

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



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

HALISSON RAFAEL KEDROVSKI

**REVISÃO DA ANATOMIA RADICULAR E ONTOGENIA DE TILOSSOMOS EM
ESPÉCIES DE PLEUROTHALLIDINAE (ORCHIDACEAE)**

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Sajo

**AGOSTO
2019**

HALISSON RAFAEL KEDROVSKI

REVISÃO DA ANATOMIA RADICULAR E ONTOGENIA DE TILOSSOMOS EM
ESPÉCIES DE PLEUROTHALLIDINAE (ORCHIDACEAE)

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

Orientação: Profa. Dra. Maria das Graças
Sajo

AGOSTO – 2019

K25r

Kedrovski, Halisson Rafael

Revisão da anatomia radicular e ontogenia de tilossomos em espécies de Pleurothallidinae (Orchidaceae) / Halisson Rafael Kedrovski. -- Rio Claro, 2019

131 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Maria das Graças Sajo

1. Botânica. 2. Anatomia Vegetal. 3. Microscopia. 4. Orquídea. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Revisão da anatomia radicular e ontogenia de tilossomos em espécies de pleurothallidinae (orchidaceae)

AUTOR: HALISSON RAFAEL KEDROVSKI

ORIENTADORA: MARIA DAS GRACAS SAJO

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

Maria das Gracas Sajo
Profa. Dra. MARIA DAS GRACAS SAJO
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Rio Claro

Prof. Dr. ERIC DE CAMARGO SMIDT
Centro Politécnico, Setor de Ciência Biológicas, Departamento de Botânica / UFPR

Erika Amano
Profa. Dra. ERIKA AMANO
Botânica / Universidade Federal do Paraná

Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira
Profa. Dra. ANA SILVIA FRANCO PINHEIRO MOREIRA
Instituto de Biomédicas/Instituto de Bioogia/Universidade Federal de Uberlândia

Fábio de Barros
Prof. Dr. FÁBIO DE BARROS
Jardim Botânico de São Paulo, Instituto de Botânica

Rio Claro, 19 de agosto de 2019

Em memória de José Eloy Barche e Odete Simões Barche
A João Alceu Kedrovski e Maria Luiza Kedrovski
Dedico

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese só foi possível pelo aceite de orientação da Profa. Dra. Maria das Graças Sajo, a concessão da bolsa de doutorado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e auxílios da PROAP.

Agradeço aos Coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal), aos Professores do Departamento de Botânica, especialmente ao Laboratório de Morfologia Vegetal da UNESP Rio Claro na pessoa da Profa. Dra. Alessandra Ike Coan.

Agradeço também ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Rio Claro nas pessoas de Monika Iamonte e Dra. Priscila Cintra Socolowski e ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu nas pessoas da Profa. Dra. Silvia Machado e Claudete dos Santos Tardivo.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, Jardim Botânico de São Paulo e Orquidário “Frederico Carlos Hoehne” nas pessoas do Prof. Dr. Fabio de Barros e Prof. Dr. Eduardo Catharino.

Ao Laboratório de Botânica Estrutural e ao Laboratório de Sistemática e Ecologia Molecular de Plantas da Universidade Federal do Paraná nas pessoas da Profa. Dra. Erika Amano e Prof. Dr. Erik Smidt.

Os Professores Dr. Edlley Pessoa e Dr. Cássio van den Berg.

Aos colegas e amigos da linha de pesquisa: Daniela Imigi, Mônica Bolson, Carla Royer, Milena Santos, Thiago Faria Dos Santos, Miguel Machnicki, Anna Victoria, Mariano Gouveia, Gustavo Arevalo, Thaina Gelli, Monique Cristine, Gabriel Kominami, Virginia Hamer e Leonardo Formaggi.

Aos Professores membros da banca de defesa de Tese.

A todos os colegas e amigos de turma, do PPG e aqueles quais convivi em Rio Claro, em especial a Luiz Gustavo Pedroso, Ana Maria Correia, Tássio Brito e Carla da Mata.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Esta tese está organizada em dois Capítulos que tiveram como objetivos: *a.* descrever e revisar a anatomia radicular na subtribo Pleurothallidinae, *b.* apontar caracteres anatômicos radiculares que possam identificar táxons, *c.* reconstruir a história dos caracteres radiculares usando dados genéticos da região ITS disponíveis no GenBank, e por fim, *d.* mostrar a ontogenia dos tilossomos em *Anathallis sclerophylla*. No primeiro Capítulo foi analisada a anatomia radicular de 82 espécies distribuídas em 29 gêneros, abrangendo oito das nove Afinidades dentro da subtribo Pleurothallidinae. Concluímos que o velame biestratificado é comum na subtribo, ocorrendo nas oito Afinidades e em mais de 75% das espécies amostradas. Ainda ocorre velame uniestratificado em *Lepanthes calodictyon*, e velames com três, quatro e cinco camadas em espécies das Afinidades *Restrepia* e *Masdevallia*. Reafirmamos a importância taxonômica dos espessamentos parietais do velame apresentando-os de forma detalhada na organografia do complexo velame-exoderme, sendo os padrões morfológicos e sua distribuição entre as camadas do velame uma rica fonte de informação para o reconhecimento dos gêneros na subtribo. Mostramos os tilossomos de 39 espécies e notamos que morfologias mais simples ocorrem nas Afinidades mais basais e morfologias mais complexas ocorrem nas Afinidades mais derivadas. Na exoderme, espessamentos em “O” ou em “∩” ocorrem principalmente nos gêneros mais basais, a exoderme de paredes finas pode ser interpretada como uma característica apomórfica derivada, e a exoderme espessada em “U” em *Barbosella* é única sinapomorfia encontrada na subtribo. As análises multivariadas mostram grande importância para as características do córtex e do cilindro vascular na resolução do dendrograma morfológico. O parênquima cortical pode apresentar-se homogêneo como em *Specklinia*, ou heterogêneo como em *Pabstiella*. O cilindro vascular com muitos arcos de protoxilema ocorre com maior frequência nas Afinidades basais, ao contrario do cilindro vascular reduzido, com poucos arcos de protoxilema, característico das Afinidades mais derivadas. Talvez pela grande diversidade do grupo e poucos marcadores morfológicos, os caracteres radiculares se apresentam fortemente homoplásicos, mas a combinação entre eles pode identificar ao menos o gêneros de um morfotipo. Ainda notamos direção no surgimento das apomorfias nos tecidos radiculares quando associamos dados morfológicos aos dados genéticos. Desta forma, este Capítulo contribui substancialmente para o entendimento da anatomia radicular e o comportamento fenotípico da raiz em Pleurothallidinae. No segundo Capítulo, o artigo publicado descreve a ontogenia dos tilossomos das raízes de *Anathallis sclerophylla*. Concluímos que os tilossomos são crescimentos internos de parede, semelhantes aos encontrados em células de transferência, que se desenvolvem como papilas celulósicas na parede periclinal interna do endovelame, justaposta a célula de passagem da exoderme, na zona de alongamento radicular. Essa estrutura possivelmente funciona como um aparato de

membrana e parede para aumentar o transporte de soluto entre epiderme e córtex nas regiões jovens da raiz. A parede do tilossomo desenvolvido é basicamente lignificada, com pouca ou nenhuma deposição de calose nos plasmodesmos, e apresentam lacunas de suberina no seu interior. Por essas características específicas, parecem estar relacionados ao balaço hídrico na raiz adulta.

Palavras-chave: análises fenéticas, reconstrução de estados ancestrais, célula de transferência

ABSTRACT

This thesis is organized in two Chapters that aimed: *a.* to describe and review the root anatomy in the Pleurothallidinae subtribe, *b.* point out radicular anatomical characters that can identify taxa, *c.* reconstruct the history of root characters using GenBank genetic data from ITS region, and finally *d.* to show the ontogeny of tilosomes in *Anathallis sclerophylla*. In the first Chapter we analyzed the root anatomy of 82 species distributed in 29 genera, covering eight of the nine Affinities within the Pleurothallidinae. We conclude that bistratified velamen is common, occurring in the eight Affinities and in more than 75% of the sampled species. Single layered velamen still occur in *Lepanthes calodictyon*, in the same way three, four, and five layer occurs in *Restrepia* and *Masdevallia* Affinities. We reinforce the taxonomic importance of the velamen wall thickening, presenting them in a detailed velamen-exodermis complex organogram. The morphological patterns and their distribution between the velamen layers are a rich information source for genera recognition in the subtribe. We show the tilosomes of 39 species and note that simpler morphologies occur at the early divergent Affinities, and more complex morphologies occur in late divergent ones. In exodermis, “O” or “∩” thickening occurs mainly in basal genera, thin-walled exodermis can be interpreted as a derived apomorphic feature, and “U” thickened exodermis in *Barbosella* is the only synapomorphy found in the subtribe. Multivariate analysis show high importance for the cortex and vascular cylinder characters to resolution of the morphological dendrogram. The cortical parenchyma can be homogeneous as in *Specklinia*, or heterogeneous as in *Pabstiella*. The vascular cylinder with many protoxylem arches occurs more frequently in basal Affinities, opposed to the reduced vascular cylinder with few protoxylem arches, characteristic of the more derived Affinities. Perhaps due to the great diversity of the group and few morphological markers, the root characters are strongly homoplastic, but their combination can identify at least the genera of a morphotype. We still find direction in root apomorphies incidence when we associate morphological with genetic data. Thus, this chapter contributes substantially to the understanding of root anatomy and the phenotypic behavior of the Pleurothallidinae roots. In the second Chapter, the published paper describes the tilosomes ontogeny of the *Anathallis sclerophylla* root. We conclude that tilosomes are wall-ingrowths, similar those found in transfer cells, which develop as cellulosic papillae in the endovelamen inner periclinal wall, over the exodermis passage cells, at root elongation zone. These structures probably function as wall-membrane apparatus, to increase the solute transport between epidermis and cortex in young root regions. The developed tilosome wall is basically lignified, with little or no deposition of callose in the plasmodesmata, and there are suberin gaps inside its apparatus. Due to these specific morphologic features, its seem to be straightly related to the water balance in the mature root.

Key words: phenetic analysis, ancestral state reconstruction, transfer cells

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	15
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	21
CAPÍTULO I.....	25
RESUMO	27
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	33
RESULTADOS.....	37
Afinidade <i>Octomeria</i>	37
Afinidade <i>Restrepia</i>	38
Afinidade <i>Acianthera</i>	39
Afinidade <i>Lepanthes</i>	40
Afinidade <i>Masdevallia</i>	42
Afinidade <i>Phloeophila</i>	43
Afinidade <i>Specklinia</i>	43
Afinidade <i>Pleurothallis</i>	44
<i>Incertae sedis</i>	45
Análises fenéticas.....	45
Ensaio filogenético.....	46
Evolução dos caracteres radiculares	47
DISCUSSÃO	49
Velame	49
Estriações de parede celular e estrutura do velame	50
Tilossomos	51
Exoderme	52
Parênquima cortical.....	53
Endoderme.....	54
Cilindro vascular	54
Medula.....	54
Tendências anatômicas.....	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
FIGURAS	59
TABELAS.....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
CAPÍTULO II.....	117
Abstract.....	119

Introduction	119
Material e Methods.....	120
Results and Discussion	120
Tilosome development, morphology and wall Biochemistry	120
Updating the interpretation of tilosomes.....	125
Conclusion	126
New perspective	126
Acknowledgements	126
References.....	126
APÊNDICES	129

INTRODUÇÃO GERAL

Pleurothallidinae Lindl., uma das maiores subtribos dentro de Orchidaceae, constitui um grupo monofilético (Pridgeon & Chase, 2001; Pridgeon, Solano & Chase, 2001) e compreende mais de 5.100 espécies em 44 gêneros (Karremans, 2016), totalizando cerca de 20% dos representantes da família. Apresenta distribuição neotropical com maior diversidade em florestas úmidas das regiões tropicais e subtropicais das Américas, ocorrendo no sul da Flórida e México, Caribe, na região norte da América do Sul, no Brasil e no norte da Argentina (Pridgeon & Chase, 2003; Pridgeon *et al.*, 2005).

São predominantemente epífitas ou rupícolas de crescimento simpodial e sem pseudobulbos. Possuem raízes com velame do tipo *Pleurothallis*, folhas em geral coriáceas, suculentas e conduplicadas. Seus caulomas aéreos e unifoliados se originam de rizomas, constituindo os chamados ramicaules. As flores, ressupinadas ou não, possuem articulação entre o pedicelo e o ovário, coluna curta ou alongada e antera apical incumbente ou dorsalmente ereta. As políneas variam entre oito, seis, quatro a duas, podendo apresentar um pequeno viscidium e o estigma é inteiro ou bilobado. Os frutos são do tipo cápsula com deiscência valvar. (Luer 1986, Dressler, 1993; Pridgeon & Chase, 2003; Stern, 2014).

No Brasil, ocorrem 24 gêneros e espécies na sua maioria de elevado endemismo. Na tabela abaixo são apresentados os gêneros de Pleurothallidinae que ocorrem no Brasil (Barros *et al.* 2015), com o número de espécies, quantas destas são endêmicas, e o número de sinônimos, para explicitar a complexidade taxonômica do grupo.

Gênero	Espécies ¹		% ²	Sinônimos ¹
	Aceitas	Endêmicas		
Pleurothallidinae Lindl.				
<i>Acianthera</i> Scheidw.	125	104	83,2	41
<i>Anathallis</i> Barb.Rodr.	92	76	82,6	26
<i>Barbosella</i> Schltr.	9	8	88,9	6
<i>Brachionidium</i> Lindl.	6	1	16,7	5
<i>Dryadella</i> Luer	16	12	75,0	5
<i>Echinosepala</i> Pridgeon & M.W.Chase	2	0	0,0	0
<i>Lepanthes</i> Sw.	5	1	20,0	57
<i>Lepanthopsis</i> Ames	4	2	50,0	3
<i>Madisonia</i> Luer	1	1	100,0	1
<i>Masdevallia</i> Ruiz & Pav.	16	5	31,3	45
<i>Myoxanthus</i> Poepp. & Endl.	8	5	62,5	8
<i>Octomeria</i> R.Br.	95	71	74,7	57
<i>Pabstiella</i> Brieger & Senghas	87	75	86,2	18
<i>Phloeophila</i> Hoehne & Schltr.	3	0	0,0	7
<i>Platystele</i> Schltr.	5	2	40,0	3
<i>Pleurothallis</i> R.Br.	14	5	35,7	635
<i>Pleurothallopsis</i> Porto & Brade	1	1	100,0	0
<i>Sansonia</i> Chiron	2	2	100,0	1
<i>Scaphosepalum</i> Pfitzer	1	0	0,0	1

Gênero	Espécies ¹		% ²	Sinônimos ¹
	Aceitas	Endêmicas		
Pleurothallidinae Lindl.				
<i>Specklinia</i> Lindl.	21	13	61,9	204
<i>Stelis</i> Sw.	52	36	69,2	113
<i>Trichosalpinx</i> Luer	13	5	38,5	27
<i>Trisetella</i> Luer	1	0	0,0	3
<i>Zootrophion</i> Luer	1	0	0,0	1

¹ Segundo Flora do Brasil 2020 (Barros et al. 2015)

² Porcentagem de endemismo para os gêneros no Brasil

O sucesso das orquídeas na colonização de substratos aéreos nos dosséis de florestas tropicais pode ser atribuído às especializações relacionadas ao enraizamento, aporte e estocagem de água (Benzing, 1990). As raízes das plantas que possuem o hábito epifítico ou rupícola/epilítico são adaptadas às condições do microclima em que se encontram, e exibem uma considerável diversidade morfológica e funcional. Constituem raízes aéreas verdadeiras, que nunca penetram o substrato e que podem apresentar geotropismo negativo, formando uma rede para o acúmulo de húmus (Pridgeon, 1983). Nesses órgãos, a exposição à luz solar promove o desenvolvimento de cloroplastos funcionais, dando a eles uma aparência esverdeada quando hidratados, e esbranquiçada quando submetidos a estresse hídrico, devido à presença do velame (Dycus & Knudson, 1957; Higgins 2004). Em orquídeas áfilas e acaules (e.g., *Campylocentrum* Benth.), a raiz pode assumir completamente o papel fotossintético, através do metabolismo ácido das crassuláceas – CAM (Winter *et al.*, 1985), e exibir adaptações anatômicas como pneumatóforos (Carlsward, Stern, Bytebier, 2006), que apresentam movimentos análogos aos estomáticos para trocas gasosas (Benzing *et al.* 1983). No entanto, a raiz é destinada fundamentalmente a absorção de água e nutrientes (Moreira & Isaias, 2008; Hodge *et al.*, 2009; Zotz & Winkler, 2013), exibindo nas orquídeas maior número de adaptação morfofisiológica frente à folha e o caule (Stern, 2014). Em muitos gêneros, quando em contato com o substrato, as raízes cilíndricas tornam-se dorsiventrais, com a face dorsal assumindo função protetora e a ventral absorviva, com pelos radiculares, redução do velame e espessamento da exoderme (Stern, 2014)

Como nas muitas monocots, as raízes de Pleurothallidinae apresentam três regiões distintas: uma epiderme persistente como estrato periférico protetor (Chomicki et al. 2014), uma região cortical constituída pela exoderme, parênquima cortical e endoderme, e um cilindro central composto pelo periciclo, tecido vascular e medula (Pridgeon, 1983; Dickison, 2000; Evert, 2006; Cutler *et al.*, 2009; Beck, 2010). O velame tem origem da protoderme, perde seu protoplasto quando maduro e é espacialmente separado do parênquima cortical pela exoderme (Engard, 1944; Pridgeon, 1983). Esse tecido recobre, protege e isola o

córtex parenquimatoso vivo e o cilindro central (Benzing, 1990; Engard, 1944). Embora o velame apareça em raízes de diversas famílias (Benzing, 1990; Kauff, Rudall & Conran, 2000), ele é particularmente especializado nas orquídeas de ambientes xéricos (Benzing, 1990). Nesses indivíduos, as paredes celulares do velame apresentam um complexo arranjo de poros e estrias lignificadas (Pridgeon, 1983; Porembski & Barthlott 1988) que conferem função absorptiva, pelo aumento da capilaridade e higroscopia no tecido (Benzing, 1990), e suporte mecânico evitando o colapso celular durante a dissecação (Benzing, 1986). Os tilossomos se desenvolvem na parede periclinal interna das células do endovelame, adjacentes às células de passagem da exoderme, e podem ou não ser evidentes em microscopia ótica. Aparecem em diferentes táxons neotropicais de orquídeas não terrestres (Pridgeon, 1983) e sua função, origem e desenvolvimento têm sido discutidos. Essas estruturas podem funcionar como uma barreira para a perda de água, pela célula de passagem (Pridgeon, Stern & Benzing, 1983), ou aumentar a superfície de contato para a condensação de água atmosférica (Haberlandt, 1914).

A exoderme, o parênquima cortical e a endoderme se originam do meristema fundamental, e formam a camada mais externa, mediana e mais interna do córtex respectivamente (Engard, 1944). A exoderme e a endoderme são uniestratificadas e funcionam como barreiras apoplásticas, influenciando a seletividade da absorção de água e íons, por possuírem estrias de Caspary nos estágios iniciais de desenvolvimento (Peterson & Enstone, 1996; Enstone, Peterson & Ma, 2003; Schreiber & Frank, 2011; Andreota, Barros & Sajo, 2015). Estes tecidos apresentam dois tipos celulares distintos (Pridgeon, 1983): células comuns mortas, tangencialmente alongadas e que apresentam uma fina lamela de suberina e graus distintos de lignificação (fina, em forma de “O”, “U” e “U” invertido), e células de passagem curtas, vivas com protoplasto denso e paredes primárias (Engard, 1944).

O parênquima cortical, formado por várias camadas de células desenvolvidas, clorofiladas e portadoras de paredes celulósicas, apresenta muitos espaços intercelulares e especializações para reserva hídrica. É comum, nessa região, a presença de idioblastos que apresentam espessamentos de parede reticulados, helicoidais e anastomosados, de natureza celulósica ou lignificada, denominados idioblastos traqueoidais. Atuam no armazenamento de água (Olatunji & Nengim, 1980) e, devido a sua capacidade de retenção hídrica, são referidos como um pseudovelame (Porembski & Barthlott 1988; Leroux *et al.*, 2011). Ráfides, drusas e cristais diversos também são comuns no córtex da raiz e possuem a função de auxiliar na regulação osmótica e evitar o herbivorismo. Grãos de amido também podem ser notados nas regiões periféricas do tecido cortical, podendo ocorrer isolados ou na forma de espirantossomo (Stern *et al.*, 1993). Micorrizas filamentosas endofíticas estão presentes no velame e córtex das raízes. Esses organismos estão diretamente relacionados

com o desenvolvimento dos protocormos e com o aporte de compostos nitrogenados do substrato (Arditti & Ghani, 2000; Pylro, Nogueira & Lanna, 2013).

O cilindro vascular é circundado externamente pelo periciclo cujas células apresentam paredes espessadas exceto em frente dos arcos de protoxilema; pode ser uni ou pluriestratificado, com no máximo três camadas, e origina as raízes secundárias (Stern, 2014). O tecido vascular é poliarco, exarco, com feixes de xilema intercalados com floema, sendo sustentado por fibras do esclerênquima. A medula pode se apresentar parenquimática ou esclerificada (Pridgeon, 1983; Stern, 2014).

Os trabalhos de Engard (1944) e Dycus & Knudson (1957) continuam sendo referências para o entendimento da ontogenia, estrutura e fisiologia da raiz nas orquídeas. Uma de suas mais importantes contribuições para a taxonomia foi o relato de que umidade atmosférica não afeta o número de camadas no velame, mas sim o tempo de crescimento, maturação e espessamento celular total. Sanford & Adanlawo (1973) sugeriram o termo epivelame para a camada mais externa do velame, já que ela difere em forma, tamanho e composição de parede das camadas mais internas. Os autores mostraram que espessamentos/estrias, nas células do velame, podem estar ausentes em algumas espécies e que, quando presentes, mostram considerável consistência de padrão. Reconheceram três padrões de espessamentos/estrias parietais para essas células que, associados ao tipo de lignificação na exoderme, apontam para um indubitável significado taxonômico para o velame.

Os tilossomos, ou corpos fibrosos, como vinham sendo chamados, ganharam especial importância nas investigações de Benzing, Ott & Friedman (1982) e Pridgeon, Stern & Benzing (1983). Para Benzing, Ott & Friedman, (1982) a presença dos corpos fibrosos parece promover a economia de água e funcionar como uma válvula de sentido único. Uma vez que os canais intersticiais se expandem quando as fibras são umedecidas, o acesso hídrico às células de passagem se tornaria máxima quando o velame está completamente saturado. Se as fibras entram em colapso, quando secas, comprimem-se e impedem a transpiração na medida em que a válvula se fecha. Pridgeon, Stern & Benzing (1983) revisaram as primeiras publicações e relatos sobre esses corpos fibrosos. Os autores analisaram sua morfologia, a ocorrência sistemática e introduziram o termo “tilossomo” (do grego *tilos*, fibra + *soma*, corpo) para os concrecimentos lignificados. Os autores reconheceram sete tipos morfológicos de tilossomos: esponjoso, lamelar, discoide, em rede, em malha, baculado e entrelaçado. Alguns tipos caracterizam gêneros específicos ou subtribos de Orchidaceae, sendo que o tipo esponjoso predomina em Pleurothallidinae, Sobraliinae e Coelogykinae. Com exceção dos gêneros pantropicais *Bulbophyllum* e *Polystachya* e da subtribo paleotropical Coelogykinae, os tilossomos são fenômenos quase que exclusivamente Neotropical. É provável que os tilossomos tenham surgido várias vezes

de forma independente, ao menos uma vez na Ásia tropical, na África tropical, e também no Neotrópico, provavelmente após o surgimento do hábito epifítico como especialização frente à condição terrestre (Pridgeon, Stern & Benzing, 1983). Todavia, as especulações sobre o funcionamento dessas estruturas não foram testadas a fim de comparar a diferença absorptiva ou da evapotranspiração da raiz, na sua presença ou ausência. Sua origem também permaneceu desconhecida até o presente.

A importância sistemática dos caracteres radiculares em orquídeas só se consolidou diante da extensa investigação de Porembski & Barthlott (1988) em 262 gêneros representativos de Orchidaceae. Eles classificaram a morfologia radicular em 12 tipos, usando o número de camadas e características da parede do velame, dos tilossomos, da exoderme, do córtex e da medula. Observaram que o tipo *Pleurothallis* é restrito à subtribo neotropical Pleurothallidinae e que não aparece em nenhum outro táxon. Para os autores, as características do velame são conservadas e podem ajudar na delimitação de representantes da família, mostrando-se consistente em níveis de tribo e subtribo. Os autores, porém, não emitiram qualquer conclusão sobre a polarização dos caracteres (Porembski & Barthlott, 1988).

Entre os trabalhos anatômicos de cunho descritivo, taxonômico, ecológico e morfofisiológico, desenvolvidos no Brasil com raízes de orquídeas, destacam-se os de Scatena & Nunes (1996), Oliveira & Sajo (1999), Pires *et al.*, (2003), Silva & Milaneze-Gutierrez (2004), Figueroa *et al.*, (2008), Mayer *et al.*, (2008), Moreira & Isaias (2008), Silva *et al.*, (2010), Pedroso-De-Moraes *et al.*, (2012), Moreira, Lemos & Isaias (2013), Andreota, Barros & Sajo (2015), Bernal, Smidt & Bona (2015), Silva *et al.*, (2015), Pedroso-de-Moraes *et al.* (2018), Almeida, Smidt & Amano (2016, 2019). Tais estudos também sugerem que a organização das raízes pode ter valor taxonômico auxiliando na separação ou agrupamento de espécies. Somente Scatena & Nunes (1996), Oliveira & Sajo (1999) e Almeida, Smidt & Amano (2016, 2019) estudaram representantes da subtribo Pleurothallidinae, sendo que Scatena & Nunes (1996) não identificaram diferenças na morfologia externa, interna e histoquímica entre as raízes de *Pleurothallis rupestris* e *P. teres* (= *Acianthera teres*), Oliveira & Sajo (1999) identificaram como adaptações ao ambiente epifítico as características observadas em *Pleurothallis smithiana* (= *Acianthera pubescens*) e Almeida, Smidt & Amano (2019) mostram que todas as espécies de *Acianthera* possuem velame biestratificado e que os espessamentos da exoderme caracterizam a seção Pleurobotryae.

Considerando a importância morfológica da raiz para as orquídeas e a falta de dados para a anatomia radicular de Pleurothallidinae, esta tese teve dois objetivos gerais: **a.** descrever e revisar a anatomia radicular da subtribo Pleurothallidinae a luz da filogenética e **b.** contribuir com a ontogenia dos tilossomos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.B.R, SMIDT, E.C, AMANO, E. 2016 Development and function of root hairs in *Acianthera* Scheidw. (Orchidaceae: Pleurothallidinae). Aust. J. Basic, Appl. Sci.; 10(18): 122-126.
- ALMEIDA, A.B.R, SMIDT, E.C, AMANO, E. 2019. Evolution of anatomical characters in *Acianthera* section Pleurobotryae (Orchidaceae: Pleurothallidinae). PLoS ONE 14(3): e0212677
- ANDREOTA, R.C.; BARROS, F.; SAJO, M.G. 2015. Root and leaf anatomy of some terrestrial representatives of the Cranichideae tribe (Orchidaceae). Braz. J. Bot. doi: 10.1007/s40415-015-0133-2
- ARDITTI, J.; GHANI, A.K.A. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. New Phytol. 145: 367-421.
- BECK, C.B. 2010. An introduction to plant structure and development. Cambridge: Cambridge University Press. 441 p
- BARROS, F. et al. 2015. Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>
- BENZING, D.H. 1986. The vegetative basis of vascular epiphytism. Selbyana 9(1): 23-43.
- BENZING, D.H. 1990. Vascular epiphytes: General biology and related biota. Cambridge University. Press. 343 p.
- BENZING, D.H.; FRIEDMAN, W.E.; PETERSON, G.; RENFROW, A. 1983. Shootlessness, velamentous roots, and the pre-eminence of Orchidaceae in the epiphytic biotope. Am. J. Bot. 70: 121-133.
- BENZING, D.H.; OTT, D.W.; FRIEDMAN, W.E. 1982. Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen-exodermis complex. Am. J. Bot. 69(4): 608-14.
- BERNAL, A.A.; SMIDT, E.C.; BONA, C. 2015. Spiral root hairs in Spiranthinae (Cranichideae: Orchidaceae). Braz. J. Bot. DOI: 10.1007/s40415-015-0141-2.
- CARLSWARD, B.S.; STERN, W.L.; BYTEBIER, B. 2006. Comparative vegetative anatomy and systematics of the angraecoids (Vandaeae, Orchidaceae) with an emphasis on the leafless habit. Bot. J. Linn. Soc.; 151: 165-218.
- CHOMICKI, G. et al. 2014. The velamen protects photosynthetic orchid roots against UV-B damage, and a large dated phylogeny implies multiple gains and losses of this function during the Cenozoic. New Phytol. doi: 10.1111/nph.13106
- CUTLER, D.F.; BOTHA, T.; STEVENSON D.W. 2009. Plant anatomy: an applied approach. Oxford: Blackwell Publishing. 312p
- DICKISON W.C. 2000. Integrative plant anatomy. New York: Harcourt Academic Press. 533 p.

- DRESSLER, R.L. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Oregon. 314p.
- DYCUS, A.M.; KNUDSON, L. 1957. The role of the velamen of the aerial roots of orchids. Bot. Gaz. 119(2): 78–87.
- ENGARD, C.J. 1944. Morphological identity of the velamen and exodermis in orchids. Bot. Gaz 105: 457–462.
- ENSTONE, D.E, PETERSON, C.A, MA, F. 2003. Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to environment. J. Plant. Growth. Regul. 21: 335–351.
- EVERT, R.F. 2006. Esau's plant anatomy. Meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development. 3ed. Hoboken, NJ: John Wiley, Sons, Inc. 624 p
- FIGUEROA, C.; SALAZAR, G.S.; ZAVALETA, H.A.; ENGLEMAN, E.M. 2008. Root character evolution and systematics in Cranichidinae, Prescottiinae and Spiranthinae (Orchidaceae, Cranichideae). Ann. Bot. 101: 509–20.
- HABERLANDT, F.J. 1914. Physiological plant anatomy. Macmillan, London. 777 p.
- HIGGINS, W.E. 2004. Orchid adaptations to an epiphytic lifestyle. In: Lowman, M.D.; Rinker, H.B. eds.; Forest Canopies. Elsevier Academic Press, Burlington, 187–188.
- HODGE, A. et al. 2009. Plant root growth, architecture and function. Plant Soil 321:153–187
- KARREMANS, A.P. 2016. Genera Pleurothallidinarum: an updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. Lankesteriana 16(2): 219-241.
- KAUFF, F.; RUDALL, P.J.; CONRAN, J.G. 2000. Systematic root anatomy of Asparagales and other monocotyledons. Pl. Syst. Evol.. 223(3): 139–154.
- LEROUX, O. et al. 2011. Non–lignified helical cell wall thickenings in root cortical cells of Aspleniaceae (Polypodiales): histology and taxonomical significance. Ann. Bot. 107: 195–207. doi:10.1093/aob/mcq225.
- LUER, C.A. 1986. Icones Pleurothallidinarum I. Systematics of the Pleurothallidinae. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 15: 1–81.
- MAYER, J.L.S.; RIBAS, L.L.F.; BONA, C.; QUOIRIN, M. 2008. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas ex vitro e in vitro. Acta Bot. Bras. 22(2): 323–332.
- MOREIRA, A.S.F.P, FILHO, J.P.L, ISAIAS, R.M.S. 2013. Structural adaptations of two sympatric epiphytic orchids (Orchidaceae) to a cloudy forest environment in rocky outcrops of Southeast Brazil. Rev. Biol. Trop. 61(3): 1053-1065.
- MOREIRA, A.S.F.P.; ISAIAS, R.M.S. 2008. Comparative anatomy of the absorption roots of terrestrial and epiphytic orchids. Braz. Archiv. Biol. Technol. 5: 83–93.

