coleóptilo ocorre em Mayacaceae e Cyperaceae e pode representar uma sinapomorfia dessas famílias, dando suporte ao posicionamento de Mayacaceae no clado cyperídeo;
- A placentação axilar é a condição ancestral mais provável em *Xyris*, a partir da qual a placentação parietal e central-livre derivaram devido ao encurtamento e esterilização da zona sinascidiada em detrimento do alongamento da zona simplicada fértil durante a evolução do gênero;
- A placentação basal derivou da placentação central-livre em *Xyris*, tendo evoluído independentemente diversas vezes dentro da seção *Nematopus*.

Como perspectivas para trabalhos futuros, ressaltamos a importância de estudos sobre:

- a funcionalidade da epístase nas xyrídeas (Xyridaceae e Eriocaulaceae);
- a persistência e função da capa nucelar multisseriada nas sementes de Joinvilleaceae e Flagellariaceae (graminídeas), e da epiderme nucelar alongada nas sementes de Flagellariaceae (graminídeas) e de Restionaceae e Centrolepidaceae (restídeas);
- a germinação e o desenvolvimento pós-seminal em espécies de *Xyris* pertencentes à seção *Pomatoxyris*, bem como em *Abolboda*, *Achlyphila* e *Aratitiopea* (Abolbodoideae);
- o desenvolvimento e a estrutura do gineceu e o tipo de placentação em Abolbodoideae.

Com isso, esperamos continuar a contribuir com o conhecimento mais amplo acerca dos aspectos reprodutivos, biológicos e evolutivos dessas famílias, tão importantes no contexto de Poales e também na Flora do Brasil.