- OLATUNJI, O.A.; NENGIM, R.O. 1980. Occurrence and distribution of tracheoidal elements in the Orchidaceae. Bot. J. Linn. Soc. 80(4): 357–370. doi:10.1111/j.1095–8339.1980.tb01669.x.
- OLIVEIRA, V.C.; SAJO, M.G. 1999. Root anatomy of nine Orchidaceae species. Braz. Arch. Biol. Technol. 42(4): 405–413.
- PEDROSO–DE–MORAES, C.; SOUZA–LEAL, T.; BRESCANSIN, R.L.; PETTINI–BENELLI, A.; SAJO, M.G. 2012. Radicular anatomy of twelve representatives of the Catasetinae subtribe (Orchidaceae: Cymbidieae) An. Acad. Bras. Ciênc. 84(2): 455–467.
- PETERSON, C.A.; ENSTONE, D.E. 1996. Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots. Physiol. Plant. 97: 592–598.
- PIRES, M.F.O.; SEMIR, J.; PINNA, G.F.A.M.; FELIX, L.P. 2003. Taxonomic separation of the genera *Prosthechea* and *Encyclia* (Laeliinae: Orchidaceae) using leaf and root anatomical features Bot. J. Linn. Soc. 143: 293–303.
- POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. 1988. Velamen radicum micromorphology and classification of Orchidaceae. Nordic J. Bot. 8: 117–137.
- PRIDGEON, A.M. 1982. Diagnostic anatomical characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). Am. J. Bot. 69(6): 921–938.
- PRIDGEON, A.M. 1983. The velamen and exodermis of orchid roots. In: Arditti K. ed. Orchid biology. Reviews and perspectives IV. Ithaca, NY: Cornell University Press, 139–192.
- PRIDGEON, A.M.; CHASE, M.W. 2001. A phylogenetic reclassification of the Pleurothallidinae (Orchidaceae). Lindleyana 16: 235–271.
- PRIDGEON, A.M.; CHASE, M.W. 2003. Phylogenetics of the subtribe Pleurothallidinae (Epidendreae: Orchidaceae) based on combined evidence from DNA sequences. Lankesteriana, 7: 49–50.
- PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE M.W.; RASMUSSEN F.N.; eds. 2005. Genera Orchidacearum. Volume 4. Epidendroideae (Part 1). Oxford: Oxford University Press. 696p.
- PRIDGEON, A.M.; SOLANO, R.; CHASE, M.W. 2001. Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. Am. J. Bot. 88(12): 2286–2308.
- PRIDGEON, A.M.; STERN, W.L.; BENZING, D.H. 1983. Tilosomes in roots of Orchidaceae: morphology and systematic occurrence. Amer. J. Bot. 70(9): 1365–1377.
- PYLRO, V.S.; NOGUEIRA, R.E.; LANNA, M.C.S. 2013. Anatomical Characterisation of Mycorrhizal Fungi in Neotropical Orchids. Adv. stud. biol. 5(5): 215–221.
- SANDFORD, W.W.; ADANLAWO, I. 1973. Velamen and exodermis characters of West African epiphytic orchids in relation to taxonomic grouping and habitat tolerance. Bot. J. Linn. Soc. 66: 307–321.

- SCATENA, V.L.; NUNES, A.C. 1996. Anatomia de *Pleurothallis rupestris*. Lindl. (Orchidaceae) dos campos rupestrês. Bol. Bot. Univ. São Paulo. 15: 35–43
- SCHREIBER, L.; FRANK, R.B. 2011. Endodermis and Exodermis in Roots. In: eLS. John Wiley, Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0002086.pub2
- SILVA, C.I.; MILANEZE–GUTIERRE, M.A. 2004. Caracterização morfo–anatômica dos órgãos vegetativos de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). Acta Sci. Biol. Sci. 26: 91–100.
- SILVA, I. V. et. al. 2010. Anatomia de Raízes de Espécies de Orchidaceae do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. Hoehnea 37(1): 147-161.
- SILVA, I.V. et. al. 2015. Use of anatomical root markers for species identification in *Catasetum* (Orchidaceae) at the Portal da Amazônia region, MT, Brazil. Acta Amaz. 45(1): 21– 28.
- STENZEL, H. 2000. Pollen morphology of the subtribe Pleurothallidinae Lindl. (Orchidaceae). Grana 39: 108– 125.
- STERN, W.L. 2014. Anatomy of the Monocotyledons Volume X. Orchidaceae, Oxford University Press. 288p.
- STERN, W.L. et al. 1993. Comparative vegetative anatomy and systematics of Spiranthoideae (Orchidaceae) Am. J. Bot. 113: 161–197.
- WINTER, K. et al. 1985. Crassulacean Acid Metabolism in Roots of a Leafless Orchid, *Campylocentrum tyrridion* Garay, Dunsterv. J. Plant. Physiol. 118: 73–78.
- ZOTZ, G.; WINKLER, U. 2013. Aerial roots of epiphytic orchids. the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. Oecologia 171: 733–741.

CAPÍTULO I

Caracterização e reconstrução do estado ancestral da raiz na subtribo Pleurothallidinae (Orchidaceae)

Halisson Rafael Kedrovski¹

Maria das Graças Sajo¹

¹ Botany Department, Postgraduate Program in Biological Sciences (Plant Biology), São Paulo State University, 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Halisson Rafael Kedrovski (h.r.kedrovski@hotmail.com)

RESUMO

Descrevemos a anatomia da raiz de 85 espécies, distribuídas em 29 gêneros de Pleurothallidinae e das características anatômicas radiculares observadas na subtribo, ocorrem velames uniestratificados, biestratificados, com duas ou três camadas, com três, quatro ou cinco camadas. Há espécies com exodermes finas ou espessadas em “O”, “U” ou em “ Ω ”. O parênquima cortical pode aparecer homogêneo ou heterogêneo, o cilindro vascular pode aparecer reduzido, com três a cinco arcos de protoxilema, ou desenvolvido, com nove ou mais arcos de protoxilema. Na subtribo a medula é comumente esclerificada, porém medula parenquimática ocorre de forma restrita em algumas espécies pontuais. Como apresentado na organografia, os caracteres do complexo velame-exoderme apresentam padrões consistentes a nível genérico e o tamanho celular tal qual os espessamentos parietais das células nesses tecidos são fundamentais para a identificação dos táxons. Como se espera num grupo imensamente diverso em função de poucos caracteres, a análise fenética mostra um baixo suporte estatístico, mas 35 espécies aparecem resolvidas, gêneros filogeneticamente basais ficam agrupadas na base do dendrograma, assim como para as espécies de gêneros derivados, agrupados no topo da árvore. A análise de componentes principais aponta grande importância morfológica para as características do parênquima cortical e cilindro vascular na distribuição das espécies e na resolução dos ramos no dendrograma. De acordo com as espécies amostradas, buscamos os dados de ITS disponíveis no GenBank para reconstruir os estados de caracteres ancestrais. A mérito exploratório, ao comparamos a árvore de Máxima Parcimônia para os dados do ITS como a matriz concatenada dos dados morfológicos e genéticos, notamos que ambas são muito pouco suportadas e topograficamente muito semelhantes entre si, com uma pequena melhora na resolução de alguns ramos internos da árvore de evidência total. Na reconstrução dos caracteres, o velame biestratificado aparece como o estado mais ancestral, ocorrendo em todas as espécies analisadas da Afinidade *Octomeria* e *Acianthera*, com exceção de *Sansonia vandenbergii*. Parece haver uma direção evolutiva nas características da exoderme, de espessada para paredes finas, e a redução do número de arcos de protoxilema. Já o número de camadas e tipo do córtex possuem distribuição variada em toda a subtribo, o que corrobora a utilidade taxonômica desses caracteres, assim como a medula parenquimática, de rara ocorrência. Concluímos que os caracteres radiculares são homoplásicos, mas a combinação das ocorrências pode identificar espécies, sobretudo gêneros. Os dados inéditos e as interpretações apresentadas neste capítulo contribuem significativamente para a anatomia, taxonomia e biologia evolutiva de Pleurothallidinae.

Palavras chave: análise fenética, evolução morfológica de caractere, plesiomorfia, apomorfia, sinapomorfia, velame

ABSTRACT

We describe the root anatomy of 85 species, distributed in 29 Pleurothallidinae genera; and about the root anatomical characters observed in the subtribe, there are a single-layered velamen, bistratified, two or three layered, three, four or five layered velamen. There are species with thin exodermis or "O", "U" and "∩" thickened exodermis. The cortical parenchyma can appear homogeneous or heterogeneous, the vascular cylinder can appear small with three to five protoxylem arches, or developed with nine or more protoxylem arches. In the subtribe the pith is commonly sclerified, but parenchymatous pith is restricted to some punctual species. As shown in the organization chart, the characters of the velamen-exodermis complex have generally consistent patterns, and cell size such as the wall thickening in these tissues is essential for the identification of taxa. As expected in an immensely diverse group due to few characters, the phenetic analysis shows low statistical support, but 35 species appear solved, phylogenetically basal genera are grouped at the base of the dendrogram, as well as species of derived genera, grouped at the top of the tree. The principal component analysis indicates great morphological importance for the characteristics of the cortical parenchyma and vascular cylinder in the distribution of species and in the resolution of branches in the dendrogram. According to the sampled species, we searched ITS data available from GenBank to reconstruct the ancestral character states. For exploratory merit, when we comparing the Maximum Parsimony ITS tree to the concatenated matrix of morphological and genetic data, we note that both are poorly supported and topographically very similar to each other, with a slight improvement in the resolution of some internal branches in the total evidence tree. In character reconstruction, the bistratified velamen appears as the most ancient state, occurring in all analyzed species of the *Octomeria* and *Acianthera* Affinity, except for *Sansonia vandenberghii*. There seems to be an evolutionary direction in the characteristics of the exodermis, from thickened to thin walls, and the reduction in the number of protoxylem arcs. The number of layers and cortex type has assorted distribution throughout the subtribe, which corroborates the taxonomic utility of these characters, as well the rare occurrence of the parenchymatous pith. We conclude that root characters are homoplastic, but the combination of occurrences can identify species, especially its genera. The novel data and interpretations presented in this chapter contribute significantly to the anatomy, taxonomy, and evolutionary biology of Pleurothallidinae.

Key-words: phenetic analysis, morphological character evolution, plesiomorphy, apomorphy, synapomorphy, velamen

INTRODUÇÃO

Por abranger 20% das Orchidaceae (aproximadamente 30 gêneros e 4.000 espécies), a subtribo Pleurothallidinae é um dos grupos mais diversos da família (Luer 1986, Pridgeon et al. 2001, Pridgeon et al. 2005, Karremans 2016). Seus representantes, exclusivamente neotropicais, são ervas epífitas ou rupícolas, de crescimento reptante ou cespitoso, adaptadas à polinização miofíllica e a ambientes xéricos (Benzing 1990, Dressler 1993, Borba et al 2011) e apresentam uma ampla diversidade e variação morfológica nos seus órgãos. Seus gêneros têm sido circunscritos com base no número de polínias associado ao número de lobos do estigma, à fusão entre as sépalas e à ressupinação e semelhança entre as peças do perianto (Luer 1986, Stenzel 2000, Pridgeon et al. 2005). É comum, nessas plantas, a presença de folhas coriáceas com tricomas absortivos, células armazenadoras de água, cujas paredes possuem espessamentos em espiral ou em barras (Benzing e Pridgeon 1983) e raízes clorofiladas portadoras de parênquimas desenvolvidos, velame e tilossomos (Pridgeon 1983, Pridgeon, Stern & Benzing 1983), características interpretadas como adaptações ao epifitismo e à ausência de pseudobulbos (Benzing 1986, Dressler 1993). Entretanto, é a articulação entre o ovário e o pedicelo o principal caráter sinapomórfico que circunscreve a subtribo (Luer 1986, Pridgeon & Chase 2001, Borba et al. 2011, Cardoso-Gustavson 2014).

No estudo filogenético de Pridgeon & Chase (2001) a subtribo aparece como monofilética, mas a amostragem pequena, a incerteza taxonômica e a falta de vouchers provocaram as críticas de Luer (2002), que questiona as interpretações baseadas exclusivamente em análises de DNA sem considerar dados morfológicos. A análise molecular de Chiron et al. (2012) com espécies brasileiras, restabelece os gêneros *Acianthera* Scheidweiler, *Anathallis* Barbosa Rodrigues, *Pabstiella* Brieger & Senghas, e *Specklinia* Lindley, que se mostravam polifiléticos dentro de *Pleurothallis sensu lato*. Karremans (2016) atualmente divide a subtribo em nove grupos informais denominados Afinidades, de acordo com a proximidade genética entre os gêneros.

Recentemente inúmeros estudos moleculares têm sido desenvolvidos com diversos táxons de Pleurothallidinae, a fim de testar o monofiletismo dos gêneros e entender o posicionamento infra-genérico das espécies e as relações entre os táxons derivados e ancestrais (Bogarín, Pérez-Escobar & Karremans, 2019; Rodrigues, Smidt & Bolson 2017; Wilson et al. 2017; Karremans, Albertazzi & Bakker 2016; Karremans, Bogarín & Díaz-Morales 2016; Karremans, Bakker & Pupulin 2013). Desconsiderando as réplicas ou vários marcadores para mesma espécie, apenas 20% da subtribo (887 táxons) possuem amostras genéticas para consulta (GenBank, acessado 08/2019). Já no caso de estudos anatômicos, o número de espécies analisadas é muito menor. Os mais antigos, por terem sido publicados antes das análises filogenéticas, em geral, não refletem as reais tendências de

especialização e os mais recentes envolvem um número restrito de representantes, não atingindo mais de 150 táxons analisados no total até o momento.

Estudos anatômicos são ferramentas importantes para entender a relação dos vegetais com o meio ambiente, podendo também auxiliar na identificação de diferentes táxons pela presença de apomorfias e/ou sinapomorfias. Por sofrerem menor pressão de seleção do que os órgãos reprodutivos, os órgãos vegetativos podem ser considerados mais conservativos, assumindo um papel taxonômico útil dentro de Orchidaceae (Freudenstein & Rasmussen 1999). A raiz apresenta uma grande quantidade de caracteres, como número de camadas de velame, estrias de velame, tilossomos, tipos de espessamento da exoderme e endoderme, camadas e conteúdos do parênquima cortical, números de arcos de protoxilema, estratificação do periciclo e lignificação da medula. A combinação da ocorrência entre esses caracteres discretos ou contínuos identifica táxons. Porembski & Barthlott (1988) descrevem o velame Tipo *Pleurothallis*, como possuindo duas camadas de velame, baseado em apenas em 14 espécies. Sanford e Adanlawo (1973) classificam as estrias do velame em vários grupos de acordo com a orientação e espessura sem observar espécies de Pleurothallidinae. Benzing, Ott & Friedman (1982) e Pridgeon, Stern & Benzing (1983) definiram a estrutura tilossomo descrevendo sete tipos morfológicos avaliando 12 espécies de Pleurothallidinae. Os estudos mais significativos são os de Pridgeon (1982, 1983), onde é descrita a estrutura do complexo velame-exoderme para 77 espécies, embora com poucas ilustrações e a partir de material herborizado, fato que pode comprometer a visualização das estruturas. Stern (2014) publicou o décimo volume da série "*Anatomy of the Monocotyledons*"; uma grande revisão bibliográfica sobre a histologia da família Orchidaceae. O autor compila dados anatômicos das folhas, caules e raízes, organizando de forma sistemática em nível de subtribo, seguindo a taxonomia proposta na série *Genera Orchidacearum* (Pridgeon, Cribb & Chase, 2005) e atualizando os dados propostos por Dressler (1993) e Luer (1986), porém para Pleurothallidinae, não apresenta nenhuma descrição anatômica nova, não revisa os dados reproduzidos e não discute nem interpreta a distribuição dos caracteres anatômicos nos táxons.

Considerando esta lacuna científica para a anatomia radicular de Pleurothallidinae, e o fato dos trabalhos descritivos mais extensos antecederem as análises filogenéticas (Pridgeon & Chase 2001, Pridgeon et al. 2001, Pridgeon et al. 2005), tivemos como objetivo caracterizar a anatomia radicular de 82 espécies distribuídas em 29 gêneros, brasileiros e andinos, procurando apontar possíveis sinapomorfias e apomorfias, e ainda apresentar uma reconstrução de estado ancestral dos caracteres radiculares com base em dados genéticos disponíveis no GenBank.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: Raízes frescas de 82 espécies distribuídas em 29 gêneros (Tab.1) foram obtidas de vouchers vivos depositados nas casas de vegetação do Departamento de Botânica da Universidade Estadual Paulista *campus* Rio Claro, da Universidade Federal do Paraná e do Orquidário “Frederico Carlos Hoehne” do Instituto de Botânica de São Paulo. Espécies andinas e brasileiras também foram adquiridas do Orquidário Ecuagenera, Alvin Seidel, Colibri e depositadas nas coleções científicas. Amostras de *Sansonia*, *Madisonia* e *Anathallis spiculifera* foram gentilmente cedidas por Dr. Cássio van den Berg e Dr. Edlley Pessoa.

Microscopia de luz: Para a caracterização anatômica, três raízes de cada indivíduo foram fixadas e conservadas em FAA 70. Devido a grande variação no comprimento das raízes, não pudemos padronizar uma distancia do ápice, mas levando em conta o aspecto macroscópico, amostramos regiões adultas e não aderidas de raízes vivas e saudáveis. As amostras foram desidratadas em série crescente de álcool butílico terciário, incluídas em Paraplast e seccionadas em micrótomo rotativo com 20 µm de espessura (Kraus & Arduin 1997). As secções foram coradas com Safrablue (Bukatsch 1972, Kraus & Arduin 1997), Azul de Toluidina (Feder & O'Brien 1968) e montadas em balsamo do Canadá. As fotomicrografias foram obtidas ao microscópio de luz (Leica DM2500 Microsystems, Wetzlar, Germany) equipado com câmera (DFC450 Leica Microsystems) usando o software LAS 4.0 do Laboratório de Morfologia Vegetal do Departamento de Botânica da Universidade Estadual Paulista.

Microscopia de Varredura: As amostras fixadas em FAA foram desidratadas em álcool etílico/acetona, secas em ponto crítico de CO₂, recobertas com ouro e observadas ao Microscópio de Varredura (Jeol JSM 6390 LV, Tokyo, Japan) no Laboratório de Microscopia Eletronica da Universidade Estadual Paulista *campus* de Rio Claro.

Análises fenéticas: Usando os caracteres observados e seguindo as descrições de Pridgeon, as espécies foram comparadas pela matriz binária de presença/ausência gerada com 23 caracteres (Apêndice 1). Para demonstrar graficamente os padrões de distribuição, foram utilizados métodos multivariados, incluindo a análise de componentes principais (PCA), método de ligação média não ponderada (unweighted pair-group method using arithmetic averages, UPGMA) e hierarquização, avaliando a similaridade morfológica pelo Índice de Jaccard para todas as características anatômicas da raiz utilizando o software Multi-Variate Statistical Package 3.13m (MVSP) (Kovach 1999).

Análises de estado de caracteres: Para traçar a história dos caracteres e a reconstrução dos estados ancestrais, foi realizada uma busca prévia das sequências dos espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear (nrITS) disponíveis no GenBank de acordo com as espécies analisadas (Tab. 1). O alinhamento das sequências foi

realizado usando a ferramenta Clustal W (Thompson, Higgins & Gibson, 1994) com configurações padrão, e inspecionados usando Mega 6 (Tamura et al., 2013). Os indels (marcadores de inserção / deleção) foram tratados como dados perdidos. Com base nos resultados de Pridgeon et al. (2001) e por falta de dados para o gênero *Octomeria* no GenBank, *O. gracilis* foi escolhida para enraizar todas as árvores e seus dados morfológicos foram obtidos de Kedrovski (2014). Análises de Máxima Parcimônia foram realizadas para os dados genéticos de nrITS, e evidência total (combinada) para comparar a resolução das árvores utilizando o software TNT 1.5 (Goloboff, Farris & Nixon, 2003). O suporte bootstrap foi estimado a partir da frequência absoluta em 1.000 réplicas de adição simples usando o algoritmo TBR na aleatorização dos ramos. Sete caracteres radiculares multiestados (Apêndice 2) foram plotados no software Mesquite 3.1 (Maddison & Maddison 2016) e a árvore do ITS foi incluída para traçar a história dos caracteres. Todos os caracteres foram considerados com pesos iguais e estados não ordenados e posteriormente visualizados no Winclada (Nixon 2002) para identificar possíveis sinapomorfias e apomorfias.

Organografia: As representações organográficas do complexo velame-exoderme foram esquematizadas em papel milimetrado, respeitando as proporções entre as camadas dos tecidos e tamanhos de células. Os desenhos foram digitalizados, corrigidos com Adobe Photoshop CS6 e vetorizados com o software CorelDRAW X7.

Observações: Os dados apresentados e discutidos são exclusivamente referentes às espécies coletadas durante o período do doutorado, porém, as pranchas de microscopia ótica foram preparadas para a publicação e incluem algumas imagens de espécies analisadas no mestrado para ilustrar a ampla variação das características nas Afinidades, estando devidamente referenciadas nas legendas.

Tabela 1. Lista de espécies analisadas, procedência do voucher vivo, coletor e número de acesso ao GenBank usado na reconstrução de caracteres.

Táxon	Voucher Vivo ¹	Coletor	GenBank ²
Pleurothallidinae			
<i>Acianthera</i>			
<i>A. crinita</i> (Barb.Rodr.) Pridgeon & M.W.Chase	UFPR	Santos,M	JQ306435.1
<i>A. glanduligera</i> (Lindl.) Luer	IBt13608	Zamppi,L	JQ306369.1
<i>A. glumacea</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase	UFPR	Santos,M	AF262850.1
<i>A. karlii</i> (Pabst) C.N.Gonç. & Waechter	UFPR	Santos,M	JQ306489.1
<i>A. ochreatea</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase	UFPR	Santos,M	AF366933.1
<i>A. recurva</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase	IBt3687D	Nascimento,LR/ Pereira,MA	JQ306375.1
<i>A. sonderiana</i> (Rchb.f.) Pridgeon & M.W.Chase	IBt17295	Barros,F	JQ306496.1
<i>A. sonderiana</i> (Rchb.f.) Pridgeon & M.W.Chase	UFPR	Santos, M	
<i>A. strupifolia</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase	IBt16528	Catharino,E/ Ninomya,R	JQ306440.1
<i>Acronia</i>			
<i>A. culpameae</i> Luer	ECUGEN18	Kedrovski,HR	
<i>A. pyelophera</i> Luer	ECUGEN22	Kedrovski,HR	
<i>Anathallis</i>			
<i>A. liparanges</i> (Rchb.f.) Luer	UFPR		
<i>A. spiculifera</i> (Lindl.) Luer	IBtP4808	Formaggi,L Pessoa, EM	
<i>A. spiculifera</i> (Lindl.) Luer			
<i>Andinia</i>			
<i>A. dielsii</i> (Mansf.) Luer	ECUGEN07	Kedrovski,HR	
<i>A. pendens</i> (Garay) Karremans & S.V.Uribe	ECUGEN30	Kedrovski,HR	
<i>A. schizopogon</i> (Luer) Pridgeon & M.W.Chase	ECUGEN21	Kedrovski,HR	KP012350.1
<i>Barbosella</i>			
<i>B. australis</i> (Cogn.) Schltr.	UNESP-001	Kedrovski,HR	KX686530.1
<i>B. cogniauxiana</i> (Speg. & Kraenzl.) Schltr.	UNESP-002	Kedrovski,HR	KX686531.1
<i>B. cucullata</i> (Lindl.) Schltr.	UFPR-534	Bolson, M	AF262815.1
<i>B. gardneri</i> (Lindl.) Schltr.	UFPR 623	Bolson, M	KX686534.1
<i>B. gardneri</i> (Lindl.) Schltr.	UNESP-003	Kedrovski,HR	
<i>Dracula</i>			
<i>D. bella</i> (Rchb.f.) Luer	UNESP-004	Kedrovski,HR	AF262760.1
<i>D. mopsus</i> (F.Lehm. & Kraenzl.) Luer	UNESP-005	Kedrovski,HR	EF372389.1
<i>Dresslerella</i>			
<i>D. caesariata</i> Luer	ECUGEN26	Kedrovski,HR	
<i>D. lasiocampa</i> Luer & Hirtz	ECUGEN10	Kedrovski,HR	
<i>Dryadella</i>			
<i>D. atalaiensis</i>	UFPR	Imigi, D	
<i>D. aviceps</i> (Rchb.f.) Luer	UNESP-007	Kedrovski,HR	JQ306381.1
<i>D. edwallii</i> (Cogn.) Luer	UNESP-006	Kedrovski,HR	AF262824.1
<i>D. liliputiana</i> (Cogn.) Luer	IBtP5712		
<i>D. simula</i> (Rchb.f.) Luer	ECUGEN02	Kedrovski,HR	AF262825.1
<i>D. sp.</i>	UFPR	Imigi, D	
<i>Echinosepala</i>			
<i>E. shuarii</i> (Luer) Luer	ECUGEN19	Kedrovski,HR	KP012475.1
<i>E. uncinata</i> (Fawc.) Pridgeon & M.W.Chase	ECUGEN23	Kedrovski,HR	KP012486.1
<i>Kraenzlinella</i>			
<i>K. lappago</i> (Luer) Luer	ECUGEN28	Kedrovski,HR	
<i>Lepanthes</i>			
<i>L. calodictyon</i> Hook.	ECUGEN12	Kedrovski,HR	
<i>Lepanthopsis</i>			
<i>L. floripecten</i> (Rchb.f.) Ames	UNESP-008	Kedrovski,HR	KY988898.1
<i>L. ubangii</i> Luer	ECUGEN11	Kedrovski,HR	
<i>Madisonia</i>			
<i>M. kerrii</i> (Braga) Luer		Pessoa, EM	
<i>Masdevallia</i>			
<i>M. infracta</i> Lindl.	IBt17105	Neto,G	AF262785.1
<i>M. norae</i> Luer	UFPR		
<i>M. pteroglossa</i> Schltr.	UFPR		
<i>Myoxanthus</i>			
<i>M. exasperatus</i> (Lindl.) Luer	IBt15742	Barros,F	KY988918.1
<i>Octomeria</i>			
<i>O. concolor</i> Barb.Rodr.	UNESP-009	Kedrovski,HR	
<i>O. diaphana</i> Lindl	UNESP-010	Kedrovski,HR	

Táxon	Voucher Vivo ¹	Coletor	GenBank ²
<i>O. grandiflora</i> Lindl.	UFPR	Santos, TF	
<i>Pabstiella</i>			
<i>P. bacillaris</i> (Pabst) Luer	UFPR		
<i>P. carinifera</i> (Barb.Rodr.)	UFPR		JQ306397.1
<i>P. fusca</i> (Lindl.) Chiron & Xim.Bols.	IBt15705	Barros,F	
<i>P. sordida</i> (Kraenzl.) Luer	UFPR		JQ306399.1
<i>Phloeophila</i>			
<i>P. nummularia</i> (Rchb.f.) Garay	UNESP-011	Kedrovski,HR	LT574821.1
<i>P. pleurothalloopsis</i> (Kraenzl.) Pridgeon & M.W.Chase	ECUGEN08	Kedrovski,HR	KC425747.1
<i>Platystele</i>			
<i>P. misera</i> (Lindl.) Garay	ECUGEN31	Kedrovski,HR	KF747784.1
<i>P. muscicola</i> Luer & Hirtz	ECUGEN25	Kedrovski,HR	
<i>P. stellaris</i> Luer	ECUGEN32	Kedrovski,HR	
<i>Pleurothalloopsis</i>			
<i>P. nemorosa</i> (Barb.Rodr.) Porto & Brade	IBt17352	Pinheiro,F	KT599880.1
<i>Porroglossum</i>			
<i>P. amethystinum</i> (Rchb.f.) Garay	ECUGEN17	Kedrovski,HR	AF262804.1
<i>P. dalstroemii</i> Luer	ECUGEN24	Kedrovski,HR	
<i>P. muscosum</i> (Rchb.f.) Schltr.	ECUGEN15	Kedrovski,HR	
<i>Restrepia</i>			
<i>R. aspasicensis</i> Rchb.f.	UNESP-012	Kedrovski,HR	
<i>R. brachypus</i> Rchb.f.	UNESP-013	Kedrovski,HR	MH762939.1
<i>Sansonia</i>			
<i>S. bradei</i> (Schltr.) Chiron	IBt15809		JQ306487.1
<i>S. vandenberghii</i> Chiron		van den Berg,C	JQ306442.1
<i>Scaphosepalum</i>			
<i>S. bicristatum</i> Luer	ECUGEN20	Kedrovski,HR	
<i>S. microdactylum</i> Rolfe	ECUGEN16	Kedrovski,HR	KP012460.1
<i>S. rapax</i> Luer	ECUGEN13	Kedrovski,HR	
<i>Specklinia</i>			
<i>S. grobyi</i> (Bateman ex Lindl.) F.Barros	IBt4686	L.Possi	MH762941.1
<i>S. subpicta</i> (Schltr.) F.Barros	UFPR		JQ306389.1
<i>Stelis</i>			
<i>S. argentata</i> Lindl.	UNESP-015	Kedrovski,HR	KJ472399.1
<i>S. intermedia</i> Poepp. & Endl.	UFPR		JQ306502.1
<i>S. intermedia</i> Poepp. & Endl.	UNESP-014	Kedrovski,HR	
<i>S. papaquerensis</i> Rchb.f.	UNESP-016	Kedrovski,HR	JQ306416.1
<i>S. pauciflora</i> Lindl.	UFPR		
<i>S. purpurea</i> (Ruiz & Pav.) Willd.	UNESP-017	Kedrovski,HR	
<i>Trichosalpinx</i>			
<i>T. arbuscula</i> (Lindl.) Luer	ECUGEN09	Kedrovski,HR	AF262888.1
<i>T. berlineri</i> (Luer) Luer	ECUGEN05	Kedrovski,HR	KY988984.1
<i>T. memor</i> (Rchb.f.) Luer	IBt16304	Batista,J/Silva,F	
<i>Trichosalpinx</i> sp.	IBt17620	Grantsan,R	
<i>Trisetella</i>			
<i>T. regia</i> Königler	ECUGEN04	Kedrovski,HR	
<i>T. triglochis</i> (Rchb.f.) Luer	ECUGEN03	Kedrovski,HR	AF262807.1
<i>Zootrophion</i>			
<i>Z. dayanum</i> (Rchb.f.) Luer	ECUGEN29	Kedrovski,HR	AF262895.1
<i>Z. dodsonii</i> (Luer) Luer	ECUGEN27	Kedrovski,HR	
<i>Z. griffin</i> Luer	ECUGEN01	Kedrovski,HR	
<i>Z. hirtzii</i> Luer	ECUGEN06	Kedrovski,HR	KY988996.1

1. Identificação do local de cultivo.

ECUGEN: espécies adquiridas do Orquidário Ecuagenera e depositada para cultivo na UFPR.

UNESP: espécies adquiridas de cultivadores nacionais e depositadas na UNESP-Rio Claro.

UFPR: espécies mantidas em cultivo na casa de vegetação da UFPR.

IBt: espécies mantidas em cultivo no Orquidário "Frederico Carlos Hoehne

2. Número de acesso à sequência no GenBank

RESULTADOS

O resumo da ocorrência dos caracteres anatômicos nos gêneros está indicado na Tabela 2. Os caracteres anatômicos específicos do velame, córtex e medula estão sumarizados por espécie na Tabela 3.

Caracterização geral: As raízes são clorofiladas (Fig. 1A-B, E), de diâmetro variável, longas ou curtas, podendo se mostrar dorsiventrais (Fig.1C). A presença de pelos radiculares é comum nas áreas de contato com o substrato assim como a diminuição de camadas do córtex, do espessamento total do velame e da exoderme (Fig.1C-D). As raízes comumente apresentam plastídios (Fig.1E), ráfides (Fig.1F), idioblastos traqueoidais (Fig.1G) e hifas (Fig.1H). O órgão exibe a anatomia típica das raízes de orquídeas, constituída pela epiderme especializada em velame, córtex com exoderme uniestratificada, parênquima cortical homogêneo (Fig.1C,I) ou heterogêneo (Fig. 1H) e endoderme uniestratificada (Fig.1I). No cilindro vascular, o periciclo é formado por células de paredes espessadas podendo raramente estar biestratificado, o xilema é exarco com metaxilema indistinto ou de grande calibre, intercalado com pequenos ou grandes feixes de floema sustentado por fibras. A medula pode aparecer parenquimática ou esclerificada (Fig.1C,I).

Afinidade *Octomeria* (Fig. 2, Fig.10A-F, Fig. 24.1-4)

Formada por quatro gêneros: *Atopoglossum* Luer, *Brachionidium* Lindl., *Octomeria* R.Br. e *Sansonia* Chiron, dos quais apenas *Octomeria* e *Sansonia* foram amostrados.

Nas três espécies de *Octomeria* analisadas, o velame é biestratificado com epivelame anticlinalmente achatado, endovelame anticlinalmente alongado e persistente (Fig. 2A). Nas células do epi e endovelame ocorrem espessamentos anastomosados (Fig. 2A,C, Fig. 24.4). Não se observam tilossomos ao M.O. A exoderme é comumente espessada em “∩” (Tab.3, Fig. 2A,C,D,I), o parênquima cortical é heterogêneo (Fig. 2J), com quatro a seis camadas de células, portadoras de idioblastos traqueoidais principalmente nas camadas mais externas e internas do tecido. As células da endoderme são pequenas (menores que um terço do tamanho das da exoderme), isodiamétricas e com espessamentos em “O” (Fig. 2I-J, M-N). O periciclo é uniestratificado em *O. concolor* e *O. fialhoensis* e frequentemente estratificado em *O. grandiflora*. No cilindro vascular observam-se sete e oito polos de protoxilema em *O. fialhoensis*, e doze a treze em *O. grandiflora* (Tab. 3). Nas espécies analisadas a medula é esclerificada (Fig. 2M).

As duas espécies endêmicas que compõe *Sansonia* foram analisadas. Em *S. bradei*, o velame é biestratificado (Fig. 2F,K, Fig.10B, Fig. 24.2), e em *S. vandenberghii* ele apresenta quatro camadas (Fig. 2H,L, Fig. 10C, Fig. 24.1). Espessamentos anastomosados são comuns nas células do velame de ambas as espécies (Fig. 2F,H). Em *S. bradei* as células

do epi e endovelame são do mesmo tamanho da exoderme (Fig. 2F,K). Em *S. vanderbergii* o epivelame é anticlinalmente achatado e periclinalmente alongado e as camadas do endovelame são anticlinalmente alongadas (Fig. 2H). O parênquima cortical é heterogêneo, com até sete camadas em *S. bradei* (Fig. 2K) e até dez em *S. vanderbergii* (Fig. 2L). O cilindro vascular é reduzido em *S. bradei* e possui até seis polos de protoxilema (Fig. 2O), e desenvolvido em *S. vanderbergii* com até nove polos (Fig. 2P). A medula é esclerificada em *S. bradei* e parenquimática em *S. vanderbergii* (Fig. 2O-P).

Afinidade *Restrepia* (Fig. 3, Fig. 10G-L, Fig. 11A-B,D-E, Fig. 25.5-10)

Oito gêneros são aceitos para essa afinidade: *Barbosella* Schltr., *Chamelophyton* Garay, *Dresslerella* Luer, *Echinosepala* Pridgeon & M.W.Chase, *Myoxanthus* Poepp. & Endl, *Pleurothallopsis* Porto & Brade, *Restrepia* Kunth e *Restrepiella* Garay & Dunst, dos quais apenas *Chamelophyton* e *Restrepiella* não foram analisados.

Nas quatro espécies de *Barbosella* analisadas, o velame é formado por três camadas e as células da exoderme apresentam espessamento em “U” (Fig. 3A, 10H, Fig. 24.8). O epivelame é uniestratificado, anticlinalmente achatado e periclinalmente alongado, com espessamentos anastomosados (Fig. 3A). O endovelame é biestratificado, anticlinalmente alongado e suas células possuem paredes com perfurações (Fig. 3A-B). O parênquima cortical é heterogêneo nos representantes com quatro a cinco camadas (Fig. 3I) e homogêneo naqueles com seis a sete camadas. Em *B. australis* e *B. cogniauxiana* ocorrem sete e cinco polos de protoxilema (Fig. 3I), respectivamente, e em *B. cucullata* e *B. gardneri* dez e oito a nove polos (Fig. 3O). Apenas *B. cucullata* possui periciclo estratificado e medula parenquimática (Fig. 3O).

Em *Dresslerella*, o velame é biestratificado. Em *D. caesariata*, as células do epivelame são alongadas anticlinal e periclinalmente, sendo duas ou mais vezes maiores que as do endovelame; possuem espessamentos em faixas anastomosadas (Fig. 3B, Fig. 10G, Fig. 24.5). As células da exoderme possuem espessamentos em “O” em *D. caesariata* (Fig. 3B), e em “∩”, em *D. lasiocampa*. O parênquima cortical é heterogêneo com até seis camadas e cilindro vascular apresenta sete a oito polos de protoxilema e medula esclerificada (Fig. 3J,R).

As duas espécies de *Echinosepala* analisadas são morfologicamente bastante distintas. O velame é estratificado com quatro camadas de células fortemente espessadas em “O” e sem distinção entre epi e endovelame em *E. shuarii* (Fig. 3C,F, Fig. 10I, Fig. 24.7). Em *E. uncinata*, o velame é formado por duas a três camadas de células (Fig.11A). As células da exoderme não apresentam espessamentos parietais, em *E. shuarii* (Fig. 3C, Fig. 10I), e possuem espessamentos em “O”, em *E. uncinata* (Fig. 11A). O cilindro vascular é reduzido em *E. shuarii*, com periciclo uniestratificado e sete polos de protoxilema (Fig. 3K,P),

enquanto que em *E. uncinata* os polos são em número de dez a onze e o periciclo pode ser estratificado. Nas duas espécies, o parênquima cortical é heterogêneo com até oito camadas de células e a medula é parenquimática (Fig. 3K-L,P). No córtex da raiz das duas espécies observam-se idioblastos traqueoidais, cujos espessamentos são em faixas em *E. uncinata*, e anastomosados em *E. shuari*.

Em *Myoxanthus exasperatus*, o velame possui duas camadas, mas pode apresentar até quatro camadas irregulares, dependendo da região (Fig. 3F, Fig. 24.6). As células do epivelame são anticlinalmente alongadas e apresentam espessamento parietal em “U”; no endovelame apenas as paredes periclinais são espessadas, sendo que as anticlinais são estreitas e se rompem facilmente (Fig. 3E-F,M). As células da exoderme apresentam paredes finas e o parênquima cortical heterogêneo (Fig. 3E,F,M) com quatro a cinco camadas de células (Tab. 3). As células da endoderme possuem espessamentos parietais em “O” e luz ampla (Fig. 3M,Q). No cilindro vascular, o periciclo é frequentemente estratificado e ocorrem até dezesseis polos de protoxilema; os elementos de metaxilema apresentam diâmetro desenvolvido e a medula é parenquimática (Fig. 3M,Q).

Velame bi-estratificado também aparece em *Pleurothallopsis nemorosa*, onde o epi e endovelame são formados por células anticlinalmente alongadas; as células do epivelame são periclinalmente achatadas e possuem espessamento parietal reticulado e as do endovelame são periclinalmente alongadas com espessamento parietal helicoidal (Fig. 3G, Fig. 24.10). As células da exoderme possuem espessamentos parietais em “∩” (Fig. 3G). O córtex é reduzido e heterogêneo e formado por três a quatro camadas de células (Fig. 3G). O cilindro vascular apresenta até sete polos de protoxilema e a medula é esclerificada (Tab. 3).

Em *Restrepia* (Fig. 24.9), o velame apresentam três camadas em *R. brachipus* (Fig. 3H, Fig. 11B) e duas a três camadas em *R. aspasicensis* (Fig. 3N). As células do epi e endovelame são anticlinalmente alongadas e possuem espessamentos de parede reticulado ou anastomosado. As células da exoderme possuem espessamento parietal em “∩” (Fig. 3H,N) e o córtex é heterogêneo, variando entre quatro e sete camadas de células (Fig. 3N). O cilindro vascular, com cordões de floema com muitas células e elementos do xilema de grande calibre, apresenta entre sete (Fig. 3N) e no máximo dez polos de protoxilema em *R. brachipus* (Tab. 3). A medula é esclerificada em ambas espécies (Fig. 3N).

Afinidade *Acianthera* (Fig. 4, Fig. 11C,F, Fig. 24.11-12)

Somente *Acianthera* Scheidw e *Kraenzlinella* Kuntze são aceitos como gêneros dessa Afinidade.

Nas espécies de *Acianthera*, o velame biestratificado apresenta epivelame de células anticlinalmente achatadas ou isodiamétricas (Fig. 4A-B,E-G), raramente alongadas (Fig.

4C), com espessamento de parede em "U" e endovelame frágil que se rompe facilmente dificultando sua observação (Fig. 24.11). Não se observam tilossomos ao M.O. As células da exoderme possuem espessamento parietal em "O" (Fig. 4B-C,F-G), embora em *A. glumacea* e *A. ochreatea* esse espessamento seja em "∩" (Fig. 4A,E). Exceto por *A. ochreatea*, com córtex homogêneo de até sete camadas de células (Fig. 4E,I), o parênquima cortical é heterogêneo e formado por três a seis camadas (Fig. 4F,G). O cilindro vascular possui diâmetro amplo, com os polos de protoxilema variando de nove e quatorze (Fig. 4I-I), embora em *A. crinita*, *A. glanduligera*, *A. karlii* e *A. sonderiana* ocorram sete a oito polos de protoxilema (Fig. 4 F-G). O periciclo aparece frequentemente estratificado em *A. karlii*, *A. ochreatea* e *A. strupifolia*. Apenas *A. recurva* apresenta medula parenquimática (Fig. 4J), uma vez que medula esclerificada é comum (Fig. 4F-G,I).

Em *Kraenzlinella lappago*, o velame também é biestratificado e as células do epivelame são muito anticlinalmente alongadas e possuem espessamento parietal em "U" e anastomosados (Fig. 4D,H; Fig. 24.12). Como na espécie anterior, o endovelame se rompe facilmente. Tilossomos são facilmente visualizados ao M.O. As células da exoderme possuem paredes delgadas (Fig. 4D) e o parênquima cortical, com seis a sete camadas, é formado por células desenvolvidas no terço médio da raiz (Fig. 4H). O cilindro vascular possui diâmetro amplo, com nove a dez polos de protoxilema e a medula é esclerificada (Fig. 4K).

Afinidade *Lepanthes* (Fig. 5, Fig. 24.13-17)

Oito gêneros que compõem essa afinidade são *Anathallis* Barb.Rodr., *Draconanthes* (Luer) Luer, *Fronitaria* Schltr., *Lankesteriana* Karremans, *Lepanthes* Sw., *Lepanthopsis* (Cogn.) Ames, *Trichosalpinx* Luer, e *Zootrophion* Luer, sendo que representantes de *Draconanthes*, *Fronitaria* e *Lankesteriana* não puderam ser analisados.

Nas duas espécies de *Anathallis*, o complexo velame-exoderme se mostrou diferente. *A. liparanges* possui velame biestratificado, com células do epivelame fortemente espessadas em "U", anticlinalmente alongadas e periclinalmente achatadas e o endovelame é frágil rompendo-se facilmente (Fig. 5A-B, Fig. 24.15). Em *A. spiculifera* o velame é formado por três camadas de células, as células do epivelame são poligonais e isodiamétricas e as do endovelame são anticlinalmente alongadas (Fig. 5I); tanto o epi como o endovelame possuem células com espessamento parietal anastomosado e reticulado. A exoderme é formada por células delgadas em *A. liparanges* (Fig. 4A), e por células de paredes espessadas em "∩", em *A. spiculifera* (Fig. 4I). O córtex é reduzido, com três a quatro camadas, em *A. liparanges*, e até cinco camadas, em *A. spiculifera* (Fig. 4I). No cilindro vascular observam-se seis polos de protoxilema em *A. liparanges*, e até cinco, em *A. spiculifera* (Fig. 4I). A medula é esclerificada nas duas espécies.

Em *Lepanthes calodictyon*, o velame é uniestratificado (Fig. 5C, Fig. 24.16), a exoderme é formada por células de paredes finas e lúmen desenvolvido, o córtex é reduzido, com três a quatro camadas de células, sendo ligeiramente mais desenvolvido no terço médio (Fig. 5J). No cilindro vascular observam-se apenas três polos de protoxilema e a medula é esclerificada (Fig. 5J).

As duas espécies de *Lepanthopsis* analisadas possuem velame biestratificado (Fig. 24.17). Em *L. floripecten*, o epivelame possui células isodiamétricas e o endovelame anticlinalmente alongadas de paredes periclinais persistentes (Fig. 5D,K). Em *L. ubangii*, as células do epivelame são anticlinalmente achatadas e apresentam espessamento parietal em “U” e o endovelame rompe-se facilmente, fato que dificulta sua observação (Fig. 5E,L). As células da exoderme possuem paredes com espessamento em “∩”, em *L. floripecten* (Fig. D,K) e paredes delgadas, em *L. ubangii* (Fig. 5E,L). O córtex é bastante reduzido nas duas espécies, com três a quatro camadas de células, sendo ligeiramente mais desenvolvido no terço médio, como no gênero anterior (Fig. 5K-L). Também como no gênero anterior, o cilindro vascular é reduzido e possui três a cinco polos de protoxilema (Fig. 5O). A medula é esclerificada.

Em *Trichosalpinx*, o velame é biestratificado e suas células possuem espessamentos parietais em “U”; as células do epivelame variam entre alongado (Fig. 5F) e isodiamétrico (Fig. 5G), e endovelame é formado por células de paredes delgadas que se rompem facilmente (Fig. 24.14). A exoderme também é formada por células de paredes delgadas (Fig. 5F-G) e o parênquima cortical, heterogêneo, apresenta três a cinco camadas de células. O diâmetro do cilindro vascular é reduzido, com quatro a seis polos de protoxilema, e a medula é esclerificada (Tab. 3).

Nas espécies de *Zootrophion*, o velame, também biestratificado, possui células do epivelame anticlinalmente alongadas, com espessamentos parietais em “U”, que se apresentam anastomosados e reticulados; as células do endovelame possuem paredes finas e rompem-se facilmente (Fig. 5H,M, Fig. 24.13). Tilossomos são evidentes ao M.O. As células da exoderme também possuem paredes delgadas (Fig. 5H,M). Em *Z. dayanum* e *Z. dodsonii*, o córtex é homogêneo e possui até oito camadas de células (Fig. 5M). No cilindro vascular dessas duas espécies, o periciclo é biestratificado, ocorrem até onze polos de protoxilema e a medula é parenquimática (Fig. 5Q). Em *Z. griffin* e *Z. hirtzii*, o córtex é heterogêneo, com menos de cinco camadas celulares e no cilindro vascular, o periciclo é uniestratificado, ocorrem de cinco a oito polos de protoxilema e a medula é esclerificada (Tab.3).

Afinidade *Masdevallia* (Fig. 6, Fig. 24.18-21)

São reconhecidos cinco gêneros bem definidos para esta afinidade: *Diodonopsis* Pridgeon & M.W.Chase, *Dracula* Luer, *Masdevallia* Ruiz & Pav., *Porroglossum* Schltr. and *Trisetella* Luer.

Nas duas espécies de *Dracula*, o velame possui cinco camadas de células poligonais isodiamétricas e não se observa uma diferenciação tanto do epi como do endovelame (Fig. 24.19), embora possa ocorrer um discreto espessamento parietal em “U” na camada mais externa (Fig. 6A,F). Em todas as camadas do velame são frequentes células com espessamentos parietais anastomosados. Tilossomos são evidentes ao M.O. A exoderme é formada por células de paredes delgadas (Fig. 6A), o parênquima cortical é homogêneo e formado por seis a nove camadas de células (Fig. 6G). O cilindro vascular possui seis a oito polos de protoxilema e muitas células nos cordões de floema (Fig. 6F,J). Os elementos de metaxilema são de diâmetro desenvolvido e a medula é esclerificada (Fig. 6F,G).

Em *Masdevallia* (Fig. 24.21), o velame é formado por cinco camadas celulares em *M. infracta* (Fig. 6B,G), por quatro camadas em *M. norae*, e por duas camadas em *M. pteroglossa* (Fig. 6C). Nos velames pluriestratificados, as células são poligonais e isodiamétricas, e não se observa uma diferenciação nas camadas externa e interna (Fig. 6B,G). No velame biestratificado, as células do epivelame são desenvolvidas e apresentam, aproximadamente, o dobro do tamanho das células do endovelame (Fig. 6C). Espessamentos parietais anastomosados e perfurações são comuns nos velames pluriestratificados (Fig. 6B,G) enquanto que no velame biestratificado observam-se apenas espessamentos parietais anastomosados (Fig. 6C). As células da exoderme possuem paredes finas e o córtex, homogêneo, é formado por seis a oito camadas celulares (Fig. 6G). O periciclo é frequentemente estratificado em *M. norae* e uniestratificado em *M. infracta* e em *M. pteroglossa*. Ocorrem até dez polos de protoxilema com elementos de metaxilema desenvolvidos e os cordões de floema são formados por um grande número de células. A medula é esclerificada (Fig. 6J).

Em *Porroglossum* (Fig. 24.20), o velame é biestratificado e as células do epivelame são isodiamétricas (Fig. 6D,H) ou anticlinalmente alongadas (Fig. 6I) e apresentam discretos espessamentos parietais em “U”; as células do endovelame possuem paredes delgadas e se rompem facilmente. As células da exoderme também possuem paredes delgadas (Fig. 6D,H,I) e o parênquima cortical, homogêneo, possui até oito camadas de células (Fig. 6H,I). No cilindro vascular, observam-se sete a oito polos de protoxilema, com elementos de metaxilema desenvolvidos, e cordões de floema formados por um grande número de células. A medula é esclerificada (Fig. 6 H,I).

Como em *Porroglossum*, nas espécies de *Trisetella*, o velame é biestratificado e as células do epivelame são anticlinalmente alongadas, com espessamentos parietais em “U”;

as células do endovelame são anticlinalmente achatadas (Fig. 6E, Fig. 24.18)). As células da exoderme possuem paredes delgadas e o parênquima não pode ser observado pela má qualidade das amostras. O cilindro vascular é de diâmetro reduzido e apresenta cinco a oito polos de protoxilema e elementos de metaxilema desenvolvidos, e cordões de floema formados por um grande número de células. A medula é esclerificada (Tab.3).

Afinidade *Phloeophila* (Fig. 7)

O gênero *Phloeophila* Hoehne & Schltr. é o único táxon reconhecido que inclui esse grupo.

Em *Phloeophila*, o velame é biestratificado, e as células do epivelame, isodiamétricas, apresentam espessamentos parietais em “U”; o endovelame é formado por células de paredes delgadas que se rompem facilmente (Fig. 7A-B,D). A exoderme é formada por células com paredes espessadas em “O” em *P. nummularia* (Fig. 7A,C), e células de paredes delgadas em *P. pleurothalloopsis* (Fig. 7B,D). Tilossomos são evidentes apenas em *P. pleurothalloopsis* (Fig. 7B). O córtex é heterogêneo e possui três a quatro camadas de células em *P. pleurothalloopsis* (Fig. 7D), e até oito em *P. nummularia* (Fig. 7C). No cilindro vascular observam-se até seis polos de protoxilema, em *P. Pleurothalloopsis* (Fig. 7F), e até nove em *P. nummularia* (Fig. 7E); nas duas espécies, os elementos de metaxilema são desenvolvidos e os cordões de floema possuem muitas células e fibras. A medula é esclerificada.

Afinidade *Specklinia* (Fig. 8, Fig. 24.22-26)

Esta afinidade é formada por sete gêneros: *Andinia* (Luer) Luer, *Dryadella* Luer, *Muscarella* Luer, *Platystele* Schltr., *Scaphosepalum* Pfitzer, *Specklinia* Lindl., e *Teagueia* (Luer) Luer, sendo que apenas *Muscarella* e *Teagueia* não foram amostrados.

Em *Andinia*, o velame é biestratificado, com células do epivelame anticlinalmente alongadas e portadoras de espessamento parietal em “U” (Fig. 8A, Fig. 24.22); somente em *A. schizopogon*, o velame é formado por três camadas e as células do epivelame são anticlinalmente achatadas (Fig. 8F). A exoderme possui células de paredes finas (Fig. 8A,F), o córtex é homogêneo com até oito camadas em *A. schizopogon* (Fig. 8F) ao contrário de *A. pendens*, variando entre três a cinco camadas de células (Tab. 3). O cilindro vascular é de diâmetro reduzido, o periciclo é uniestratificado e ocorrem até cinco polos de protoxilema. Apenas em *A. schizopogon*, o periciclo pluriestratificado e ocorrem até doze polos de protoxilema (Fig. 8K). A medula é esclerificada.

O velame também é biestratificado em *Dryadella* (Fig. 24.23) no qual as células do epivelame são isodiamétricas e possuem espessamento parietal em “U”; as células do endovelame são anticlinalmente alongadas (Fig. 8B,G). A exoderme é formada por células de paredes delgadas (Fig. 8B) e o córtex é homogêneo e possui até cinco camadas de

células (Fig. 8G). O cilindro vascular é de diâmetro reduzido, com até cinco polos de protoxilema e medula esclerificada (Fig. 8L).

Em *Platystele* (Fig. 24.26), o velame também é biestratificado e as células do epivelame são isodiamétricas e apresentam espessamento parietal em “U”; as células do endovelame possuem paredes delgadas rompendo-se facilmente (Fig. 8C). As células da exoderme são de parede delgada e o córtex é homogêneo e formado por três a quatro camadas em *P. misera* (Tab. 3), e por até seis camadas, em *P. stellaris* (Fig. 8H). O cilindro vascular é de diâmetro reduzido, com três a quatro polos de protoxilema, em *P. misera* (Fig. 8M), e até seis polos em *P. stellaris* (Fig. 8H). A medula é esclerificada (Fig. 8H).

Como nos gêneros anteriores, em *Scaphosepalum* (Fig. 24.25), o velame é biestratificado (Fig. 8D), exceto por *S. bicristatum*, com velame de três camadas (Fig. 8I). As células do epivelame são anticlinalmente alongadas em *S. rapax*, bastante alongadas anticlinalmente em *S. microdactylum* (Fig. 8D), e isodiamétricas em *S. bicristatum* (Fig. 8I). Em todas as espécies, essas células possuem espessamento parietal em “U” e as do endovelame são de parede delgadas e se rompem facilmente. Em *S. bicristatum*, as células da camada mediana de velame possuem espessamento nas paredes periclinais (Fig. 8I). As células da exoderme possuem paredes delgadas e o córtex é heterogêneo com menos de cinco camadas de células (Fig. 8I). O diâmetro do cilindro vascular é reduzido e ocorrem cinco a sete polos de protoxilema. A medula é esclerificada (Fig. 8N).

Em *Specklinia* (Fig. 24.24), com velame também biestratificado, as células do epivelame são anticlinalmente alongadas e possuem espessamento em “U” nas paredes (Fig. 8E,J). A exoderme é formada por células de paredes delgadas (Fig. 8E,J) e o córtex, com até cinco camadas de células é homogêneo em *S. subpicta* e heterogêneo em *S. grobyi* (Fig. 8J). O diâmetro do cilindro vascular é reduzido e ocorrem cinco a seis polos de protoxilema. A medula é esclerificada (Fig. 8O).

Afinidade *Pleurothallis* (Fig. 9, Fig. 24.27-28)

Três gêneros compõem esse grupo derivado: *Pabstiella* Brieger & Senghas, *Pleurothallis* R.Br. e *Stelis* Sw.

Pabstiella (Fig. 24.28) possui velame biestratificado, com células do epivelame anticlinalmente achatadas e portadoras de espessamento parietal em “U” e “O”; as células do endovelame são anticlinalmente alongadas (Fig. 9A-C,G-J). É comum a ocorrência de espessamentos parietais anastomosados e reticulados nas células das camadas do velame (Fig. 9 A-C). As células da endoderme possuem paredes delgadas (Fig. 9A-C) e o córtex bastante reduzido e heterogêneo; três a quatro camadas de células ocorrem com o terço médio de maior volume (Fig. 9G-I). O cilindro vascular possui diâmetro reduzido, com

menos de seis polos de protoxilema (Fig. 9G-I); os cordões de floema são formados por poucas células. A medula é esclerificada (Fig. 9G-I).

Velame biestratificado também aparece em *Stelis*, onde epi e endovelame são formados por células anticlinalmente alongadas, portadoras de espessamento parietal anastomosado e reticulado no epivelame (Fig. 9E) e helicoidal no endovelame (Fig. 9D,K,M, Fig. 24.27). Tilossomos são evidentes ao M.O. (Fig. 9D,M). A exoderme é formada por células de paredes delgadas (Fig. 9D-E,K-L) ou com espessamento “O” (Fig. 8M, Tab. 3), e o córtex é heterogêneo e possui apenas três camadas de células com células da camada mediana muito desenvolvidas (Fig. 9K-M). O cilindro vascular tem diâmetro reduzido, com quatro a cinco polos de protoxilema, em *S. intermedia*, e até oito em *S. papaquerensis*. Os metaxilema são evidentes, mas os cordões de floema não possuem muitas células. A medula é esclerificada (Fig. 9K-M).

Incertae sedis

Dois gêneros tem posição incerta: *Madisonia* Luer e *Acronia* C.Presl. (Fig. 24.2,29)

Em *Madisonia kerri*, o velame é biestratificado, as células do epivelame são isodiamétricas a periclinalmente alongadas e as do endovelame são ligeiramente alongadas anticlinalmente (Fig. 10A). Nas células dessas duas camadas observam-se espessamentos de parede anastomosados. As células da exoderme possuem paredes espessadas em “ \cap ” (Fig. 10A) e o córtex é heterogêneo com quatro a cinco camadas de células. O cilindro vascular é de diâmetro reduzido, com seis polos de protoxilema e medula esclerificada (Tab. 3).

Acronia possui velame de três camadas, com células do epivelame anticlinalmente achatadas; o endovelame é biestratificado com células isodiamétricas na camada externa, e anticlinalmente alongadas na camada interna (Fig. 9F,N). Tilossomos são evidentes ao M.O. (Fig. 9N). As células da exoderme possuem paredes bastante espessadas em “ \cap ” (Fig. 9F,N) e o córtex, heterogêneo, é formado por três a quatro camadas de células com muitos idioblastos traqueoidais. No cilindro vascular observam-se seis polos de protoxilema, elementos de metaxilema de grande diâmetro e cordões de floema formado por muitas células (Fig. 9N).

Análises fenéticas: O gráfico tridimensional da análise de componentes principais confere um baixo suporte de 49,32% na distribuição dos caracteres nos três primeiros eixos (x:20,06%; y:17,12%; z:12,14%) (Fig. 18A-C). Em comparação aos pequenos vetores ocultados (velame uniestratificado, estratificado com 4 e 5 camadas, exoderme espessada em U, córtex com cinco a seis camadas de células e 9 ou mais), a exoderme fina, o tipo de parênquima cortical, a presença de três a cinco camadas de parênquima cortical,

protoxilema com três a cinco arcos e nove ou mais são observados como os maiores vetores (Fig. 17A), influenciando fortemente a distribuição das espécies no espaço amostral (Fig.17B) e a topologia do dendrograma retornado na análise de cluster (Fig. 18). São formados nove agrupamentos na análise de cluster (Fig. 18), sendo que a dicotomia inicial separa *Sansonia vanderbergii* como a espécie morfológicamente mais distinta por possuir velame com quatro camadas, um parênquima cortical heterogêneo com até dez camadas de célula, um alto número de arcos de protoxilema e medula parenquimática. No grupamento A, *Masdevallia* e *Dracula* estão morfológicamente relacionados, sendo que *D. bella* e *D. mopsus* não apresentam diferenças anatômicas, formando uma politomia. Outras três grandes politomias são observadas no ramo B, C1 e C2, mostrando que os caracteres radiculares usados não são suficientes para separar espécies de *Dryadella*, *Platystele*, *Specklinia* e *Trichosalpinx* no grupamento B, *Lepanthopsis*, *Pabstiella*, *Specklinia* e *Trichosalpinx* no grupamento C1 e *Anathallis*, *Stelis* e *Pabstiella* no grupamento C2. No grupamento D1 nota-se que *Dresslerella caesariata* é mais semelhante às espécies de *Acianthera* do que *Dresslerella lasiocampa*, semelhante a *Octomeria*, *Madisonia*, *Sansonia* e *Pleurothallopsis nemorosa*. No ramo irmão, D2, espécies de *Acianthera* estão colocadas junto com *Restrepia aspasicensis* e duas espécies de *Octomeria*. Com exceção de *Barbosella cucullata*, as espécies de *Barbosella* estão dispostas no mesmo ramo do grupamento E com *Anathallis spiculifera*, *Restrepia brachypus* e *Scaphosepalum bicristatum*, que compartilham o mesmo número de camadas de velame. O grupamento F reúne oito espécies com medula parenquimática e periciclo frequentemente estratificado, incluindo *Andinia*, *Barbosella cucullata*, *Myoxanthus* e *Echinosepala*. O último grupamento aproxima *Phloeophila nummularia* de *Acianthera ochreatea*.

Ensaio filogenético: A análise filogenética da região ITS (Fig. 19A) e da evidência total (Fig. 19B) geraram 12 árvores igualmente parcimoniosas. A árvore consenso do ITS mostrou um baixo índice de retenção (IR) de 0,49, de consistência (IC) de 0,43, apresentando ainda uma politomia entre *Barbosella gardneri*, *B. cogniauxia* e *B. australis*. Sua topologia é muito pouco suportada, sendo que dos 45 nós, apenas onze tem ótimo suporte, três são moderadamente suportados e dois fracamente suportados. Todos os outros 29 nós não são suportados. A árvore combinada retorna uma topologia igualmente pouco suportada, com IR de 0,48 e IC de 0,41. Há pouca diferença entre os suportes nos ramos do ITS e da combinada, porém há o aumento do suporte em *Acianthera*, resolução da politomia em *Barbosella* e realocação de *Phloeophila pleurothallopsis* próximo a *Stelis*. O gênero *Sansonia* parece não ser monofilético e grupo irmão de *Octomeria*, formando o conjunto de espécies mais basal da subtribo nesse estudo. *Pleurothallopsis* e *Acianthera* formam outro claro basal moderadamente suportado, irmão de *Echinosepala-Restrepia-Myoxanthus*.

Barbosella é monofilético com grande suporte, *Lepanthopsis* aparece inserido entre *Trichosalpinx* e parafilético a *Zootrophion*. *Trisetella* está relacionado com *Porroglossum* e *Masdevallia*, que é grupo irmão de *Dracula*. Nos clados mais derivados, *Phloeophila* forma um grupo polifilético e próximo a *Stelis* como braço terminal. Na análise, *Andinia* retorna parafilético a *Pabstiella*, assim como *Dryadella* parece ser polifilético e grupo irmão de *Specklinia*, *Scaphosepalum* e *Platystele*. A topografia retornada nesse ensaio é muito semelhante às relações filogenéticas publicadas por Karremans (2016), porém não podem ser comparadas, uma vez que este ensaio foi realizado apenas com um marcador filogenético, sem um grupo externo de fato e possui como única finalidade gerar uma árvore base para reconstruir a história dos caracteres radiculares.

Evolução dos caracteres radiculares: Para os caracteres do complexo velame-exoderme (Fig. 20), o velame biestratificado e exoderme espessada em “ \cap ” podem ser considerados caracteres plesiomórficos, pois, com exceção do velame com quatro camadas em *Sansonia vandenbergii*, ocorre em todos os gêneros da Afinidade *Octomeria*, o grupo mais basal na filogenia. A Afinidade *Restrepia* é complexa e apresenta uma variação no número de camadas de velame e exoderme. Possui como apomorfia o velame com três camadas em *Restrepia brachypus* e *Echinosepala uncinata*, uma homoplasia em *Echinosepala shuarii* com velame de quatro camadas, e uma simpliesiomorfia em *Myoxanthus exasperatus* com velame de duas camadas. Na Afinidade *Restrepia*, células da exoderme com paredes delgadas representa uma apomorfia de *Myoxanthus* e *Echinosepala*, que será compartilhada com a maioria das espécies derivadas. Na análise aqui apresentada, *Barbosella* possui a exoderme espessada em “U” como única sinapomorfia (Fig. 23) e compartilha o velame com três camadas de *Restrepia brachypus* e *Echinosepala uncinata*. A Afinidade *Lepanthes* compartilha o velame biestratificado de *Octomeria*, e *Lepanthopsis floripecten* ainda apresenta a exoderme espessada em “ \cap ” como simpliesiomorfia. Na Afinidade *Masdevallia* o velame com cinco camadas de células é um carácter apomórfico compartilhado entre *Masdevallia infracta* e as duas espécies de *Dracula*. *Porroglossum* e *Trisetella* mantém o estado plesiomórfico do velame, com duas camadas. *Phloeophila nummularia* possui o complexo velame-exoderme semelhante ao observado na Afinidade *Acianthera* onde as células da exoderme possuem paredes espessadas em “O”; já *Phloeophila pleurothallopsis* exibe células da exoderme com paredes delgadas, carácter apomórfico derivado. Nas Afinidades *Pleurothallis* e *Specklinia* ocorrem duas simpliesiomorfias: velame com três camadas, em *Andinia*, e exoderme com células de paredes espessada em “O”, em *Stelis intermedia*.

O córtex parece ser variável e homoplástico (Fig. 21). Por exemplo, três a quatro camadas de células que ocorre em *Octomeria gracilis*, o gênero mais basal da análise,

aparece também em *Pleurothalloopsis*, *Acianthera*, *Lepanthopsis*, *Phloeophila*, *Stelis*, *Pabstiella*, e *Specklinia*, grupos mais derivados. Córtex apomórfico com cinco a seis camadas, como o de *Sansonia bradei*, aparece em *Acianthera*, *Restrepia*, *Myoxanthus*, *Echinosepala*, *Barbosella*, *Trichosalpinx*, *Zootrophion*, *Dryadella*, *Specklinia*, *Platystele* e *Scaphosepalum*, também derivados em relação à *Sansonia*. Isso se repete para o córtex com seis a oito camadas. Nota-se que apenas o córtex com mais de nove camadas, apomórfico em *Sansonia vandenbergii*, ocorre como simplesiomorfia nas espécies de *Dracula*.

Para o cilindro vascular (Fig. 22), a medula parenquimática, apomórfica em *Sansonia vandenbergii*, aparece como uma simplesiomorfia em *Acianthera recurva*, na Afinidade *Restrepia* (com exceção de *Restrepia brachipus*) e em *Zootrophion dayanum*. Medula parenquimática aparece em raízes com nove ou mais polos de protoxilema, exceto por *Acianthera glumacea*, *A. ochreatea* e *Echinosepala uncinata*, que possuem mais de nove arcos de protoxilema e suas medulas são esclerificadas. Levando em consideração a estabilidade genética e morfológica em *Barbosella*, é importante destacar a ocorrência de medula parenquimática em *Barbosella cucullata*, a única espécie com medula deste tipo amostrada no gênero.

DISCUSSÃO

Velame: Nossas observações demonstram que o número de camadas do velame é constante para *Barbosella*, *Acianthera*, *Dracula*, *Dryadella*, *Specklinia*, *Stelis*, *Pabstiella*, e varia em *Octomeria*, *Sansonia*, *Restrepia*, *Anathallis*, *Masdevallia*, (Tab. 2). Velames biestratificados são mais frequentes que velames estratificados (Tab.3). O epivelame, quando presente, é formado por células de contorno pentagonal em corte transversal e que geralmente possuem impregnações de suberina e compostos fenólicos, incluindo lignina. O epivelame pode ou não ser estratificado e suas células podem ser pouco desenvolvidas anticlinal ou periclinalmente. As células do endovelame são, em geral, desenvolvidas anticlinalmente e suas paredes podem ser delgadas e frágeis, como em *Acianthera*, ou persistentes, como em *Octomeria*.

Velame biestratificado, como aqui reportado para os representantes da Afinidade *Octomeria*, diverge do descrito por Pridgeon (1983), fato que pode ser explicado pelo pequeno número de espécies aqui analisadas. Dentro dessa Afinidade, as raízes de *Sansonia bradei* são de estrutura semelhante às de *Octomeria*, exceto por *Sansonia vanderbergii*.

Velame biestratificado caracteriza as raízes da Afinidade *Acianthera*, conforme descrito por Scatena & Nunes (1996), Oliveira & Sajo (1999), Silva et al. (2010) e Almeida, Smidt & Amano (2019). Dentro da Afinidade *Restrepia*, velame estratificado com três camadas, como aqui observado para *Barbosella* e *Restrepia*, também aparece em outros representantes do grupo (Pridgeon 1983; Porembski & Barthlott 1988) e velame biestratificado, como o de *Pleurothallopsis nemorosa*, espécie endêmica brasileira, também foi reportada para a mesma espécie por Almeida, Smidt & Amano (2019). Embora tenha estudado espécies diferentes, Pridgeon (1983) descreve velame uni e biestratificado, com duas a três camadas de células, para *Restrepia*; entretanto, no presente estudo apenas velames com duas a três camadas foram observados dentro deste gênero (Fig. 3H,N). As imagens de microscopia eletrônica de varredura das raízes de *Restrepia brachipus* (Fig. 11B) são muito semelhantes, se não idêntica, às de *Restrepia ophiocephala* publicadas no trabalho de Pridgeon (1982). Nossos dados também concordam com o velame biestratificado observado por Pridgeon & Williams (1979) nas espécies de *Dresslerella*.

É importante destacar que na Afinidade *Lepanthes*, em *Lepanthes calodictyon* o velame é uniestratificado (Fig. 5C,J), diferindo do descrito para *Lepanthes selenitepala* (Porembski & Barthlott, 1988), a única espécie descrita morfológicamente do gênero, com duas a três camadas de célula no velame. Em *Anathallis liparanges* o velame é biestratificado e o epivelame formado por células alongadas anticlinalmente e de paredes fortemente espessadas em “U”; em *A. spiculifera*, o velame possui três camadas. Essa variação no número de camadas celulares que compõem o velame de *Anathallis* está de

acordo com as observações de Pridgeon (1983), que descreve velames uniestratificado, biestratificado e com quatro camadas de células para o gênero. Em *Zootrophion*, outro gênero incluído na Afinidade *Anathallis*, as raízes possuem velame biestratificado com células do epivelame bastante desenvolvidas anticlinalmente, embora Pridgeon (1983) descreva velames uniestratificado para *Z. dayanum* e *Z. hypodiscus*. Embora nossa amostragem não seja significativa, os velames biestratificados encontrados em *Myoxanthus* e *Dresslerella* concordam com as observações de Pridgeon & Stern (1982, 1983) e Pridgeon & Williams (1979), para os mesmos gêneros.

Dentro da Afinidade *Masdevallia* as raízes nos gêneros *Dracula* e *Masdevallia* possuem velame estratificado formado principalmente por quatro a cinco camadas de células, enquanto que as dos gêneros *Trisetella* e *Porroglossum* apresentam velame biestratificado. Esses resultados diferem do descrito por Pridgeon (1983), que aponta raízes de *Dracula* com duas ou três camadas de velame, as de *Masdevallia infracta* com velame de duas camadas, e as de *Trisetella huebneri* e *Porroglossum amethystinum* com velame uniestratificado.

As descrições de Pridgeon (1983) para o velame das raízes de representantes das Afinidades *Specklinia* e *Pleurothallis* também diferem do observado aqui para os gêneros desses grupos. De modo geral, essa diferença entre os dados do velame pode ser resultado de muitos fatores, desde a fragilidade dos tecidos até a própria qualidade da amostra, que quase sempre é rara e de difícil obtenção. Talvez por isso o fato de muitas espécies terem sido descritas com o número de camadas do velame diferente dos reportados por nós. Além disso, o número de camadas que compõem o velame, bem como o tamanho das células pode apresentar variações significativas, como redução do tamanho celular, no número de camadas, ou o não espessamento em regiões de contato com o substrato. Tal plasticidade também pode explicar a ocorrência de diferentes números de camadas de velame numa mesma espécie. É importante considerar que velames com duas a três camadas, como os de *Octomeria* e *Restrepia*, podem ser reconhecidos pela ocorrência ou não da terceira camada em toda a circunferência e extensão do órgão, e não apenas em pontos específicos.

Estriações de parede celular e estrutura do velame: As células do velame possuem espessamentos secundários característicos, em geral, de distribuição uniforme. Além dos tipos reticulado, anastomosado e helicoidal (Sanford & Adanlawo 1973), reconhecemos, mais dois tipos de espessamento parietal: em “O” (todas as paredes igualmente espessadas) e em “U” (paredes anticlinais e periclinal interna espessadas). De acordo com Porembski & Barthlott (1988), esses espessamentos servem para estabilizar as células mortas e cheias de ar do velame, a presença/ausência desses diferentes tipos de

espessamentos permite delimitar tribos, da mesma forma que sua densidade e disposição dos poros caracterizam determinados táxons. Nossos resultados mostram que velame com células perfuradas são característicos de *Barbosella* na Afinidade *Restrepia*, *Masdevallia* e *Porroglossum* na Afinidade *Masdevallia*, que espessamentos parietais reticulados nas células epivelame e helicoidais, nas células do endovelame, aparecem principalmente em *Pleurothallopsis* na Afinidade *Restrepia*, e em *Stelis* na Afinidade *Pleurothallis*, e que espessamentos em “U” nas células do epivelame são evidentes nos gêneros incluídos nas Afinidades *Acianthera*, *Phloeophila*, *Specklinia*. Em *Echinosepala shuari* (Afinidade *Restrepia*) e *Pabstiella* (Afinidade *Pleurothallis*), as células do epivelame são espessadas em “O”.

As células do epi e endovelame se distinguem pela forma e tamanho embora, segundo Pridgeon (1983), o epivelame não seja significativamente diferente das demais camadas por possuir a mesma ontogenia. Para Sanford & Adanlawo (1973), o epivelame, quando presente, é formado por células pequenas, anticlinalmente achatada, suberificadas e menos lignificadas do que as demais. Para Stern (2014), o endovelame, quando morfológicamente distinto, pode apresentar células anticlinalmente alongada ou espessamentos parietais únicos. Embora não haja diferença quanto à ontogenia das camadas do velame (Engard 1944), nas espécies aqui estudadas, o tamanho, a forma, a natureza de parede e a distribuição dos espessamentos parietais são aspectos celulares que podem ser utilizados para separar táxons anatomicamente correlatos; nas Afinidades ancestrais, como em *Octomeria* (Fig. 24.4), *Acianthera* (Fig. 24.11) e *Pleurothallopsis nemorosa* (Fig. 24.10), ou entre *Anathallis* (Fig. 24.15) e *Stelis* (Fig. 24.27), *Specklinia* (Fig. 24.24) e *Pabstiella* (Fig. 24.28), gêneros derivados, anatomicamente e filogeneticamente relacionados de difícil separação. Uma vez que esses aspectos também são de difícil identificação, quantificação e transformação em caracteres discretos ou contínuos, é necessário que eles sejam registrados de outra forma, conforme apresentado no organograma da Figura 24 e no estudo de Porembski & Barthlott (1988).

Tilossomos: Tilossomos (Pridgeon et al. 1983) são crescimentos na parede periclinal interna do endovelame que se concentram na interface velame/célula de passagem e que atuam a regulação hídrica da raiz (Engard 1944, Sanford & Adanlawo 1973, Benzing et al. 1982, Dycus & Knudson 1957, Pridgeon 1983, Pridgeon et al. 1983, Pridgeon 1983, Benzing 1990, Zotz & Winkler 2013). São estruturas praticamente restritas às espécies neotropicais que apresentam diferentes morfologias (i.e. spongy, lamellate, discoid, webbed, meshed, baculate e plaited) sendo os tipos esponjoso, lamelar e discoide reportados como característicos de Pleurothallidinae (Pridgeon et al. 1983, Pridgeon 1983, Stern 2014). Não relacionamos, aqui, os tipos morfológicos de tilossomos às espécies que apresentam essa

estrutura, devido à dificuldade em identificá-los e uma vez que nem todos os representantes foram analisados ao MEV. Entretanto, nos grupos basais, como nas Afinidades *Octomeria*, *Acianthera* e *Restrepia* (Fig.10, 11A-F), a parede periclinal do endovelame apresenta um entumescimento adjacente às células de passagem sendo visíveis depressões, ou ainda crescimentos internos inconspícuos em *Barbosella* (Fig.10 H,K), *Dryadella* (Fig. 13H,K) e *Andinia* (Fig. 13C,F,G,J). Esses tipos de tilossomos não são notados ao M.O. Tilossomos do tipo discóide aparecem nas espécies de *Zootrophion* (Fig. 11J-K), embora sua densidade, diâmetro do crescimento, espessura das costelas e depressões sejam diferentes de acordo com a espécie considerada. Não foi observado tilossomo do tipo baculado, apesar de muitas configurações lamelares aparecerem nas Afinidades *Lepanthes*, *Masdevallia* e *Pleurothallis* (Fig. 12C, 14E-F). Dentro do gênero *Platystele* (Afinidade *Specklinia*), os tilossomos de *Platystele misera* (Fig. 14J) são mais semelhantes aos de *Platystele stellaris* (Fig. 14L) do que aos de *Platystele muscicola* (Fig. 14K). O mesmo acontece dentro do gênero *Scaphosepalum* (Afinidade *Specklinia*), onde as lamelas são semelhantes entre *S. microdactylum* e *S. rapax* (Fig. 14E-F), ao contrário dos ninhos observados em *S. bicristatum* (Fig. 14D). Em *Pabstiella* (Afinidade *Pleurothallis*), toda a superfície interna do endovelame apresenta crescimentos reticulados (Fig. 16 E-F). Em *Stelis* (Afinidade *Pleurothallis*), *Acronia (Incertae sedis)* e *Scaphosepalum bicristatum* (Afinidade *Specklinia*), os filamentos formam ninhos (Fig. 14D, 15D-F,K; 16D), porém em *Stelis* ainda podem aparecer em forma de costelas paralelas (Fig. 15J,L). Em *Kraenzlinella lappago* (Afinidade *Acianthera*) os crescimentos são em placas (Fig. 11C) e evidentes ao M.O (Fig. 4D) devido a parede fina da exoderme, e *Acianthera* (Afinidade *Acianthera*) não apresentam tilossomo desenvolvido ao M.O (Fig.4A-C,E-G) e não foram analisadas ao MEV. Também pode haver formas similares compartilhadas entre os gêneros diferentes, como o tilossomo de *Dracula mopsus* (Afinidade *Masdevallia*) (Fig. 12J), similar a *Phloeophila pleurothallopsis* (Afinidade *Phloeophila*) (Fig. 13E).

Exoderme: Nas orquídeas, a camada mais externa do córtex da raiz, exoderme, é formada por células que diferem em tamanho, forma e espessamentos de parede (Engard 1944; Esau 1974; Pridgeon et al. 1983; Benzing 1990; Fahn 1990; Dressler 1993), quando comparadas às demais células do parênquima cortical. Assim como a endoderme, a exoderme é caracterizada por apresentar células longitudinalmente longas e células curtas, as células de passagem. As células de passagem, impregnadas nos estágios iniciais de seu desenvolvimento por estrias de Caspary, funcionam como uma barreira apoplástica, influenciando a seletividade da absorção de água e íons (Schreiber & Frank 2011, Engard 1944). Nas espécies, aqui estudadas, cuja exoderme é formada por células de paredes delgadas, é comum a presença de tilossomos de morfologia complexa. Exoderme formada

por células que apresentam espessamento parietal em “U” representa uma sinapomorfia de *Barbosella* (Afinidade *Restrepia*) (Fig. 23) enquanto que exoderme com paredes celulares espessadas em “∩” aparece principalmente nas Afinidades mais basais, em *Sansonia* (Afinidade *Octomeria*), *Madisonia (incertae sedis)*, *Anathallis spiculifera* (Afinidade *Lepanthes*) *Acianthera glumacea*, *A. ochreatea* (Afinidade *Acianthera*), *Restrepia* (Afinidade *Restrepia*), *Lepanthopsis floripecten* (Afinidade *Restrepia*) e *Octomeria* (Afinidade *Octomeria*), embora em alguns representantes deste gênero as células da exoderme possuem espessamento de parede em “O” (Pridgeon 1982, 1993, Porembski & Barthlott 1988, Kedrovski 2014). Células da exoderme com paredes espessadas em “O” são comuns em *Acianthera* (Afinidade *Acianthera*), ocorrendo também em *Dresslerella caesariata* (Afinidade *Restrepia*), *Phloeophila nummularia* (Afinidade *Phloeophila*) e *Stelis intermedia* (Afinidade *Pleurothallis*). Segundo Pridgeon (1982) na maioria das *Pleurothallidinae*, as células exodérmicas possuem espessamento parietal em “U”, embora espessamentos em “O” possam aparecer concomitantemente. Para Piazza (2013), o espessamento em “O” da exoderme talvez seja a fase final de desenvolvimento do padrão em “∩”. Nas espécies com exoderme de paredes finas, as células podem apresentar parede primária ou secundária sem acréscimo de camadas consecutivas e são mais comuns nos grupos mais derivados, aparecendo na Afinidade *Restrepia*.

Parênquima cortical: O número de camadas de células que formam o córtex da raiz é tratado, na literatura, como um caráter de pouco significado taxonômico, embora nossas observações mostrem que esse aspecto pode ser importante na separação morfológica dos grupos. Notamos um aumento característico no diâmetro das células corticais em raízes com córtex formado por três a quatro camadas de células, como aquelas da Afinidade *Lepanthes* e *Pleurothallis* concordando com Pridgeon (1982). Parênquima cortical do tipo homogêneo, característico nas Afinidades *Masdevallia* (Fig. 6F-I) e *Specklinia* (Fig. 8F-J) difere daquele em que as células das camadas médias do córtex possuem diâmetro duas vezes maior do que o das células das camadas interna e externa do tecido, como na Afinidade *Lepanthes* (Fig. 5J-L) e *Pleurothallis* (Fig. 9G-N).

A presença/ausência de cloroplastos, amiloplastos e hifas nas células corticais da raiz não possui valor taxonômico. A simbiose obrigatória das orquídeas com hifas endofíticas, presentes no córtex e no velame, pode auxiliar na translocação de água do substrato para a planta, embora esteja mais associada ao aporte de compostos nitrogenados e ao desenvolvimento dos protocormos (Arditti & Ghani 2000; Pylro 2013). A presença de cristais tem sido relacionada ao hábito epifítico, ao balanço osmótico e iônico e no controle da herbivoria (Stern 2014, Dycus & Knudson 1957, Pridgeon 1983).

No córtex das raízes de orquídeas é comum a presença de idioblastos traqueoidais (Benzing 1990; Olatunji & Nengim 1980, Leroux 2011, Idris & Collings 2014) e, por essa região reter água à semelhança do velame, ela tem sido chamada "pseudovelame" (Porembski & Barthlott 1988). Os idioblastos ocorrem principalmente nas camadas mais externas do córtex ou na região ventral da raiz quando em contato com o substrato. Notamos que seus espessamentos podem ser helicoidais, anastomosados ou em faixas e apresentar padrões de distribuição. Apesar da sua importância como caráter auxiliar na delimitação de táxons, não incluímos os padrões de espessamento parietal das células do córtex na descrição das raízes estudadas, pois são de difícil visualização em secções finas.

Endoderme: Em todas as espécies, a endoderme (camada mais interna do córtex) é uniestratificada e formada por células com extenso gradiente de espessamentos parietais, fato que torna difícil identificar com precisão o tipo de espessamento, exceto por aquelas espessadas em "O". O espessamento das paredes celulares da endoderme é influenciado pelo regime hídrico e pela idade do órgão. Do mesmo modo que para a exoderme, o tamanho, a forma e a proporção entre as dimensões anticlinal e periclinal das células parecem ser característicos, evidente entre gêneros da Afinidade *Restrepia* (Fig. 3J,M,Q) e Afinidade *Pleurothallis* (Fig. 9G-N) por exemplo, embora investigações em micromorfometria sejam recomendadas para confirmar com precisão essa observação.

Cilindro vascular: Como nas raízes de outras orquídeas (Porembski & Barthlott 1988, Pridgeon 1982, Pridgeon 1983, Pridgeon et al. 1983, Benzing 1990, Dressler 1993, Kauff et al. 2000), o cilindro vascular é delimitado externamente por um periciclo uni ou biestratificado e preenchido internamente pelo tecido vascular e por uma medula. Nas raízes de *Acianthera* (Afinidade *Acianthera*), *Barbosella* (Afinidade *Restrepia*), *Masdevallia* (Afinidade *Masdevallia*), *Octomeria* (Afinidade *Octomeria*) e *Stelis* (Afinidade *Pleurothallis*), com muitos polos de protoxilema, o periciclo frequentemente aparece biestratificado. O número de polos de protoxilema varia dentro dos gêneros, sendo que um alto número de polos aparece principalmente nos grupos mais basais como Afinidade *Octomeria*, *Restrepia* e *Acianthera*. Notamos que o número de elementos nos cordões de floema podem ser distintos e caracterizar gêneros com floema desenvolvido como *Masdevallia* e *Dracula* (Afinidade *Masdevallia*) (Fig. 6J-K) ou reduzido, como em *Acianthera* (Afinidade *Acianthera*) (Fig. 4F-G,I-J), e *Pabstiella* (Afinidade *Pleurothallis*) (Fig. 9G-J).

Medula: Raiz com medula parenquimática aparece apenas em *Barbosella cucullata* (Afinidade *Restrepia*) e em gêneros basais como *Octomeria* (Afinidade *Octomeria*), *Myoxanthus* (Afinidade *Restrepia*), *Echinosepala* (Afinidade *Restrepia*) e *Acianthera*

(Afinidade *Acianthera*), concordando com Pridgeon (1982). Esse caráter, geralmente, encontra-se associado ao alto número de arcos de protoxilema (Tab. 3, Fig. 22). Ao contrário do descrito para outros grupos de orquídeas, os estudos com Pleurothallidinae não mostram e nem discutem com detalhes as características do cilindro vascular e da medula.

Tendências anatômicas: No dendrograma da Figura 19 observa-se que caracteres radiculares, em orquídeas, mostram uma tendência de evolução paralela (Pridgeon 1982), já que muitos táxons não filogeneticamente correlacionados podem estar colocados nos mesmos ramos. As análises fenéticas não apontam uma direção evolutiva, mas sim a semelhança morfológica entre os táxons, demonstrando graficamente a utilidade taxonômica dos marcadores anatômicos na análise de PCA (Fig. 17), através da topografia e da resolução dos ramos na árvore (Fig. 18). Mesmo com pouco suporte, a topologia do dendrograma mostra que a morfologia radicular de espécies pertencentes à mesma Afinidade é bastante semelhante, evidente na separação dos táxons basais e derivadas em dois grandes grupos, ajudando a indicar o posicionamento de espécies insertas, como *Madisonia kerrii* na Afinidade *Octomeria* e *Acronia* na Afinidade *Restrepia*. O fato das raízes de diferentes espécies de *Barbosella* (Afinidade *Restrepia*) possuírem estrutura bastante semelhantes corrobora o isolamento desse gênero em árvores filogenéticas. Dentro da Afinidade *Restrepia*, os gêneros *Echinosepala*, *Myoxanthus* e *Restrepia* formam um grupo coeso pela ocorrência de um cilindro vascular amplo e uma medula parenquimática. As diferenças observadas na estrutura das raízes das espécies de *Phloeophilla* (Afinidade *Phloeophilla*) confirma o polifiletismo deste gênero, com *P. nummularia*, espécie endêmica brasileira, possuindo raízes bastante semelhantes às de *Acianthera* (Afinidade *Acianthera*), e *P. pleurothallopsis*, andina, possuindo complexo velame-exoderme semelhante à *Porroglossum* e tilossomos à *Dracula* (Afinidade *Masdevallia*). *Anathallis spiculifera* (Afinidade *Restrepia*) merece atenção, já que suas raízes diferem das encontradas em outras espécies do gênero, sendo mais semelhantes às raízes da Afinidade *Octomeria*, especialmente quanto ao velame com três camadas e presença de exoderme com células de paredes espessadas em “∩”. A presença de exoderme em “∩” separa as duas espécies incluídas na seção Pleurobotryae, *Acianthera glumace* e *A. ocreata* (Afinidade *Acianthera*), das outras espécies do gênero, concordando com Almeida, Smidt & Amano (2019). Nossos resultados confirmam duas camadas de velame para o tipo *Pleurothallis* de Porembski & Barthlott (1988), uma vez que mais da metade das espécies observadas possuem velame com duas camadas de células e apontam essa característica como uma plesiomorfia para a subtribo Pleurothallidinae. Parece haver uma tendência de especialização quando se considera o tipo de espessamento parietal encontrado nas células da exoderme: nos grupos basais, como na Afinidade *Octomeria*, *Acianthera* e *Restrepia*, a exoderme é formada por

células de paredes espessadas, embora em alguns gêneros da Afinidade *Restrepia* as paredes das células da exoderme apareçam delgadas num evento apomórfico compartilhado por clados mais derivados como Afinidade *Specklinia* e *Pleurothallis*. A presença de medula parenquimática pode ser considerada uma simplesiomorfia, já que aparece de forma pontual e restrita. O aumento no suporte em *Acianthera*, a separação de espécies de *Barbosella* e a realocação de *Phloeophila* na árvore filogenética de evidência total indica/corroboram a usabilidade dos caracteres anatômicos da raiz.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostra resultados inéditos para a anatomia radicular em Pleurothallidinae, com mais de 100 imagens que comprovam as descrições morfológicas e é o primeiro a apresentar um modelo de especialização para os caracteres radiculares e a organografia do complexo velame-exoderme para essa subtribo. De modo geral, há poucos estudos descritivos ou comparativos sobre a estrutura da raiz de representantes da subtribo Pleurothallidinae, especialmente se comparado com os disponíveis para outros grupos de orquídeas, fato que confere grande importância as descrições e aos resultados inéditos apresentados neste trabalho. Considerando que atualmente cerca de 5100 espécies encontram-se incluídas na subtribo, o reduzido número de espécies estudadas neste trabalho torna difícil realizar uma caracterização morfológica adequada, entretanto reconhecemos uma única sinapomorfia na exoderme de *Barbosella* e notamos que, do ponto de vista taxonômico e evolutivo, as apomorfias encontradas na raiz são bastante informativas, principalmente para grupos muito grandes como Pleurothallidinae. Tivemos dificuldade em identificar os tipos de tilossomos, especialmente se considerarmos a existência de tipos intermediários aos descritos, mas contribuímos sobretudo mostrando inúmeras morfologias e tilossomos de espécies nunca analisadas. Pelo fato de muitas Pleurothallidinae serem espécies raras e de grande cobiça horticultural, reafirmamos a importância ecológica na manutenção de coleções vivas como banco genético, e também de coleções líquidas, uma vez que o processo de herborização danifica os tecidos parenquimáticos, levando a perda de informações anatômicas importantes que esses tecidos possuem. Para completar a evolução dos caracteres radiculares, encorajamos novos trabalhos descritivos para testar grupos menores como seções ou gêneros específicos, principalmente aqueles com muitas espécies como *Lepanthes*, *Stelis*, *Masdevallia*, *Acianthera* e *Octomeria*, aqueles mais basais como *Atopoglossum* e *Brachionidium*, aqueles monoespecíficos, ou ainda os gêneros irmãos de Pleurothallidinae: *Dilomilis*, *Neocogniauxia*, *Tomzانونia* e *Arpophyllum*

Talvez pela alta taxa de diversificação que essas plantas apresentam, concluímos que as características anatômicas da raiz em Pleurothallidinae são homoplásticas, entretanto as apomorfias encontradas são muito mais informativas do que as sinapomorfias, podendo ainda ser possível reconhecer direção evolutiva em alguns caracteres quando somados aos dados filogenéticos. As características do complexo velame-exoderme, do córtex e do cilindro vascular, mostradas no organograma, nas imagens e tabela, exibem muito mais variação do que os dados publicados apresentam, e a combinação da ocorrência entre eles ainda é útil para reconhecer com grande assertividade ao menos o gênero de um morfotipo sem identificação.

FIGURAS

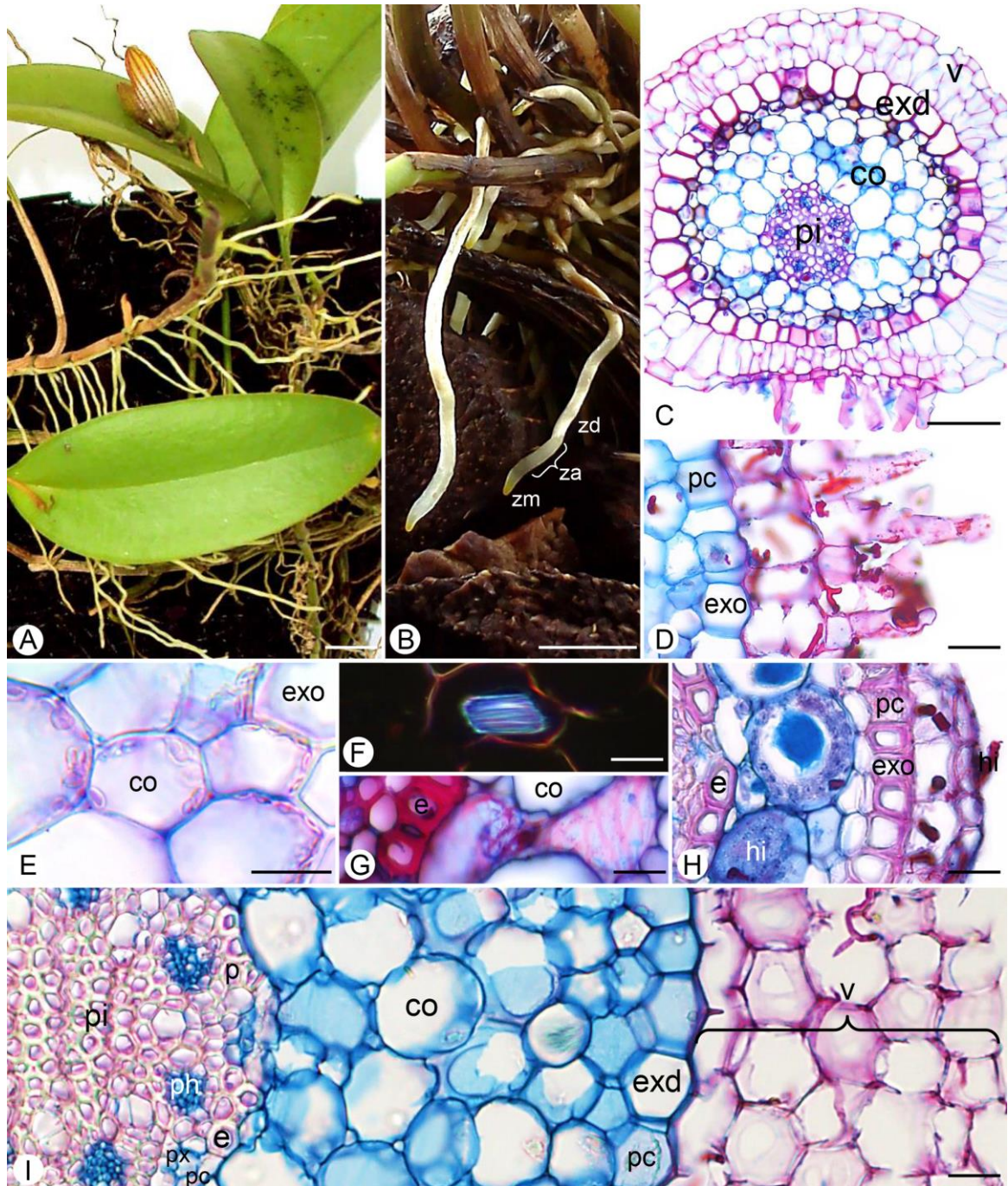


Fig. 1. Aspectos gerais macro (A-B) e micromorfológicos (C-I) das raízes de Pleurothallidinae. **A:** Raízes adventícias longas, finas e clorofiladas de *Acianthera saundersiana*. **B:** Zona meristemática (zm), zona de alongamento (za) e zona de diferenciação (zd) no ápice radicular de *Anathallis sclerophylla*. **C:** Raiz dorsiventral de *Barbosella cogniauxiana* com redução do velame e aparecimento de pelos radiculares na porção ventral. **D:** Detalhe dos pelos radiculares no epivelame de *Dryadella aviceps*. **E:** Cloroplastos e amiloplastos no parênquima cortical de *Myoxanthus punctatus*. **F:** Ráfides no parênquima cortical de *Myoxanthus parvilabius*. **G:** Idioblastos traqueoidais na camada interna do parênquima cortical de *Restrepia aspasicensis*. **H:** Pélotons endofíticos no parênquima cortical e hifas (hi) no velame de *Octomeria concolor*. **I:** Morfologia radicular interna de *Masdevallia striatella* com as regiões do velame (v), córtex com exoderme (exd), parênquima cortical (co), endoderme (e), cilindro vascular com periciclo (p), arcos de protoxilema (px) exarco intercalado por feixes de floema (ph) sustentado por fibras e medula (pi). Scale bars: 1cm(A-B), 100µm(C), 25µm(D-I).

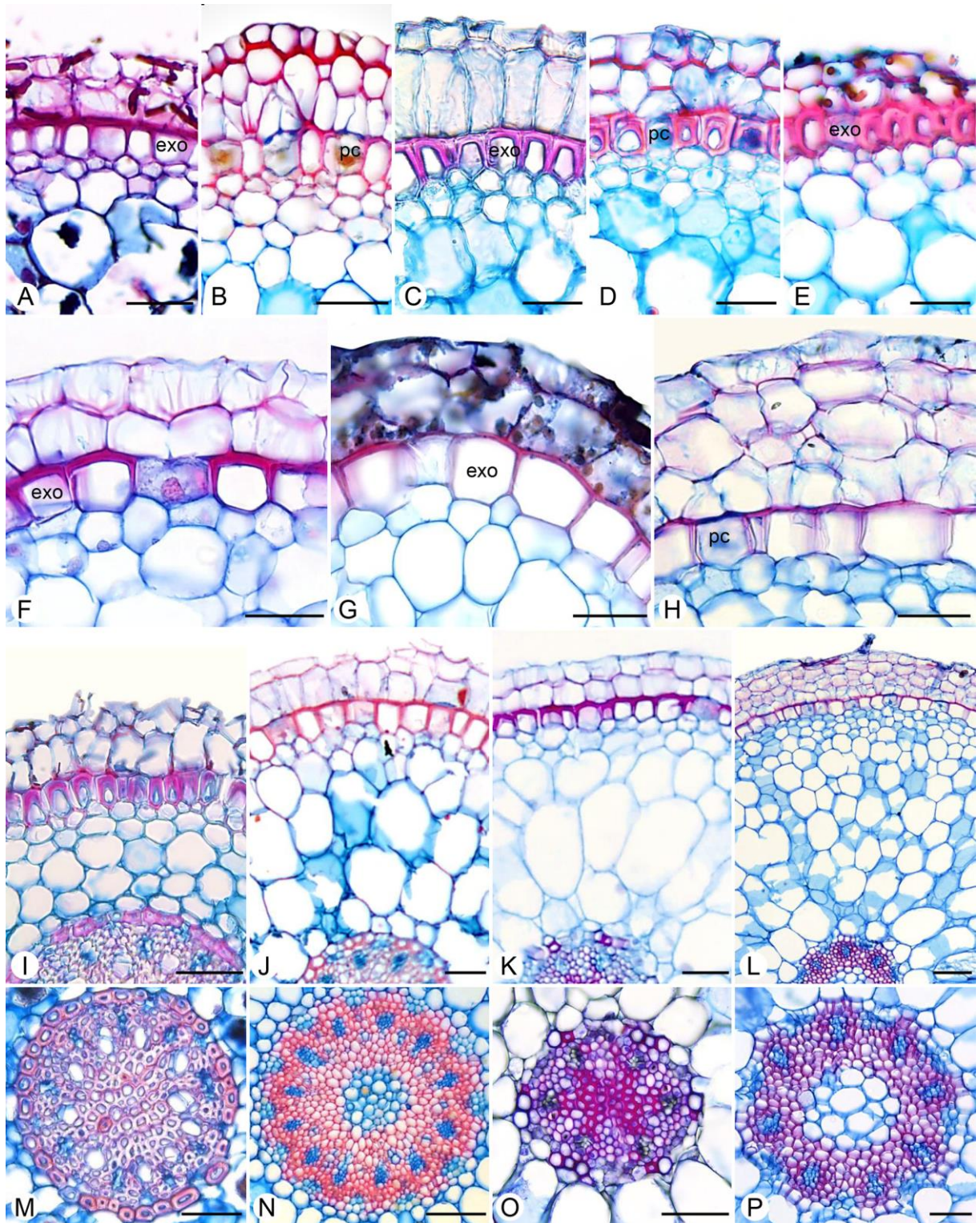


Fig. 2. Seções transversais de raízes de representantes da Afinidade *Octomeria* mostrando padrões morfológicos do complexo velame-exoderme (A-H), do parênquima cortical (I-L) e do cilindro vascular (M-P). **A:** *Octomeria concolor*. **B,N:** *Octomeria warmingii* (Kedrovski, 2014). **C:** *Octomeria diaphana* (Kedrovski, 2014). **D:** *Octomeria oxichela* (Kedrovski, 2014). **E:** *Octomeria grandifolia* (Kedrovski, 2014). **F,K,O:** *Sansonia bradei*. **G:** *Sansonia* sp. **H,L,P:** *Sansonia vandenberghii*. **I:** *Octomeria crassifolia* (Kedrovski, 2014). **J:** *Octomeria tricolor* (Kedrovski, 2014). **M:** *Octomeria linearifolia* (Kedrovski, 2014). *exo*: exoderme, *pc*: célula de passagem. Scale bars: 50 μ m(A-K,M-P), 100 μ m(L).

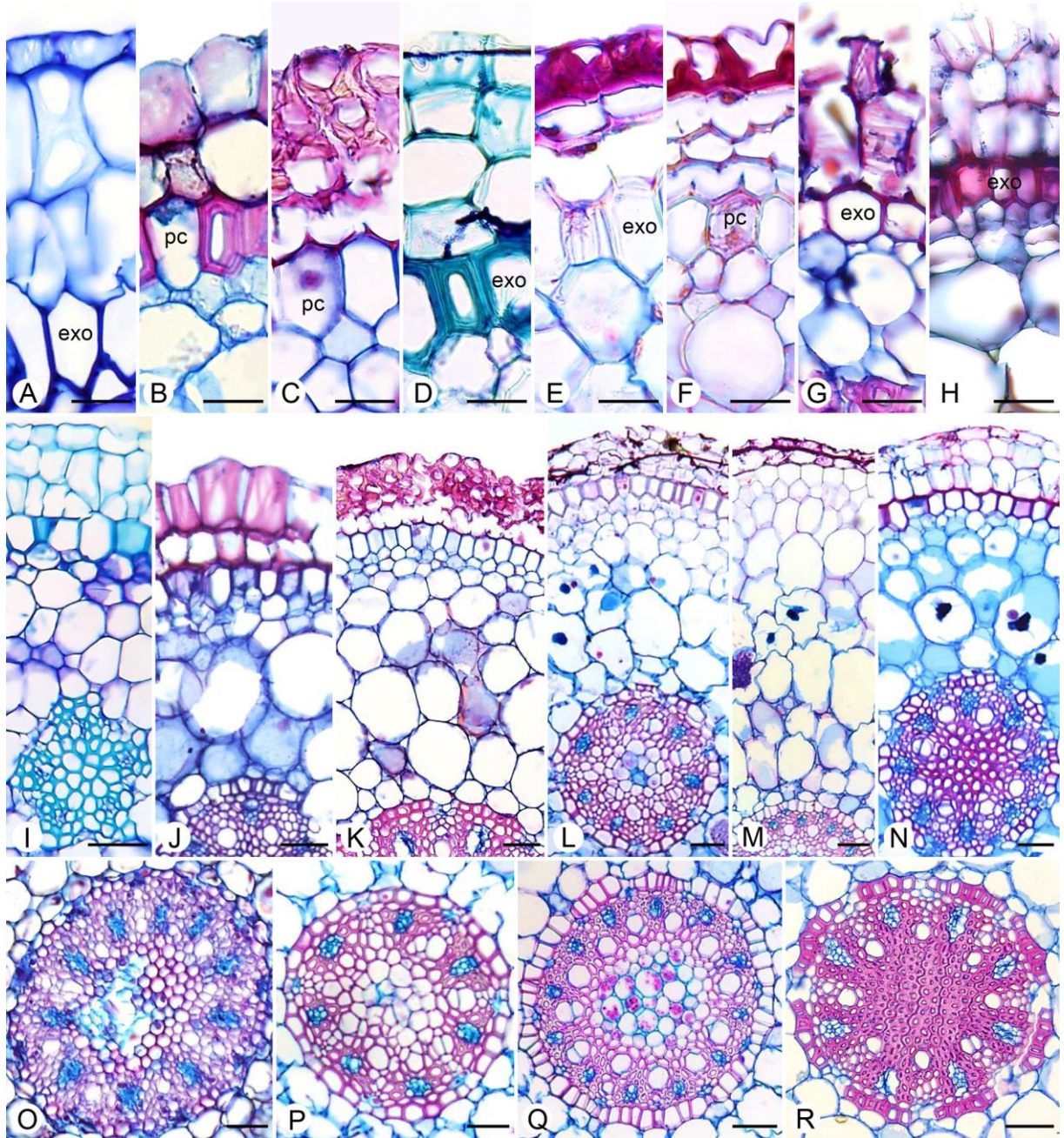


Fig. 3. Secções transversais de raízes de representantes da Afinidade *Restrepia* mostrando padrões morfológicos do complexo velame-exoderme (A-D), do parênquima cortical (E-H) e do cilindro vascular (I-K). **A:** *Barbosella australis*. **B,J,R:** *Dresslerella caesariata*. **C,K:** *Echinosepala shuarii*. **D,L,P:** *Echinosepala aspasicensis* (Kedrovski, 2014). **E:** *Myoxanthus punctatus* (Kedrovski, 2014). **F:** *Myoxanthus exasperatus*. **G:** *Pleurothallopsis nemorosa*. **H:** *Restrepia brachipus*. **I:** *Barbosella cogniauxiana*. **J:** *Dresslerella caesariata*. **M,Q:** *Myoxanthus parvilabius* (Kedrovski, 2014). **N:** *Restrepia aspasicensis*. **O:** *Barbosella cucullata*. **exo:** exoderme, **pc:** célula de passagem. Scale bars: 20 μ m(A), 25 μ m(B-H), 50 μ m(I-R)

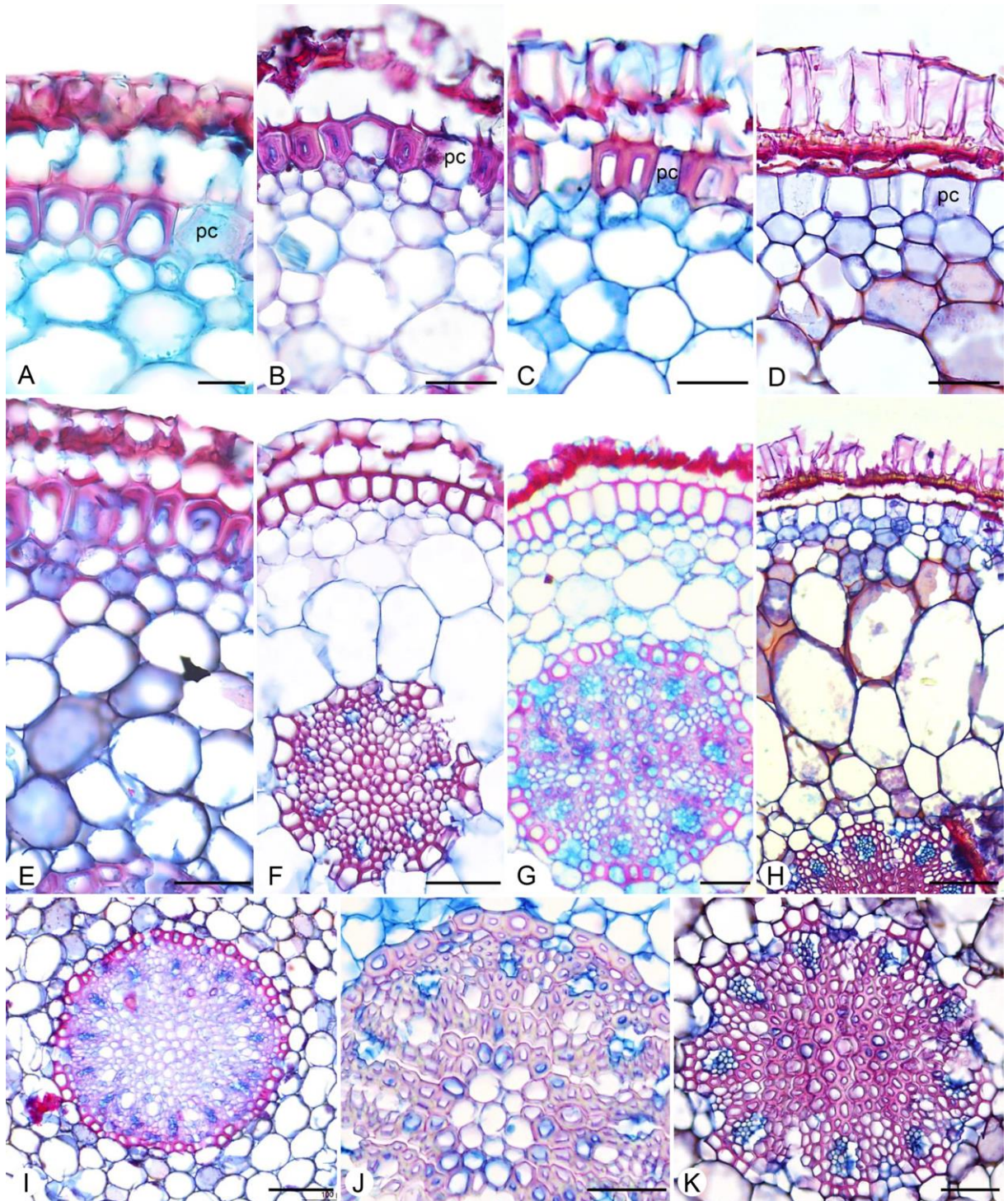


Fig. 4. Secções transversais de raízes de representantes da Afinidade *Acianthera* mostrando padrões morfológicos do complexo velame-exoderme (A-D), do parênquima cortical (E-H) e do cilindro vascular (I-K). **A:** *Acianthera glumacea*. **B:** *Acianthera strupifolia*. **C,J:** *Acianthera recurva*. **D,H,K:** *Kraenzlinella lappago*. **E,I:** *Acianthera ochreatea*. **F:** *Acianthera glanduligera*. **G:** *Acianthera crinita*. **H:** *Kraenzlinella lappago*. exo: exoderme, pc: célula de passagem. Scale bars: 25 μ m (A-C), 50 μ m (D-G, J-K), 100 μ m (H-I).

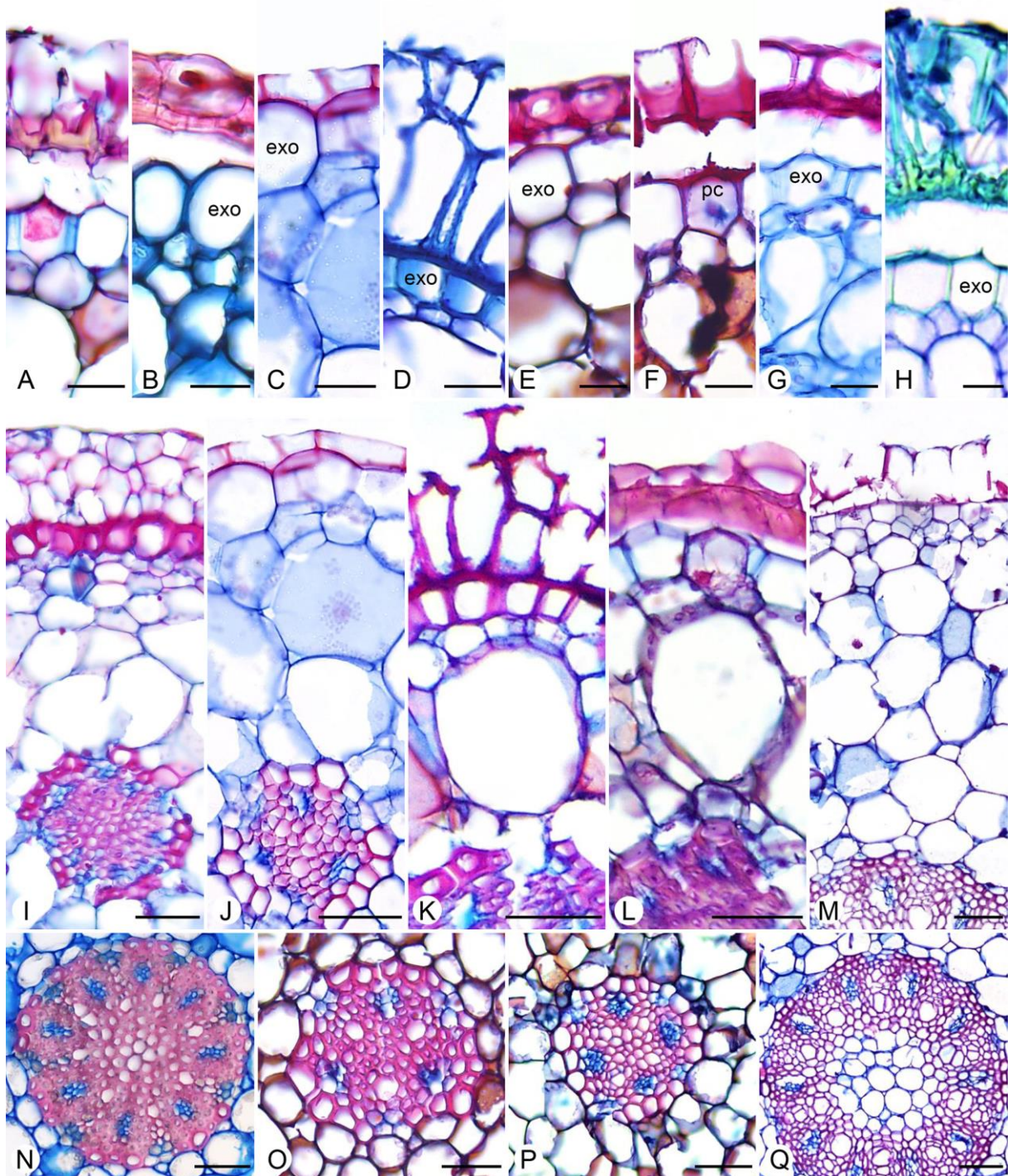


Fig. 5. Secções transversais de raízes de representantes da Afinidade *Lepanthes* mostrando padrões morfológicos do complexo velame-exoderme (A-H), do parênquima cortical (I-M) e do cilindro vascular (N-O). **A:** *Anathallis liparanges*. **B:** *Anathallis petropolitana*. **C,J:** *Lepanthes calodictyon*. **D,K:** *Lepanthopsis floripecten*. **E,L,O:** *Lepanthopsis ubangii*. **F,P:** *Trichosalpinx arbuscula*. **G:** *Trichosalpinx* sp.. **H:** *Zootrophion griffin*. **I:** *Anathallis spiculifera*. **M:** *Zootrophion dodsonii*. **N:** *Anathallis obovata*. **Q:** *Zootrophion dayanum*. exo: exoderme, pc: célula de passagem. Scale bars: 25µm(A-H,O-P), 50µm(I-N,Q).

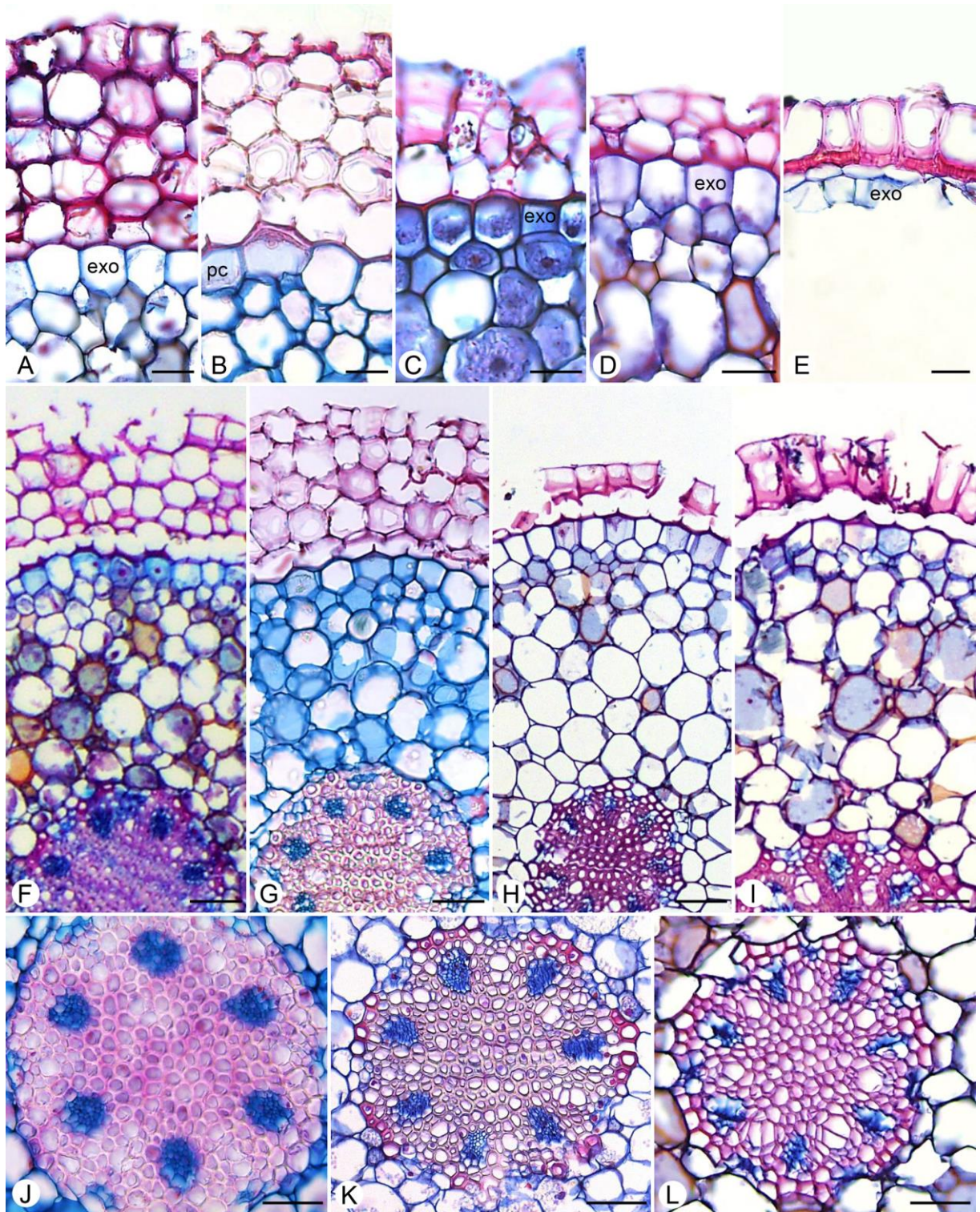


Fig. 6. Seções transversais de raízes de representantes da Afinidade *Masdevallia* mostrando padrões morfológicos do complexo velame-exoderme (A-E), do parênquima cortical (F-I) e do cilindro vascular (J-L). **A:** *Dracula bella* **B,J:** *Masdevallia infracta*. **C:** *Masdevallia pteroglossa*. **D,L:** *Porroglossum amethystium*. **E:** *Trisetella triglochin*. **F, K:** *Dracula mopsus*. **G:** *Masdevallia striatella*. **H:** *Porroglossum dalstroemii*. **I:** *Porroglossum muscosum*. exo: exoderme, pc: célula de passagem. Scale bars: 25µm(A-E), 50µm(F-L).

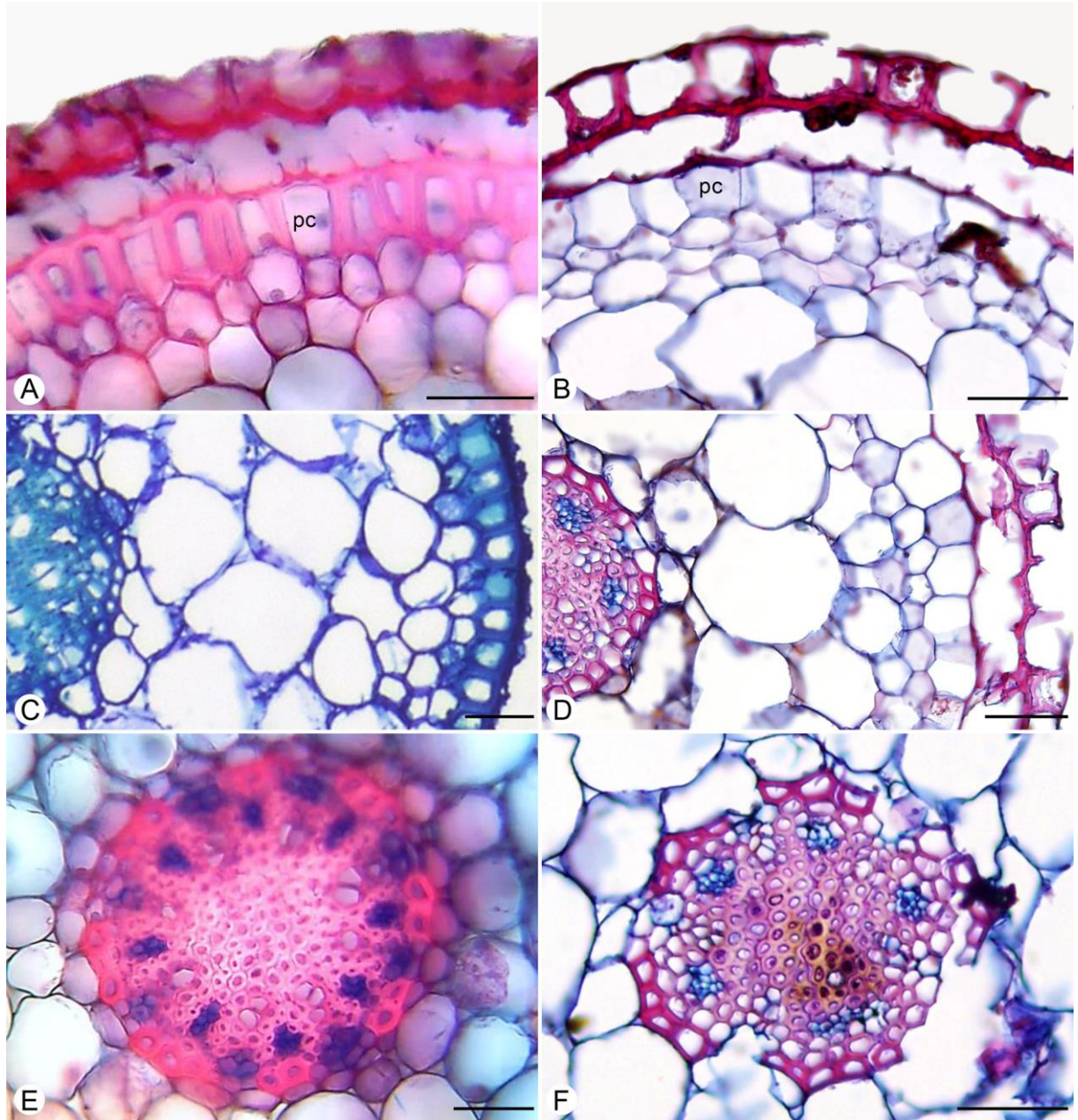


Fig. 7. Secções transversais de raízes de representantes da Afinidade *Phloeophila* mostrando padrões morfológicos do complexo velame-exoderme (A-B), do parênquima cortical (C-D) e do cilindro vascular (E-F). **A,C,E:** *Phloeophila nummularia*. **B,D,F:** *Phloeophila pleurothallopsis*. exo: exoderme, pc: célula de passagem. Scale bars: 50 μ m(A-F).

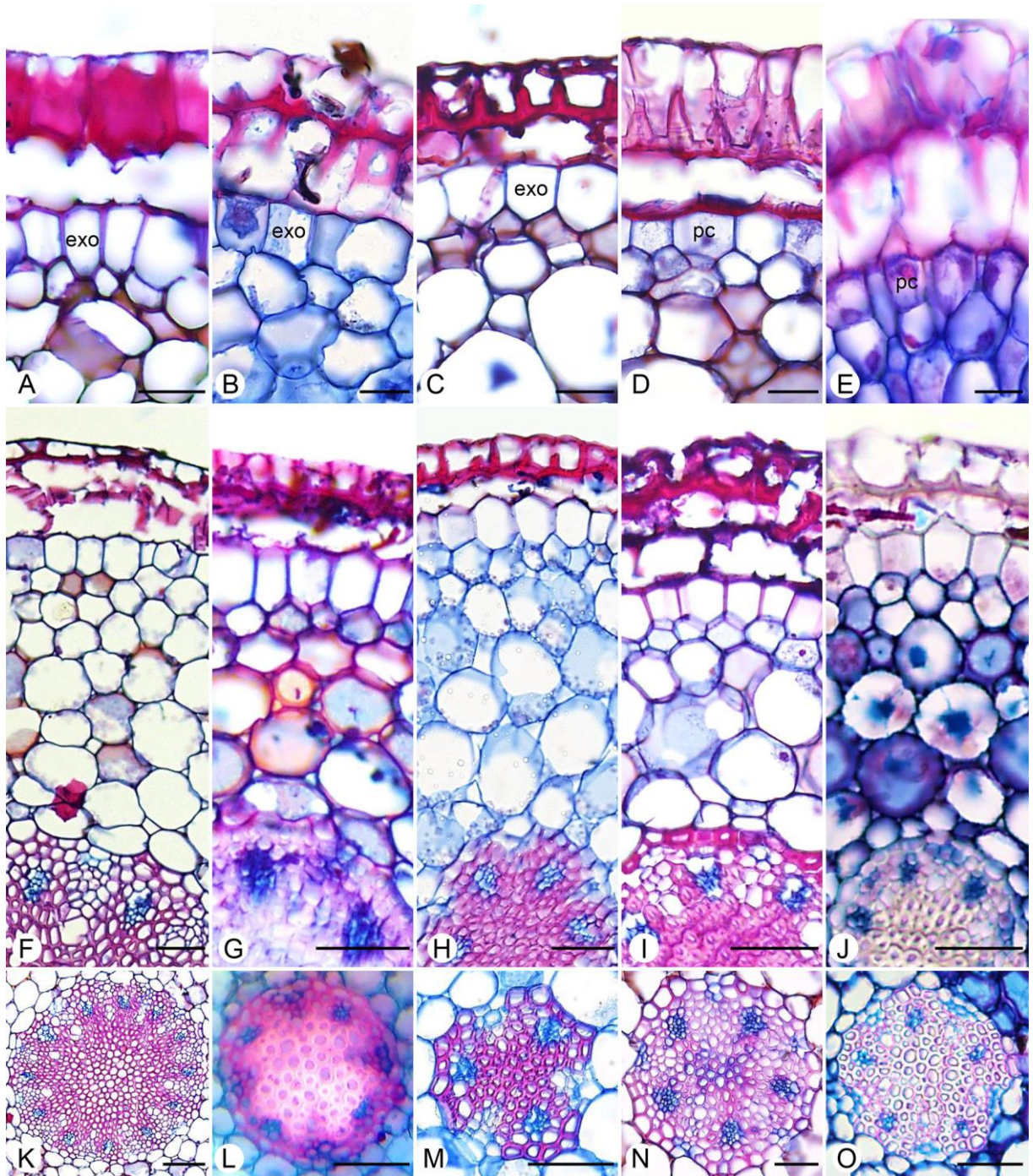


Fig. 8. Secções transversais de raízes de representantes da Afinidade *Specklinia* mostrando padrões morfológicos do complexo velame-exoderme (A-E), do parênquima cortical (F-J) e do cilindro vascular (K-O). **A:** *Andinia dielsii*. **B:** *Dryadella aviceps*. **C:** *Platystele muscicola*. **D,N:** *Scaphosepalum microdactylum*. **E:** *Specklinia subpicta*. **F,K:** *Andinia schizopogon*. **G:** *Dryadella atalaiensis*. **H:** *Platystele stellaris*. **I:** *Scaphosepalum bicristatum*. **J:** *Specklinia grobyi*. **L:** *Dryadella edwallii*. **M:** *Platystele misera*. **O:** *Specklinia puntactifolia*. exo: exoderme, pc: célula de passagem. Scale bars: 25µm(A-E), 50µm(F-J,L-O), 100µm(K).

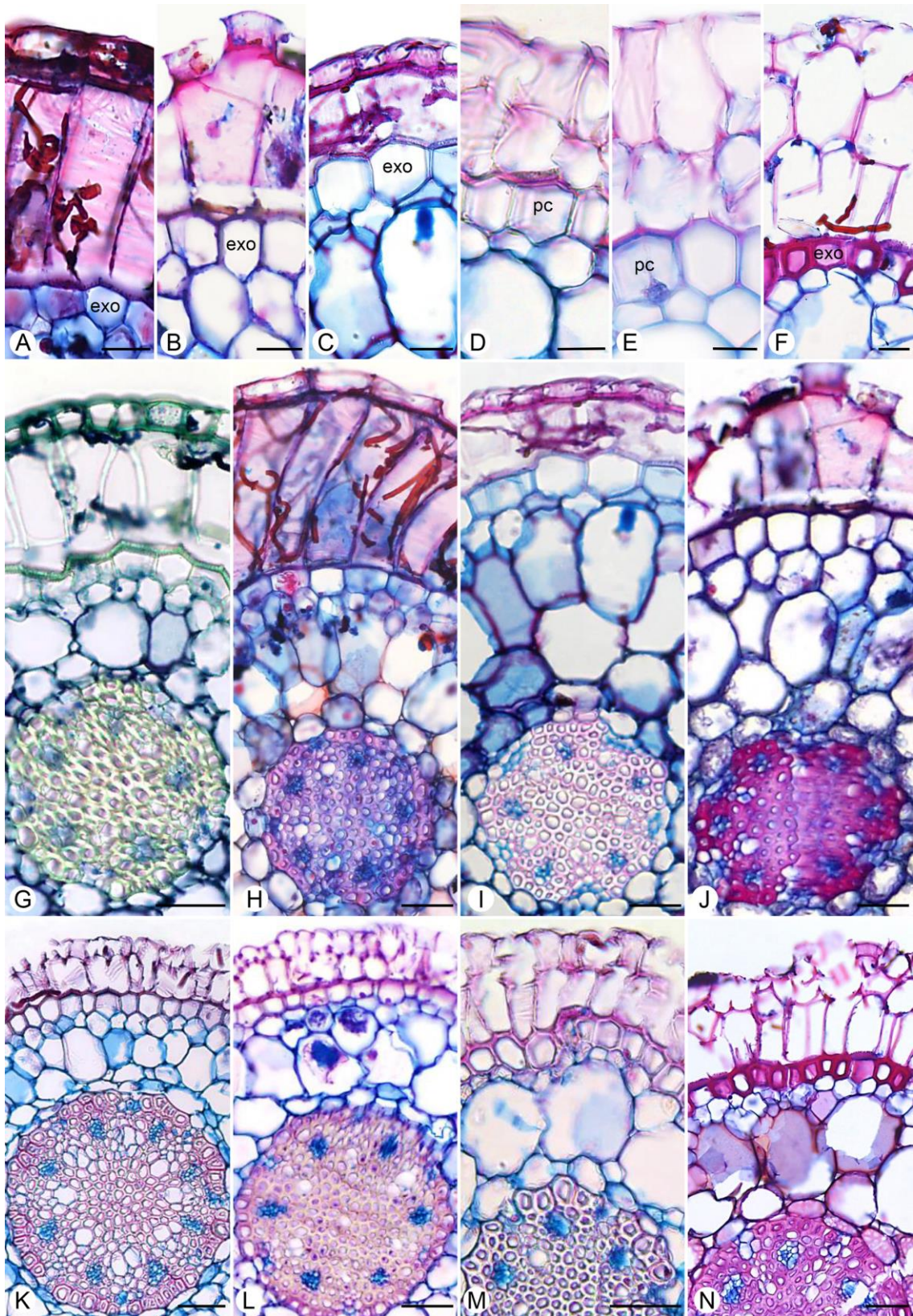


Fig. 9. Seções transversais de raízes de representantes da Afinidade *Pleurothallis* mostrando padrões morfológicos do complexo velame-exoderme (A-F), do parênquima cortical e cilindro vascular (G-N). **A,H:** *Pabstiella carinifera*. **B,J:** *Pabstiella sordida*. **C,I:** *Pabstiella punctatifolia*. **D:** *Stelis intermedia*. **E:** *Stelis papaquerensis*. **F,N:** *Acronia culpameae*. **G:** *Pabstiella hypnicola*. **K:** *Stelis aprica*. **L:** *Stelis palmeiraensis* (Kedrovski, 2014). **M:** *Stelis peliochyla*. exo: exoderme, pc: célula de passagem. Scale bars: 25µm(A-F), 50µm(G-M).

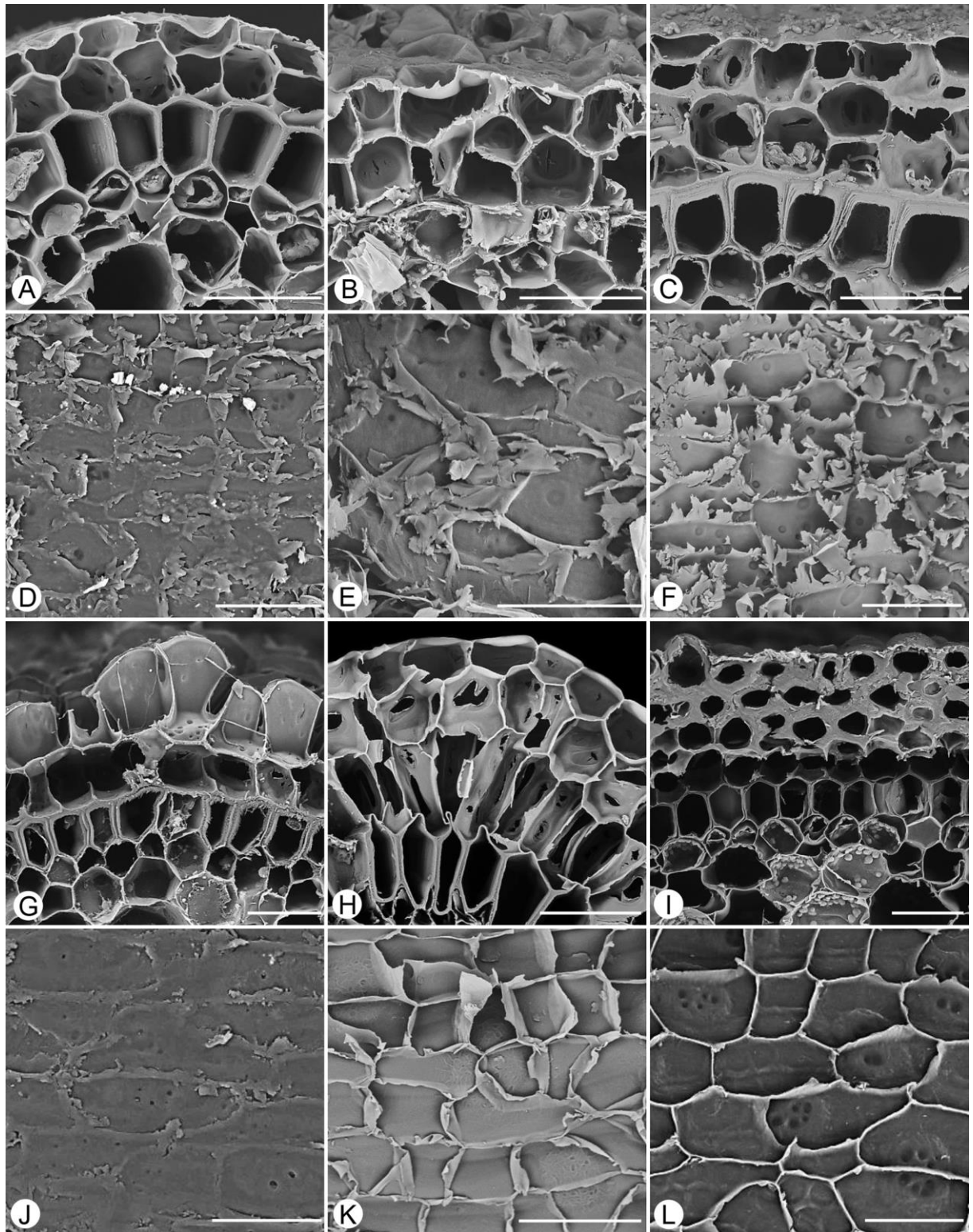


Fig. 10. Secções de raízes de espécies de Pleurothallidinae mostrando o complexo velame-exoderme e tilossomos, em microscopia eletrônica de varredura. **A-C, G-I:** Secções transversais. **D-F, J-L:** Secções tangenciais da parede periclinal interna do endovelame. **A,D:** *Madisonia kerrii*. **B,E:** *Sansonia bradei*. **C,F:** *Sansonia vandenberghii*. **G,J:** *Dresslerella caesariata*. **H,K:** *Barbosella australis*. **I,L:** *Echinosepala shuarii*. Scale bars: 10 μ m(D-F, J-L) 25 μ m(A-C, G-I).

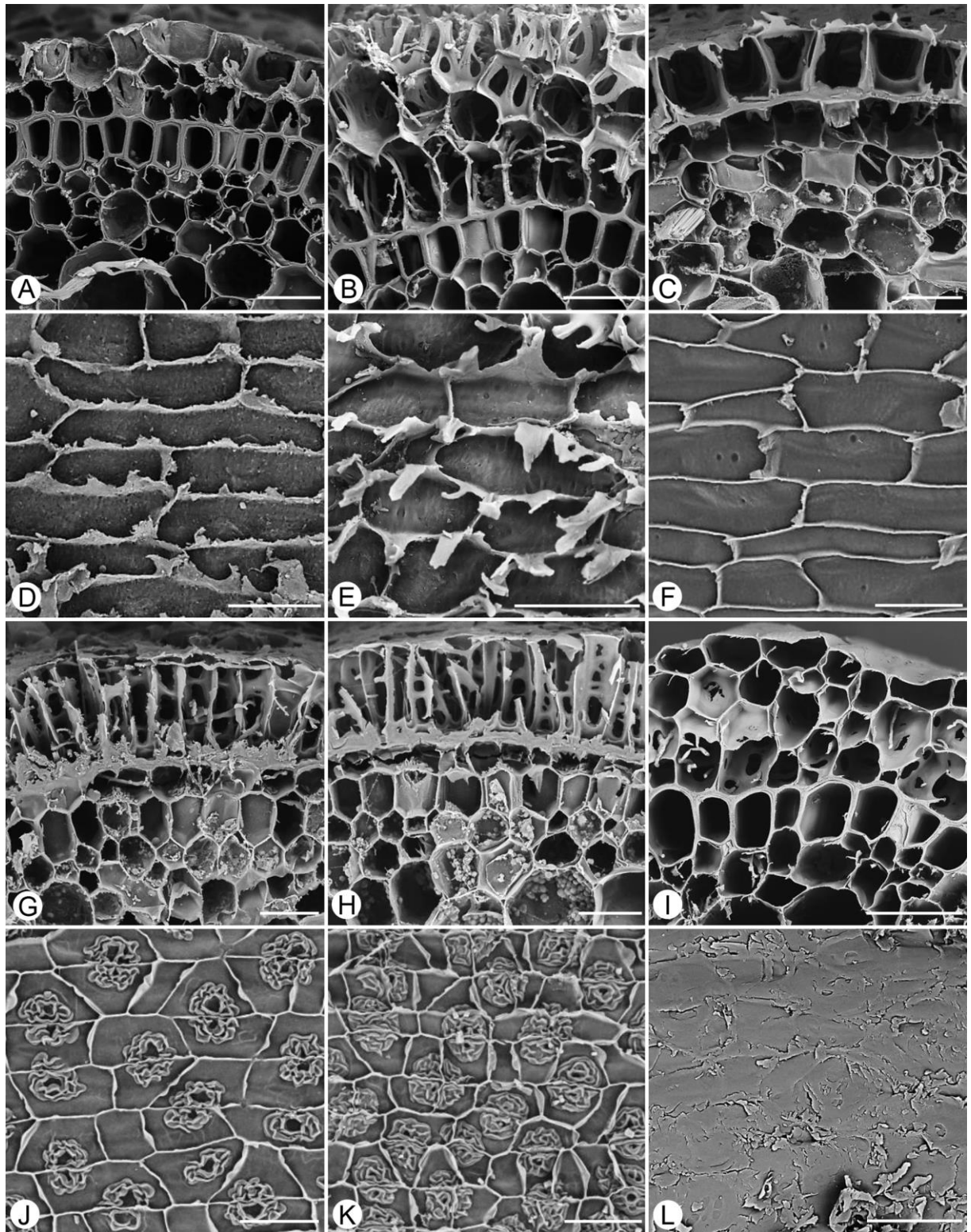


Fig. 11. Secções de raízes de espécies de Pleurothallidinae mostrando o complexo velame-exoderme e tiliosomos, em microscopia eletrônica de varredura (*Continuação*). **A-C, G-I:** Secções transversais. **D-F, J-L:** Secções tangenciais da parede periclinal interna do endovelame. **A,D:** *Echinosepala uncinata*. **B,E:** *Restrepia brachypus*. **C,F:** *Kraenzlinella lappago*. **G,J:** *Zootrophion dayanum*. **H,K:** *Zootrophion dodsonii*. **I,L:** *Anathallis spiculifera*. Scale bars: 50µm(A-L).

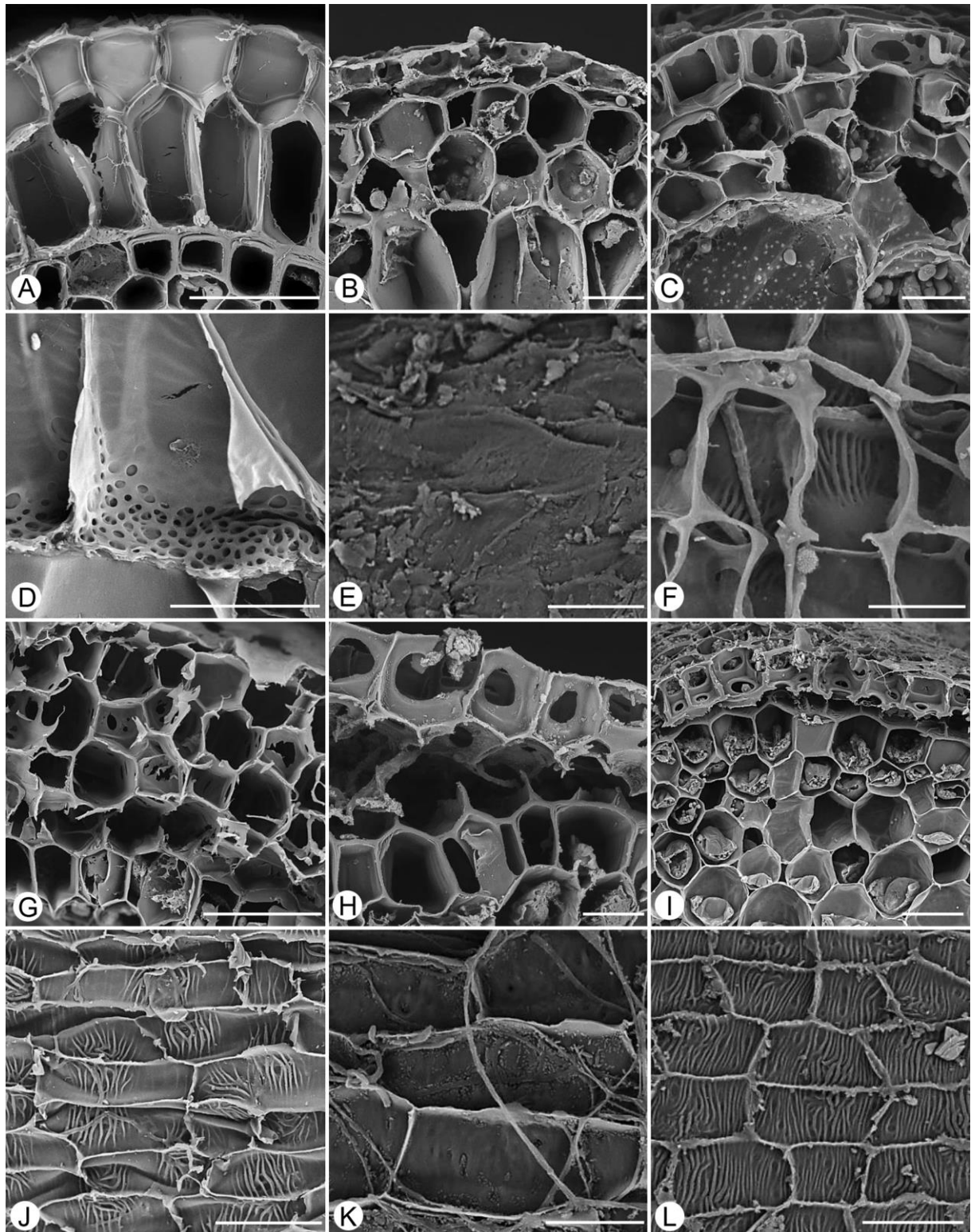


Fig. 12 Secções de raízes de espécies de Pleurothallidinae mostrando o complexo velame-exoderme e tilossomos, em microscopia eletrônica de varredura (*Continuação*). **A-C, G-I**: Secções transversais. **D-F, J-L**: Secções tangenciais da parede periclinal interna do endovelame. **A,D**: *Lepanthopsis floripecten*. **B,E**: *Lepanthopsis ubangii*. **C,F**: *Lepanthes calodictyon*. **G,J**: *Dracula mopsus*. **H,K**: *Porroglossum amethystinum*. **I,L**: *Porroglossum dalstroemii*. Scale bars: 25µm(D), 50µm(A-C,E-L).

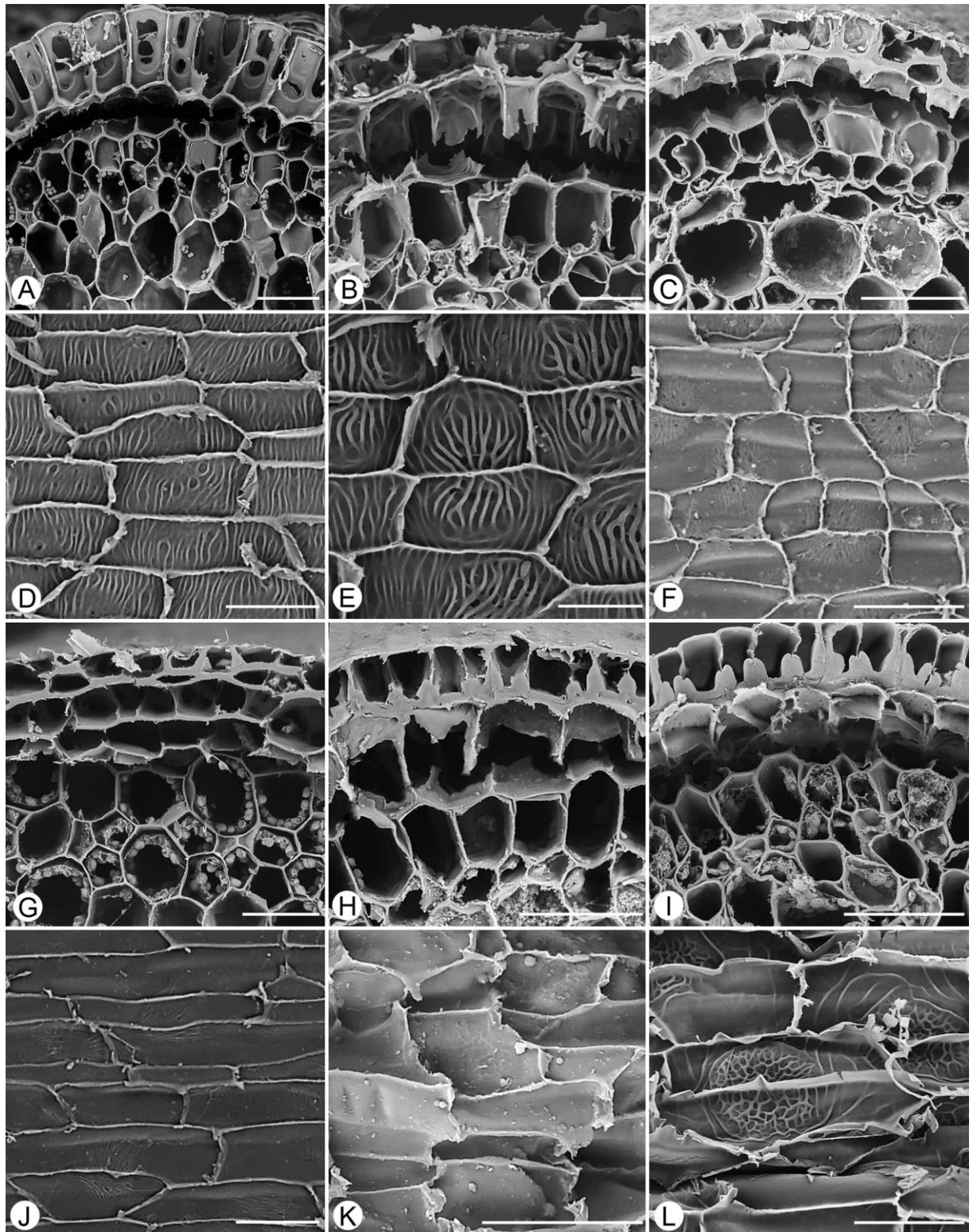


Fig. 13 Secções de raízes de espécies de Pleurothallidinae mostrando o complexo velame-exoderme e tilossomos, em microscopia eletrônica de varredura (*Continuação*). **A-C, G-I**: Secções transversais. **D-F, J-L**: Secções tangenciais da parede periclinal interna do endovelame. **A,D**: *Porroglossum muscosum*. **B,E**: *Phloeophila Pleurothallopsis*. **C,F**: *Andinia pendens*. **G,J**: *Andinia schizopogon*. **H,K**: *Dryadella edwallii*. **I,L**: *Specklinia subpicta*. Scale bars: 25µm(L), 50µm(A-K).

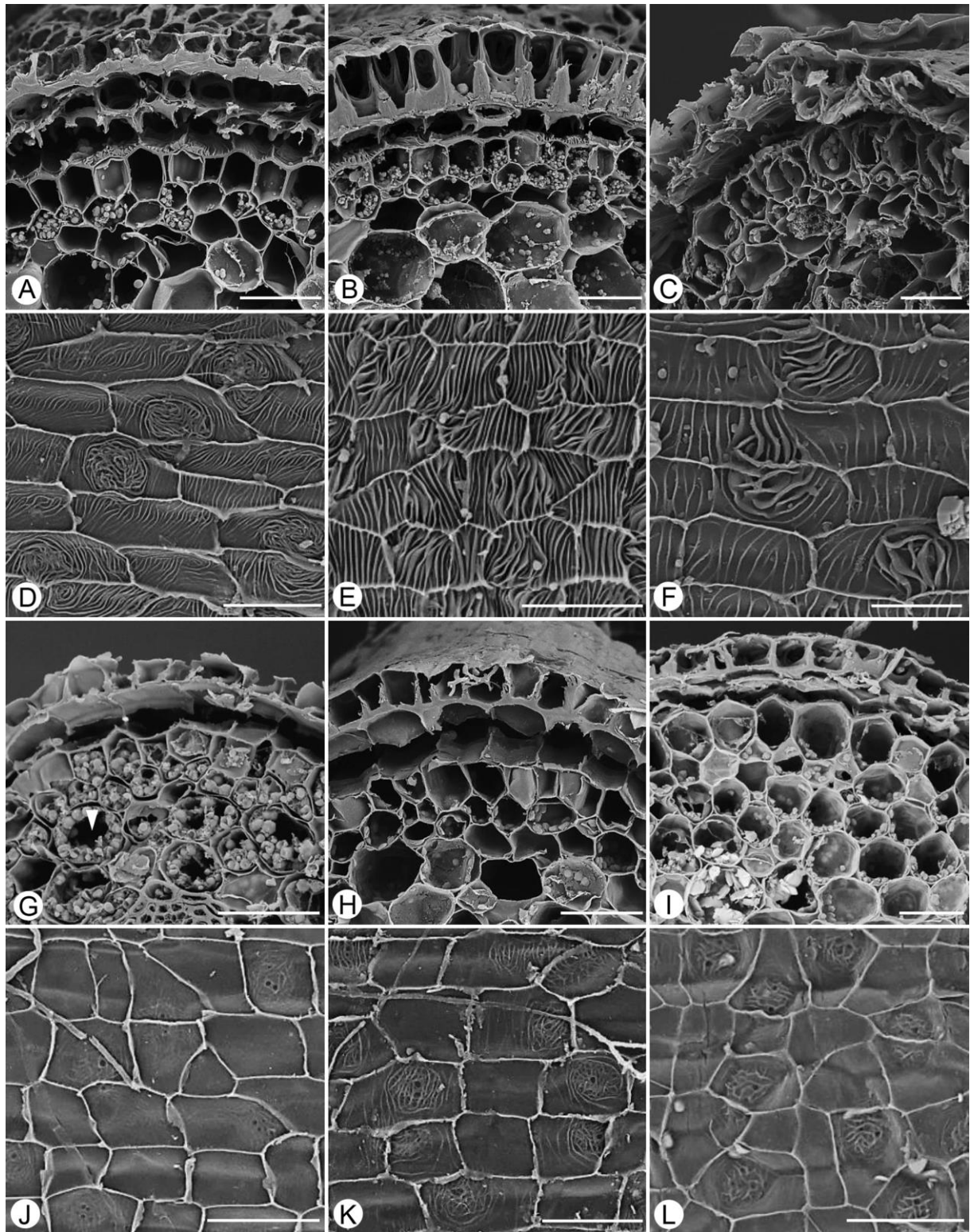


Fig. 14 Secções de raízes de espécies de Pleurothallidinae mostrando o complexo velame-exoderme e tilossomos, em microscopia eletrônica de varredura (*Continuação*). **A-C, G-I**: Secções transversais. **D-F, J-L**: Secções tangenciais da parede periclinal interna do endovelame. **A,D**: *Scaphosepalum bicristatum*. **B,E**: *Scaphosepalum microdactylum*. **C,F**: *Scaphosepalum rapax*. **G,J**: *Platystele misera*. **H,K**: *Platystele muscicola*. **I,L**: *Platystele stellaris*. Scale bars: 50µm(A-L).

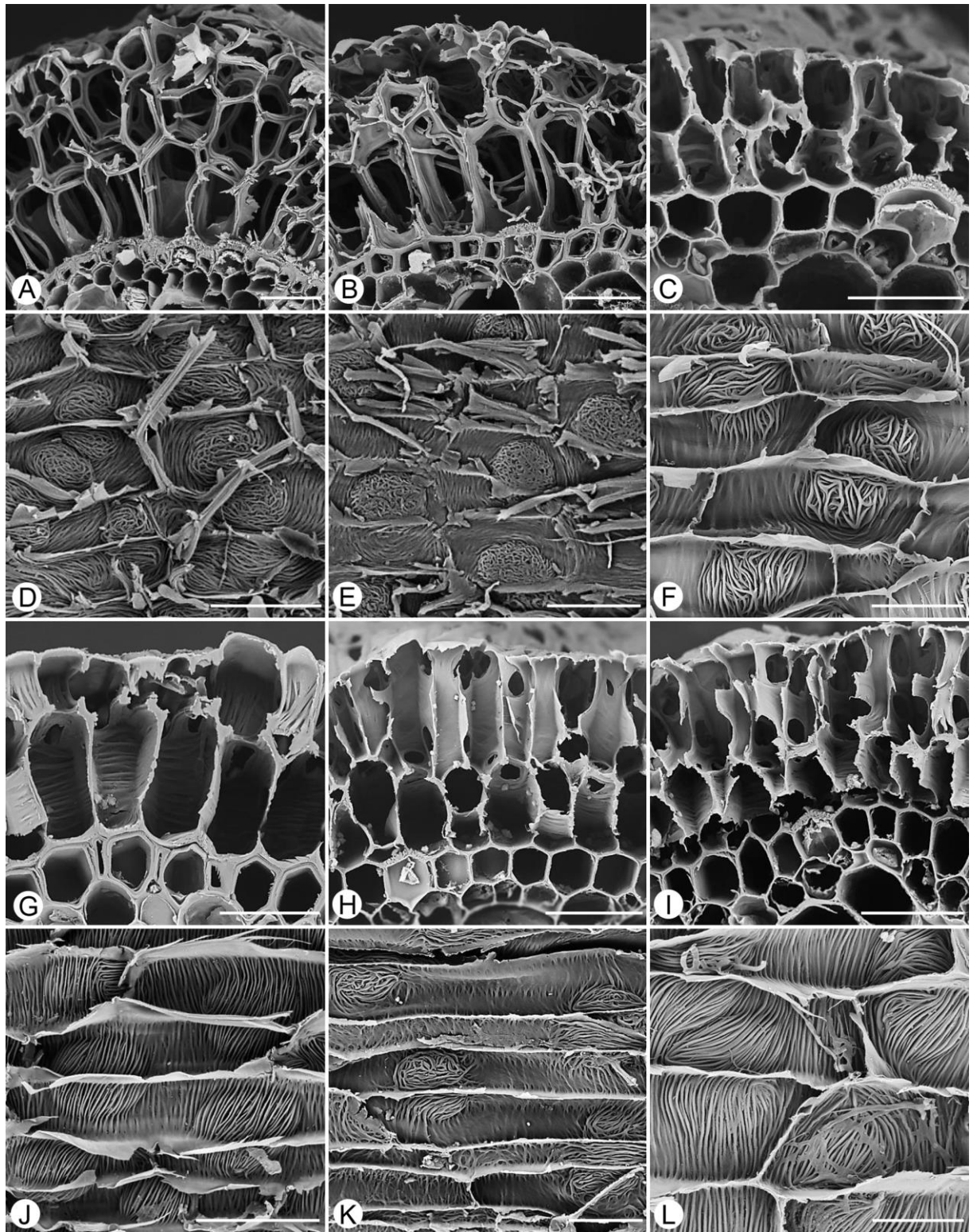


Fig. 15 Secções de raízes de espécies de Pleurothallidinae mostrando o complexo velame-exoderme e tilossomos, em microscopia eletrônica de varredura (*Continuação*). **A-C, G-I**: Secções transversais. **D-F, J-L**: Secções tangenciais da parede periclinal interna do endovelame. **A,D**: *Acronia culpameae*. **B,E**: *Acronia pyelophera*. **C,F**: *Stelis argentata*. **G,J**: *Stelis deregularis*. **H,K**: *Stelis intermedia*. **I,L**: *Stelis papaquerensis*. Scale bars: 25 μ m(F,K-L), 50 μ m(A-E,G-J).

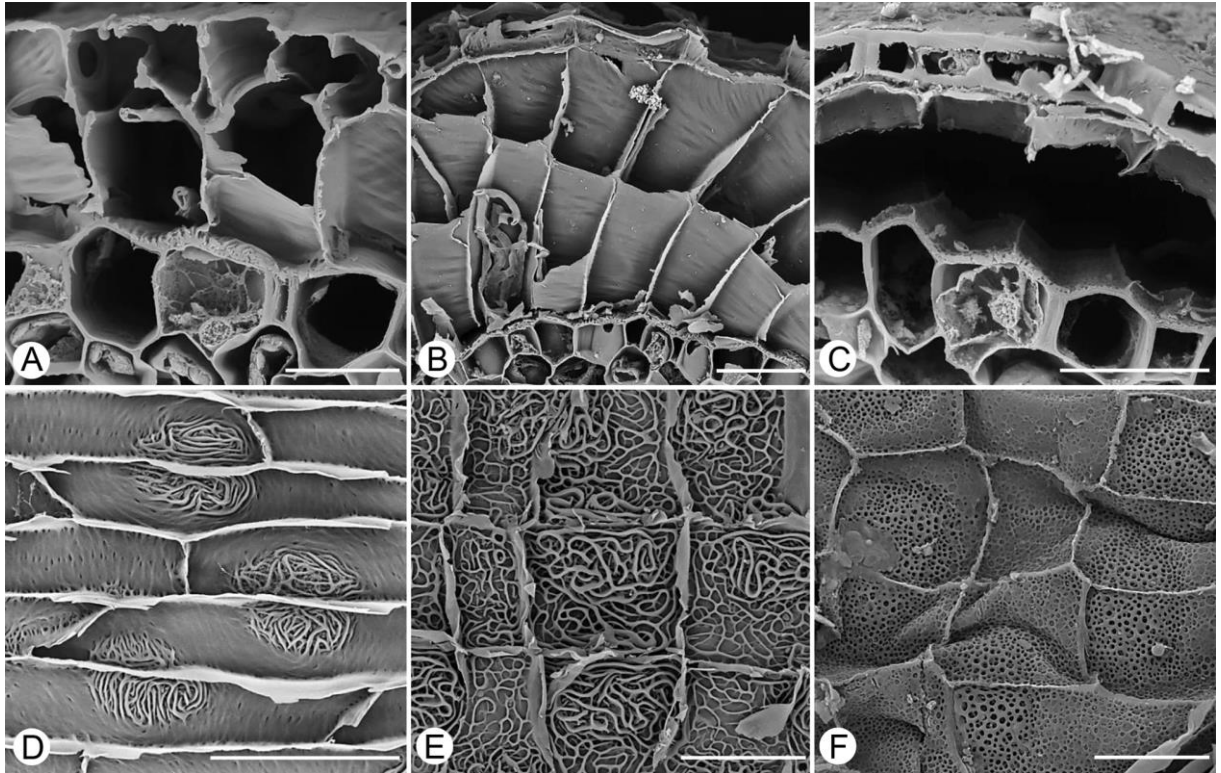
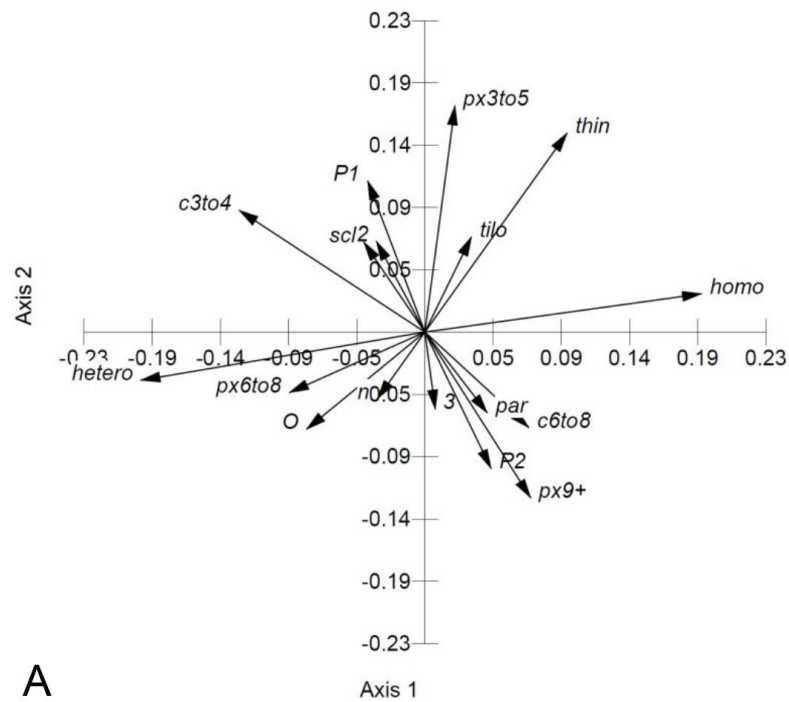
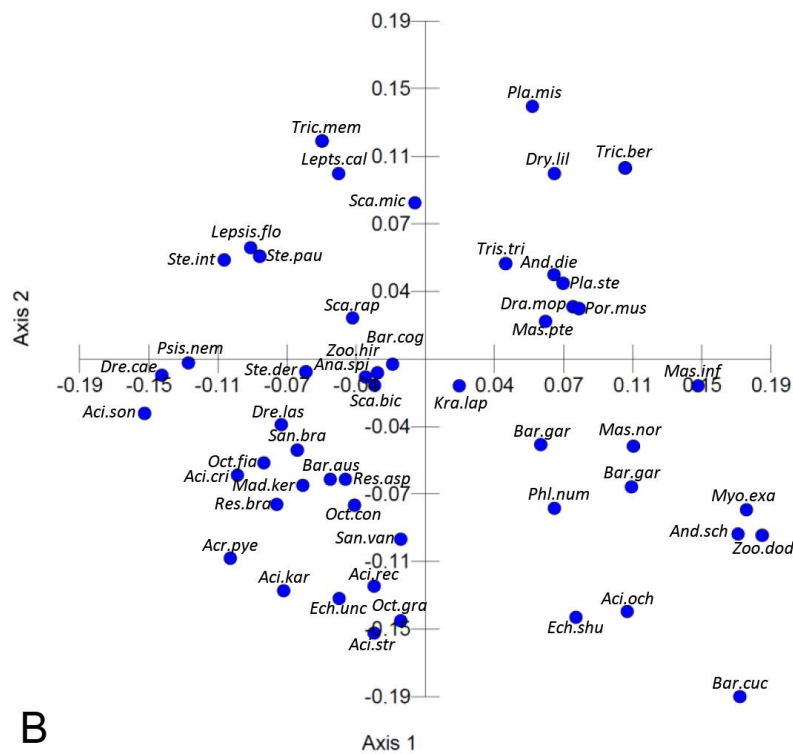


Fig. 16 Secções de raízes de espécies de Pleurothallidinae mostrando o complexo velame-exoderme e tilossomos, em microscopia eletrônica de varredura (*Continuação*). **A-C**: Secções transversais. **D-F**: Secções tangenciais da parede periclinal interna do endovelame. **A,D**: *Stelis* sp. **B,E**: *Pabstiella carinifera*. **C,F**: *Pabstiella sordida*. Scale bars: 25µm(A,E-F), 50µm(B-D).

Fig.2. Organografia do complexo velame-exoderme nos gêneros de Pleurothallidinae.



A



B

Fig. 17. Análise de componentes principais dos táxons em função dos caracteres morfológicos encontrados nas raízes de Pleurothallidinae. **A-B:** Representação bidimensional nos quadrantes mostrando maiores vetores morfológicos (A) e distribuição das espécies no espaço amostral (B).

2: velame biestratificado; **3:** velame com três camadas; **c3to4:** parênquima cortical com três a quatro camadas; **c6to8:** parênquima cortical com seis a oito camadas; **hetero:** parênquima cortical heterogêneo; **homo:** parênquima cortical homogêneo; **n:** exoderme espessada em “n”; **O:** exoderme espessada em “O”; **P1:** periciclo uniestratificado; **P2:** presença de periciclo biestratificado; **par:** medula parenquimática; **px3to5:** três a cinco arcos de protoxilema; **px6to8:** seis a oito arcos de protoxilema. **px9+:** nove ou mais arcos de protoxilema; **scl:** medula esclerificada; **thin:** exoderme fina; **tijo:** presença de tilosomo.

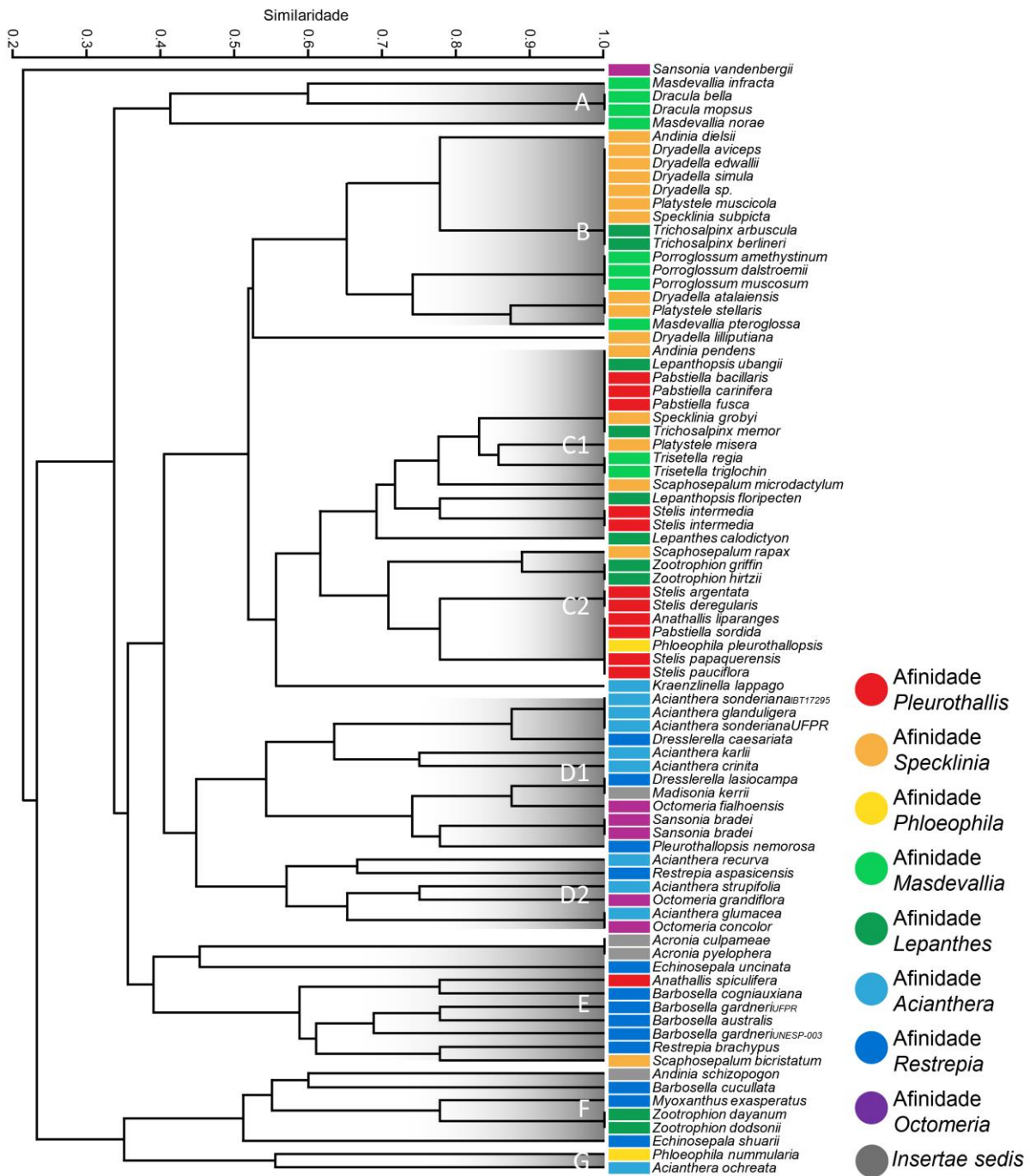


Fig. 18. Dendrograma gerado pela Análise de Cluster mostrando a similaridade morfológica pelo índice de Jaccard entre as espécies da subtribo Pleurothallidinae, incluindo todos os táxons analisados e caracteres anatómicos da raiz.

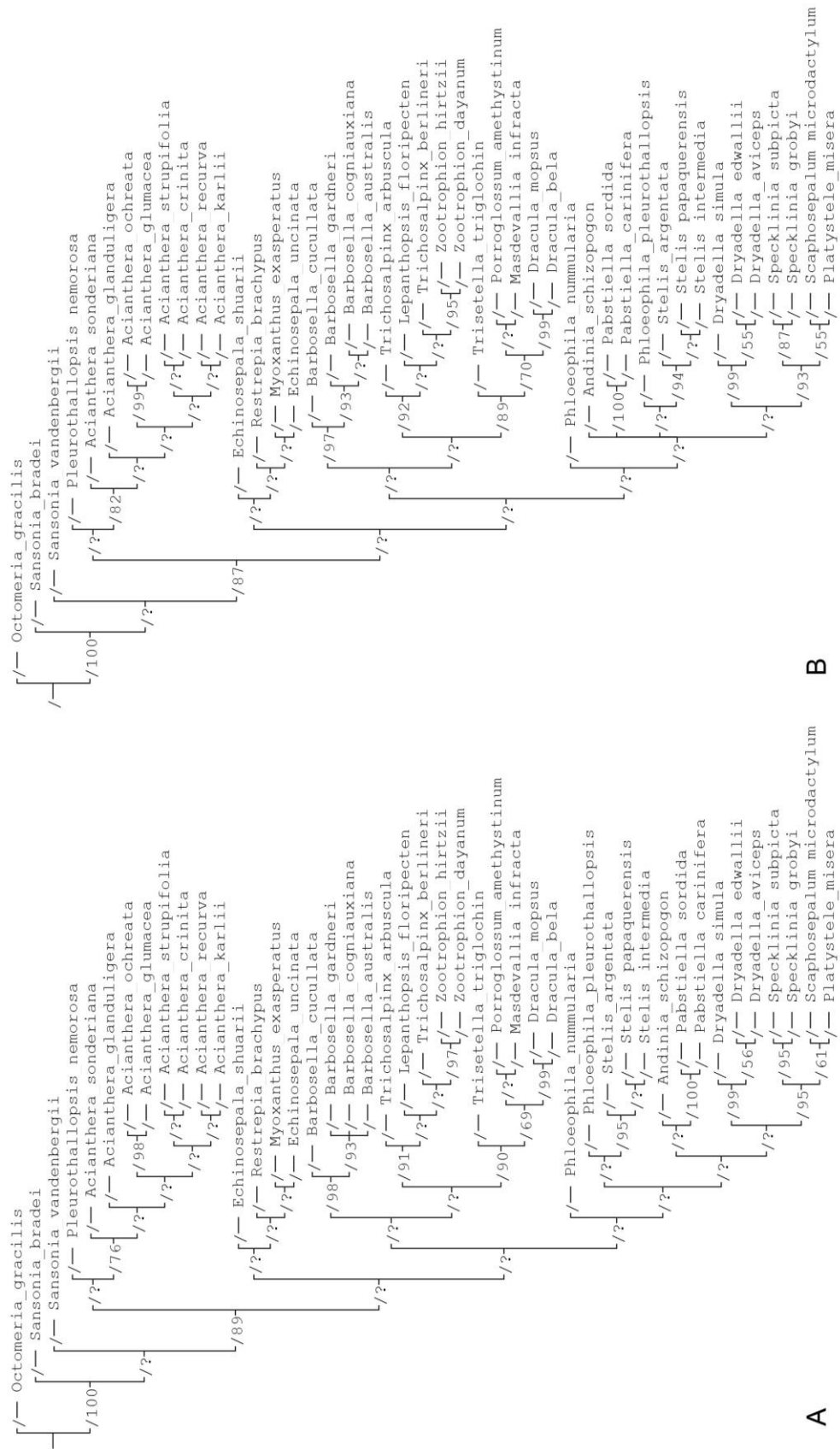


Fig. 19. Árvores filogenéticas de Máxima Parcimônia com base no consenso estrito dos caracteres genéticos da região ITS (A), e evidência total (B) das espécies de Pleurothallidinae.

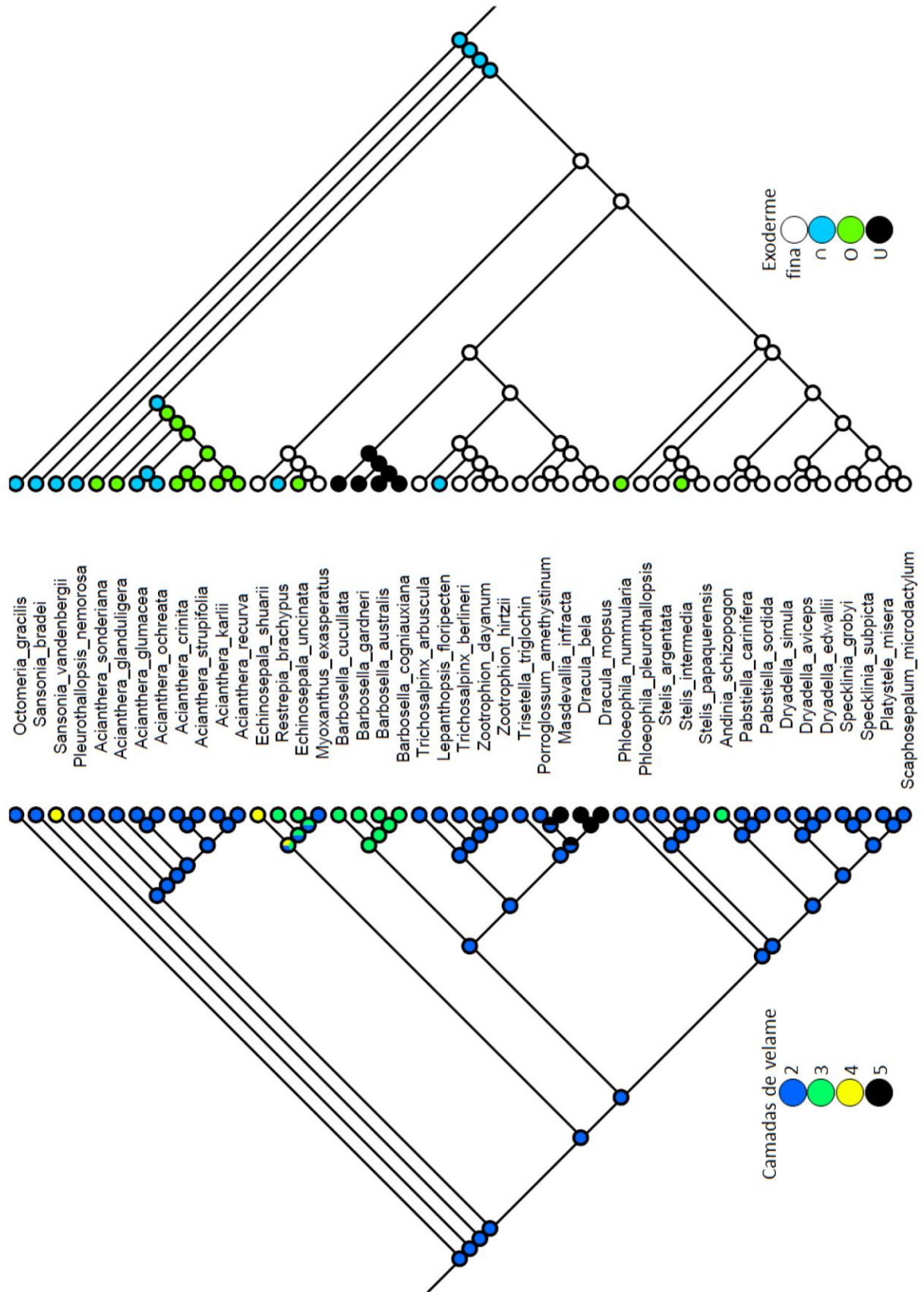


Fig. 20. Evolução dos caracteres do complexo velame-exoderme nas espécies de Pleurothallidinae.

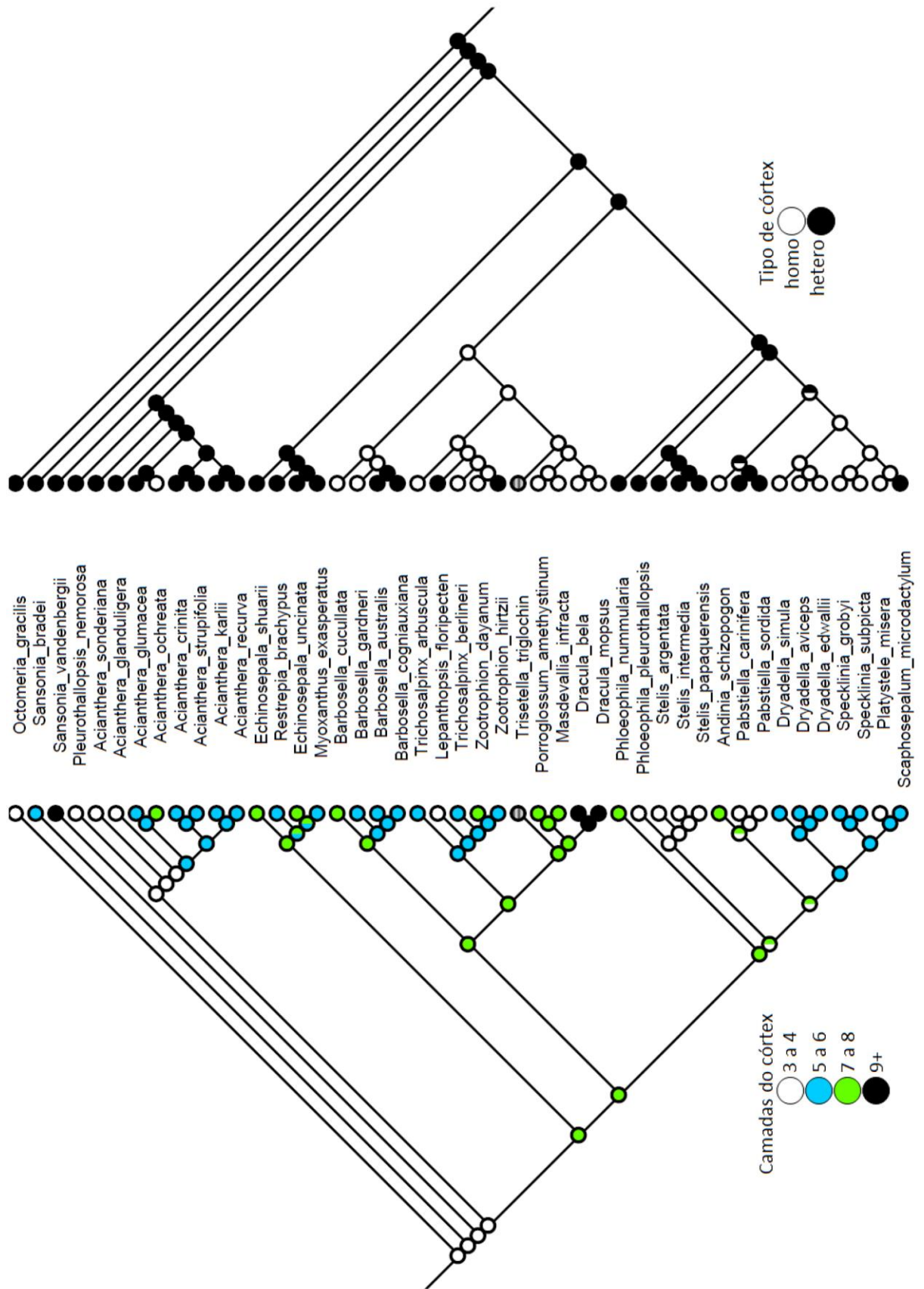


Fig. 21. Evolução dos caracteres do córtex nas espécies de Pleurothallidinae.

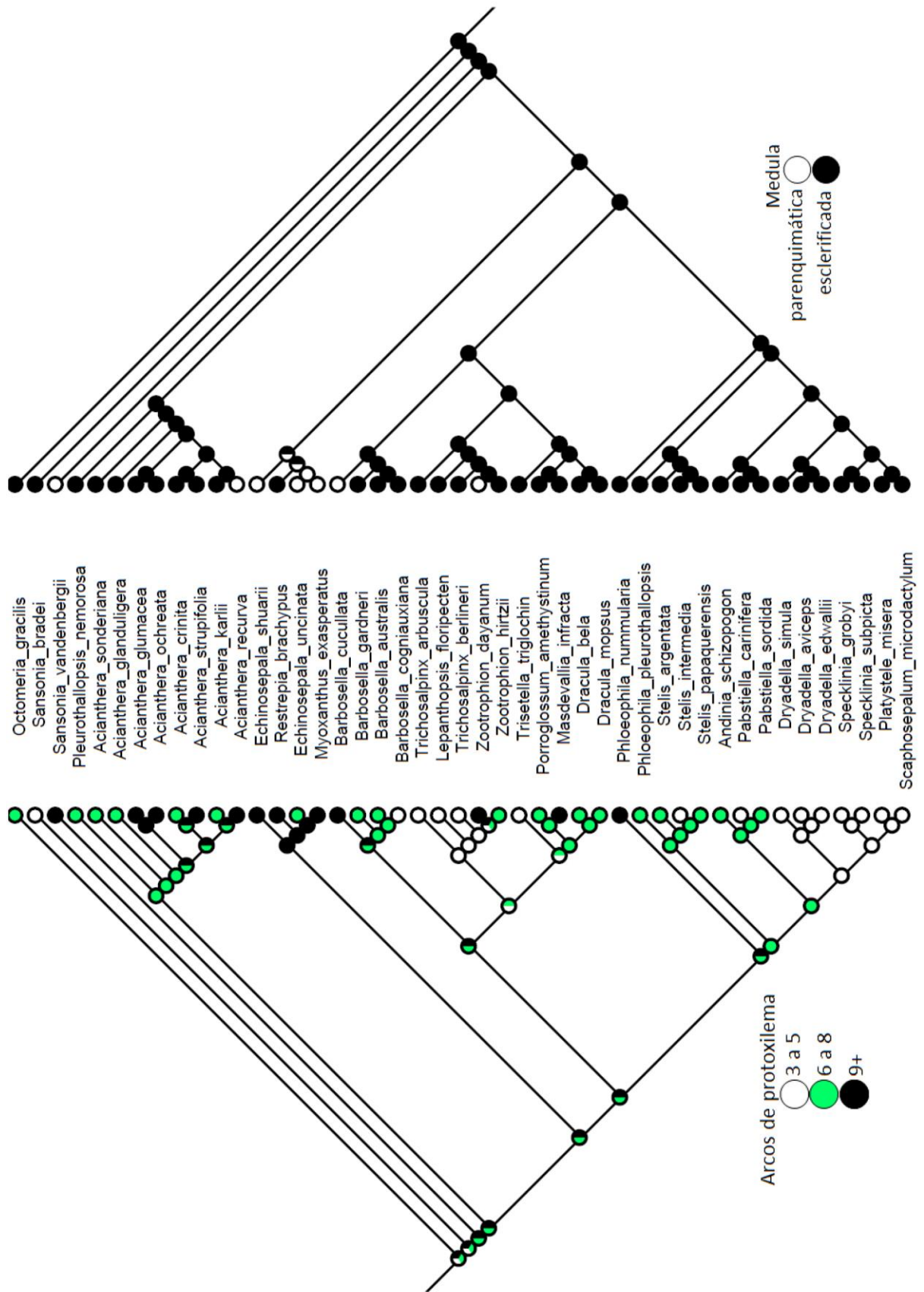


Fig. 22. Evolução dos caracteres do cilindro vascular nas espécies de Pleurothallidinae.

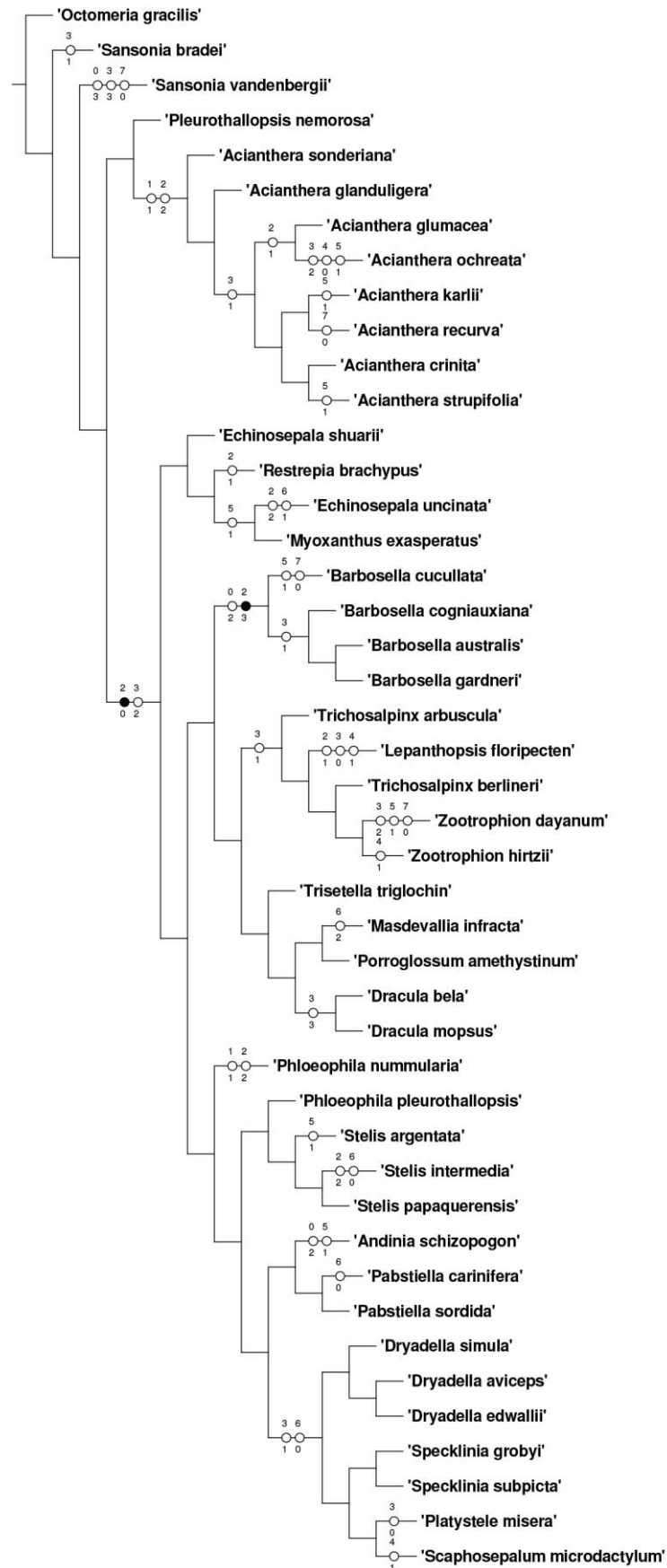


Fig. 23. Reconstrução de caracteres morfológicos da subtribo Pleurothallidinae. Círculos vazios representam homoplasias e círculos preenchidos sinapomorfias. Números superiores: caractere, números inferiores: estado do caractere (Apêndice 2).

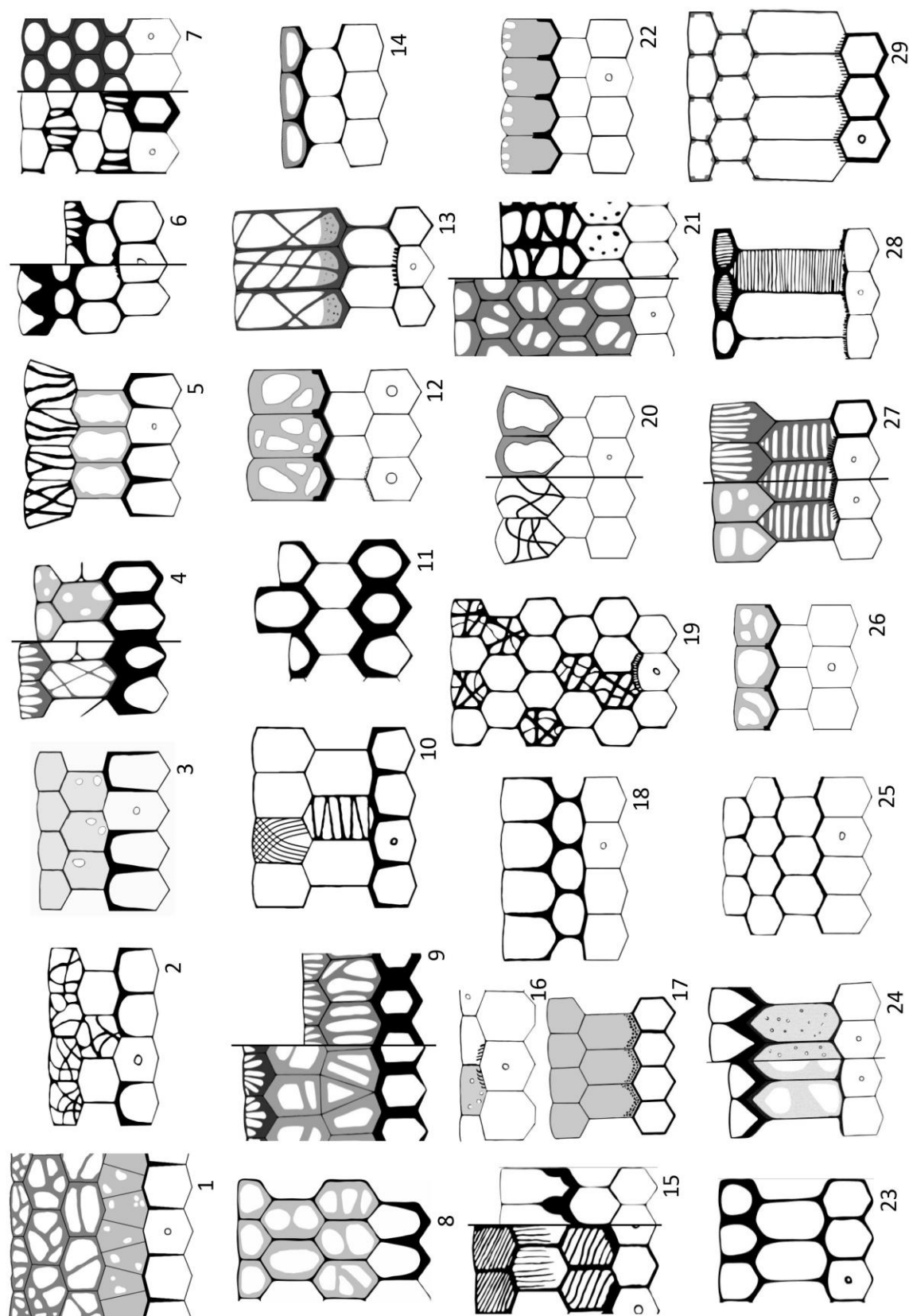


Fig. 24. Organograma dos padrões morfológicos do complexo velame-exoderme encontrados nos gêneros da subtribo Pleurothallidinae organizados evolutivamente segundo Karremans (2016). Escala de cinza ao preto indica gradiente de lignificação. 1. *Sansonia vandenberguii*; 2. *Sansonia bradei*; 3. *Madisonia*; 4. *Octomeria*; 5. *Dresslerella*; 6. *Myoxanthus*; 7. *Echinosepala*; 8. *Barbosella*; 9. *Restrepia*; 10. *Pleurothallopsis*; 11. *Acianthera*; 12. *Kraenzlinella*; 13. *Zootrophion*; 14. *Trichosalpinx*; 15. *Anathallis*; 16. *Lepanthopsis*; 17. *Lepanthes*; 18. *Trisetella*; 19. *Dracula*; 20. *Porroglossum*; 21. *Masdevallia*; 22. *Andinia*; 23. *Dryadella*; 24. *Specklinia*; 25. *Scaphosepalum*; 26. *Platystele*; 27. *Stelis*; 28. *Pabstiella*; 29. *Acronia*.

TABELAS

Tabela 2. Resumo da ocorrência dos caracteres radiculares na subtribo Pleurothallidinae

Táxon	Velame		Tilossomo ^b	Exoderme ^c	Medula ^d
	Camadas	Características ^a			
<i>Acianthera</i>	2	U, anast	-	O, ∩	par/scl
<i>Acronia</i>	3		+	O	scl
<i>Anathallis</i>	2,3	U, anast, retic	+	thin, ∩	scl
<i>Andinia</i>	2,3	U	+	thin, ∩	scl
<i>Barbosella</i>	3	perfo	+	U	par/scl
<i>Dracula</i>	5	U, anast	+	thin	scl
<i>Dresslerella</i>	2	U, anast	+	O, ∩	scl
<i>Dryadella</i>	2	U, ∩	+	thin	scl
<i>Echinosepala</i>	4/3	O, anast. perfo	+	thin, O	par
<i>Kraenzlinella</i>	2	U, anast	+	thin	scl
<i>Lepanthes</i>	1		+	thin	scl
<i>Lepanthopsis</i>	2	O, U	+	thin, ∩	scl
<i>Madisonia</i>	2		+	∩	scl
<i>Masdevallia</i>	2,4,5	anast, helic, perfo	+	thin	scl
<i>Myoxanthus</i>	2	U	+	thin	par
<i>Octomeria</i>	2	perfo, retic	-	∩	scl
<i>Pabstiella</i>	2	anast, perfo, retic	+	thin	scl
<i>Phloeophila</i>	2	U	-, +	thin, O	scl
<i>Platystele</i>	2	U	+	thin	scl
<i>Pleurothallopsis</i>	2	retic, helic	+	∩	scl
<i>Porroglossum</i>	2	anast	+	thin	scl
<i>Restrepia</i>	2,3	anast	+	O	scl
<i>Sansonia</i>	2,4	anast, perfo	+	∩	par/scl
<i>Scaphosepalum</i>	2,3	U	+	thin	scl
<i>Specklinia</i>	2	U	+	thin	scl
<i>Stelis</i>	2	helic, perfo, retic	+	O, thin	scl
<i>Trichosalpinx</i>	2	U, O	+	thin	scl
<i>Trisetella</i>	2	U, anast	+	thin	scl
<i>Zootrophion</i>	2	U, anast, helic	+	thin	par/scl

a Todas as paredes igualmente espessadas (O), paredes periclinal interna e anticlinalis espessadas (U), anastomosado (anast), helicoidal (helic), perforado (perfo), reticulado (retic)

b Presente (+), ausente (-)

c Todas as paredes igualmente espessadas com lignina (O), paredes periclinal interna e anticlinalis espessadas (U), paredes periclinal externa e anticlinalis espessadas com lignina (∩), paredes finas com lamela de suberina (thin)

d Esclerificada (esc), Parenquimática (par)

Tabela 3. Ocorrência dos caracteres radiculares em espécies de Pleurothallidinae. Epv: epivelame, Edv: endovelame, Tilo: tilossomos, Exo: exoderme, Endo: endoderme, P: número de camadas do periciclo, Px: números de arcos de protoxilema, anast: anastomosado, helic: helicoidal, perfo: perforado, retic: reticulado, \cap : paredes anticlinais e periclinal externa espessadas, O: paredes periclinais e anticlinais igualmente espessadas, U: paredes anticlinais e periclinal interna espessadas, homo: homogêneo, hetero: heterogêneo, esc: esclerificado, par: parenquimático, +: presente, -: ausente.

Voucher	Táxon	Velame				Córtex				Cilindro Vascular		
		Camadas	Característica			Exo	Camadas	Tipo	Endo	P	Px	Pith
			Epv	Edv	Tilo							
UFPR	<i>Acianthera crinita</i>	2	U/anas		-	O	5 to 6	hetero	O	1	7	scl
IBT13608	<i>Acianthera glanduligera</i>	2	U		-	O	3 to 4	hetero	O	1	7	scl
UFPR	<i>Acianthera glumacea</i>	2	U		-	\cap	4 to 5	hetero	O	1	9 to 10	scl
UFPR	<i>Acianthera karlii</i>	2	U		-	O	5 to 6	hetero	O	2	7 to 8	scl
UFPR	<i>Acianthera ochreatea</i>	2	U		-	\cap	6 to 7	homo	O	2	13 to 14	scl
IBT3687	<i>Acianthera recurva</i>	2	U	perfo	-	O	5 to 6	hetero	O	1	10 to 11	par
UFPR	<i>Acianthera sonderiana</i>	2	U		-	O	3 to 4	hetero	O	1	6 to 7	scl
IBT17295	<i>Acianthera sonderiana</i>	2	U		-	O	3 to 4	hetero	O	1	6 to 7	scl
IBT16528	<i>Acianthera strupifolia</i>	2	U		-	O	5 to 6	hetero	O	2	10 to 11	scl
ECU18	<i>Acronia culpameae</i>	3			+	O	3 to 4	hetero	O	1	6	scl
ECU22	<i>Acronia pyelophera</i>	3			+	O	3 to 4	hetero	O	1	6	scl
UFPR	<i>Anathallis liparanges</i>	2	U		+	thin	3 to 4	hetero	O	1	6	scl
IBT4808	<i>Anathallis spiculifera</i>	3	anast	retic	+	\cap	4 to 5	hetero	O	1	5	scl
ECU7	<i>Andinia dielsii</i>	2	U		+	thin	5 to 6	homo	O	1	5	scl
ECU30	<i>Andinia pendens</i>	2	U		+	thin	3 to 5	hetero	O	1	4 to 5	scl
ECU21	<i>Andinia schizopogon</i>	3	U		+	thin	6 to 8	homo	O	2	12	scl
UNESP-001	<i>Barbosella australis</i>	3	perfo	perfo	+	U	4 to 5	hetero	O	1	7	scl
UNESP-002	<i>Barbosella cogniauxiana</i>	3	perfo	perfo	+	U	4 to 5	hetero	O	1	5	scl
UFPR	<i>Barbosella cucullata</i>	3	perfo	perfo	+	U	6 to 7	homo	O	2	10	par
UFPR	<i>Barbosella gardneri</i>	3	perfo	perfo	+	U	5 to 6	homo	O	1	8	scl
UNESP-003	<i>Barbosella gardneri</i>	3	perfo	perfo	+	U	5 to 6	homo	O	1	9	scl
UNESP-004	<i>Dracula bella</i>	5	U	anast	+	thin	6 to 9	homo	O	1	8	scl
UNESP-005	<i>Dracula mopsus</i>	5	U	anast	+	thin	8 to 9	homo	O	1	6	scl
ECU26	<i>Dresslerella caesariata</i>	2	anast		+	O	3 to 4	hetero	O	1	7 to 8	scl
ECU10	<i>Dresslerella lasiocampa</i>	2	U		+	\cap	4 to 6	hetero	O	1	7 to 8	scl
UFPR	<i>Dryadella atalaiensis</i>	2	U		+	thin	5	homo	O	1	6	scl
UNESP-007	<i>Dryadella aviceps</i>	2	U		+	thin	5	homo	O	1	4 to 5	scl
UNESP-006	<i>Dryadella edwallii</i>	2	U		+	thin	5	homo	O	1	4 to 5	scl
IBT5712	<i>Dryadella lilliputiana</i>	2	U		+	thin	3 to 4	homo	O	1	5	scl
ECU2	<i>Dryadella simula</i>	2	U	\cap	+	thin	4 to 5	homo	O	1	4 to 5	scl

Voucher	Táxon	Velame				Córtex				Cilindro Vascular		
		Camadas	Característica			Exo	Camadas	Tipo	Endo	P	Px	Pith
			Epv	Edv	Tilo							
UFPR	<i>Dryadella sp.</i>	2	U		+	thin	4 to 5	homo	O	1	4 to 5	scl
ECU19	<i>Echinosepala shuarii</i>	4		O	+	thin	7 to 8	hetero	O	2	10 to 11	par
ECU23	<i>Echinosepala uncinata</i>	3	anast	perfo	+	O	5 to 8	hetero	O	1	7	par
ECU28	<i>Kraenzlinella lappago</i>	2	U/anast		+	thin	6 to 7	hetero	O	1	7 to 9	scl
ECU12	<i>Lepanthes calodictyon</i>	1			+	thin	3 to 4	hetero	O	1	3	scl
UNESP-008	<i>Lepanthesopsis floripecten</i>	2			+	∩	3	hetero	O	1	5	scl
ECU11	<i>Lepanthesopsis ubangii</i>	2	U/O		+	thin	3 to 4	hetero	O	1	3 to 5	scl
IBT17105	<i>Masdevallia infracta</i>	5	anast/perfo		+	thin	6 to 8	homo	O	1	10	scl
UFPR	<i>Masdevallia norae</i>	4	perfo	perfo	+	thin	5 to 6	homo	O	2	5 to 7	scl
UFPR	<i>Masdevallia pteroglossa</i>	2	helic	anast	-	thin	5 to 6	homo	O	1	6	scl
	<i>Madisonia kerrii</i>	2			+	∩	4 to 5	hetero	O	1	6	scl
IBT15742	<i>Myoxanthus exasperatus</i>	2	U		+	thin	4 to 5	hetero	O	2	15 to 16	par
UNESP-009	<i>Octomeria concolor</i>	2			-	∩	4 to 5	hetero	O	1	11	scl
UNESP-010	<i>Octomeria fialhoensis</i>	2			-	∩	4 to 5	hetero	O	1	7 to 8	scl
UFPR	<i>Octomeria grandiflora</i>	2	perfo	retic	-	O/∩	5 to 6	hetero	O	2	12 to 13	scl
UFPR	<i>Pabstiella bacillaris</i>	2	anast	anast	+	thin	3 to 4	hetero	O	1	5	scl
UFPR	<i>Pabstiella carinifera</i>	2	retic	retic	+	thin	3 to 4	hetero	O	1	5	scl
IBT15705	<i>Pabstiella fusca</i>	2			+	thin	3 to 4	hetero	O	1	4 to 5	scl
UFPR	<i>Pabstiella sordida</i>	2	O/anast	perfo	+	thin	3 to 4	hetero	O	1	6	scl
UNESP-011	<i>Phloeophila nummularia</i>	2	U		-	O	7 to 8	hetero	O	1	8 to 9	scl
ECU14	<i>Phloeophila pleurothalloopsis</i>	2	U		+	thin	3 to 4	hetero	O	1	5 to 6	scl
ECU31	<i>Platystele misera</i>	2	U		+	thin	3 to 4	homo	O	1	3	scl
ECU25	<i>Platystele muscicola</i>	2	U		+	thin	4 to 5	homo	O	1	5	scl
ECU32	<i>Platystele stellaris</i>	2	U		+	thin	5 to 6	homo	O	1	6	scl
IBT17352	<i>Pleurothalloopsis nemorosa</i>	2	retic	helic	+	∩	3 to 4	hetero	O	1	6 to 7	scl
ECU17	<i>Porroglossum amethystinum</i>	2			+	thin	6 to 8	homo	O	1	7	scl
ECU24	<i>Porroglossum dalstroemii</i>	2			+	thin	7	homo	O	1	7	scl
ECU15	<i>Porroglossum muscosum</i>	2	anast		+	thin	6 to 8	homo	O	1	7 to 8	scl
UNESP-012	<i>Restrepia aspasicensis</i>	2to3		anast	+	∩	4 to 5	hetero	O	1	6	scl
UNESP-013	<i>Restrepia brachypus</i>	3	retic	anast	+	∩	5 to 7	hetero	O	1	9 to 11	scl
IBt15809	<i>Sansonioa bradei</i>	2			+	∩	6 to 7	hetero	O	1	5 to 6	scl
	<i>Sansonioa vandenberghii</i>	4	anast	perfo	+	∩	8 to 10	hetero	O	1	8 to 9	par
ECU20	<i>Scaphosepalum bicristatum</i>	3	U		+	thin	4 to 5	hetero	O	1	7	scl
ECU16	<i>Scaphosepalum microdactylum</i>	2	U		+	thin	4 to 5	hetero	O	1	5	scl
ECU13	<i>Scaphosepalum rapax</i>	2	U		+	thin	4 to 5	hetero	O	1	7	scl
IBT4686	<i>Specklinia grobyi</i>	2	U		+	thin	3	hetero	O	1	5	scl

Voucher	Táxon	Velame				Córtex				Cilindro Vascular		
		Camadas	Característica			Exo	Camadas	Tipo	Endo	P	Px	Pith
			Epv	Edv	Tilo							
UFPR	<i>Specklinia subpicta</i>	2	U		+	thin	4 to 5	homo	O	1	5	scl
UNESP-015	<i>Stelis argentata</i>	2			+	thin	3 to 4	hetero	O	2	7	scl
UNESP-017	<i>Stelis deregularis</i>	2	retic	helic	+	thin	3	hetero	O	2	6	scl
UFPR	<i>Stelis intermedia</i>	2	retic	helic	+	O	3	hetero	O	1	4 to 5	scl
UNESP-014	<i>Stelis intermedia</i>	2			+	O	3	hetero	O	1	5	scl
UNESP-016	<i>Stelis papaquerensis</i>	2	perfo	helic	+	thin	3	hetero	O	1	8	scl
UFPR	<i>Stelis pauciflora</i>	2	retic	helic	+	thin	3	hetero	O	1	3 to 6	scl
ECU9	<i>Trichosalpinx arbuscula</i>	2	U		+	thin	4 to 5	homo	O	1	4 to 5	scl
ECU5	<i>Trichosalpinx berlineri</i>	2	U		+	thin	4 to 5	homo	O	1	4 to 5	scl
IBT16304	<i>Trichosalpinx memor</i>	2	U		+	thin	3	hetero	O	1	5	scl
ECU4	<i>Trisetella regia</i>	2	U/anast		+	thin			O	1	4 to 5	scl
ECU3	<i>Trisetella triglochin</i>	2	U/anast		+	thin			O	1	4 to 5	scl
ECU29	<i>Zootrophion dayanum</i>	2	U/anast		+	thin	7 to 8	homo	O	2	10 to 11	par
ECU27	<i>Zootrophion dodsonii</i>	2	U/anast		+	thin	7 to 8	homo	O	2	10 to 11	par
ECU1	<i>Zootrophion griffin</i>	2	U/helic		+	thin	4 to 5	hetero	O	1	5 to 6	scl
ECU6	<i>Zootrophion hirtzii</i>	2			+	thin	4 to 5	hetero	O	1	7 to 8	scl

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.B.R, SMIDT, E.C, AMANO, E. 2019. Evolution of anatomical characters in *Acianthera* section Pleurobotryae (Orchidaceae: Pleurothallidinae). PLoS ONE 14(3): e0212677
- ARDITTI, J.; GHANI, A.K.A. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytol.* 145: 367–421.
- BENZING, D.H. 1986. The vegetative basis of vascular epiphytism. *Selbyana* 9(1): 23-43.
- BENZING, D.H. 1990. *Vascular epiphytes: General biology and related biota.* Cambridge University. Press. 343 p.
- BENZING, D.H.; OTT, D.W.; FRIEDMAN, W.E.1982. Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen–exodermis complex. *Am. J. Bot.* 69(4): 608–14.
- BENZING, D.H.; PRIDGEON, A.M. 1983. Foliar trichomes of Pleurothallidinae (Orchidaceae): functional significance. *Amer. J. Bot.* 70(2): 173–180.
- BOGARIN, D. et al. 2019. Phylogenetic comparative methods improve the selection of characters for generic delimitations in a hyperdiverse Neotropical orchid clade. *Sci Rep*: 9, 15098 (2019) doi:10.1038/s41598-019-51360-0
- BORBA, E.L. et. al. 2011. Mating Systems In The Pleurothallidinae (Orchidaceae). Evolutionary and Systematic Implications. *Lankesteriana* 11(3): 207—221.
- BUKATSCH, F. 1972. Bermerkungen zur Dopelfärbung Astrablau–Safranin. *Mikrokosmos* 61:255.
- CARDOSO-GUSTAVSON, P.; CAMPBELL, L.M.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C.; BARROS, F. 2014 Floral Colleters In Pleurothallidinae (Epidendroideae: Orchidaceae). *Am J Bot* 101(4): 587–597.
- CHIRON, G.R, KARREMANS, A.P.; van den BERG, C. 2016. Nomenclatural notes in the Pleurothallidinae (Orchidaceae): *Phloeophila*. *Phytotaxa* 270(1): 056-062.
- CHIRON, G.R.; GUIARD, J.; van den BERG, C. 2012. Phylogenetic relationships in Brazilian *Pleurothallis sensu lato* (Pleurothallidinae, Orchidaceae): evidence from nuclear ITS rDNA sequences, *Phytotaxa* 46: 34–58.
- DRESSLER, R.L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family.* Dioscorides Press, Oregon. 314p.
- DYCUS, A.M.; KNUDSON, L. 1957. The role of the velamen of the aerial roots of orchids. *Bot. Gaz.* 119(2): 78–87.
- ENGARD, C.J. 1944. Morphological identity of the velamen and exodermis in orchids. *Bot. Gaz* 105: 457–462.
- ESAU, K. 1966. *Anatomy of seed plants.* 2ed. John Wiley, Sons, New York.
- FAHN, A. 1974. *Plant Anatomy.* 2ed. Pergamon Press, Oxford.

- FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. . Amer. J. Bot. 55:123–42.
- FREUDENSTEIN, J.V.; RASMUSSEN, F.N. 1999. What Does Morphology Tell Us About Orchid relationships. A Cladistic Analysis. Am J Bot. 86(2): 225-48.
- GOLOBOFF P.A, FARRIS J.S, NIXON K.C. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. Cladistics 24: 1-13.
- IDRIS N.A, COLLINGS D.A. 2015. The life of phi: the development of phi thickenings in roots of the orchids of the genus *Miltoniopsis*. Planta 241: 489-506.
- KARREMANS, A.P. 2016. Genera Pleurothallidarum: an updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. Lankesteriana 16(2): 219-241.
- KARREMANS, A.P.; ALBERTAZZI, F.J; BAKKER, F.T. et al. 2016. Phylogenetic reassessment of *Specklinia* and its allied genera in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). Phytotaxa 272: 1–36
- KARREMANS, A.P.; BAKKER, F.T.; PUPULIN, F. et al. 2013. Phylogenetics of *Stelis* and closely related genera (Orchidaceae, Pleurothallidinae) Plant Syst Evol 299: 151–176. DOI 10.1007/s00606-012-0712-7
- KARREMANS, A.P.; BOGARÍN, D.; DÍAZ-MORALES, M. et al. 2016. Phylogenetic reassessment of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) Harv Pap Bot: 21(2):171-187
- KEDROVSKI, H.R. 2014. Anatomia radicular de espécies da subtribo Pleurothallidinae (Orchidaceae). Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 113 p. disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/129319/330012.pdf>
- KOVACH, W. L. 1999. MVSP-A multivariate statistical Package for Windows, ver. 3.1. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, UK, 137.
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica: Ed. Universidade Rural. Rio de Janeiro. 198p
- LEROUX, O. et al. 2011. Non–lignified helical cell wall thickenings in root cortical cells of Aspleniaceae (Polypodiales): histology and taxonomical significance. Ann. Bot. 107: 195–207. doi:10.1093/aob/mcq225.
- LUER, C.A. 1986. Icones Pleurothallidarum I. Systematics of the Pleurothallidinae. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 15: 1–81.
- LUER, C.A. 2002. A Systematic Method of Classification of the Pleurothallidinae Versus a Strictly Phylogenetic Method. Selbyana 23(1): 57-110.
- MADDISON, W.P.; MADDISON, D.R. 2015. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.04 <http://mesquiteproject.org>
- NIXON, K.C. 2002. WinClada, version 1.00.08. Published by the author. Ithaca.

- OLATUNJI, O.A.; NENGIM, R.O. 1980. Occurrence and distribution of tracheoidal elements in the Orchidaceae. Bot. J. Linn. Soc. 80(4): 357–370. doi:10.1111/j.1095–8339.1980.tb01669.x.
- OLIVEIRA, V.C.; SAJO, M.G. 1999. Root anatomy of nine Orchidaceae species. Braz. Arch. Biol. Technol. 42(4): 405–413.
- PIAZZA, L.D. 2013. Evolução dos caracteres anatômicos dos órgãos vegetativos de espécies de *Bulbophyllum* Thouars (orchidaceae, epidendroideae) neotropicais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. 1988. Velamen radicum micromorphology and classification of Orchidaceae. Nordic J. Bot. 8: 117–137.
- PRIDGEON, A.M., STERN, W.L. 1983. Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae) Am J Bot. 1983,70(8):1233–1243. doi: 10.2307/2443293
- PRIDGEON, A.M., STERN, W.L. 1982. Vegetative Anatomy of *Myoxanthus* (Orchidaceae) Selbyana 5(1): 55–63.
- PRIDGEON, A.M. 1982. Diagnostic anatomical characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). Am. J. Bot. 69(6): 921–938.
- PRIDGEON, A.M. 1983. The velamen and exodermis of orchid roots. In: Arditti K. ed. Orchid biology. Reviews and perspectives IV. Ithaca, NY: Cornell University Press, 139–192.
- PRIDGEON, A.M.; CHASE, M.W. 2001. A phylogenetic reclassification of the Pleurothallidinae (Orchidaceae). Lindleyana 16: 235–271.
- PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE, M.W.; RASMUSSEN, F.N.; eds. 2005. Genera Orchidacearum. Volume 4. Epidendroideae (Part 1). Oxford: Oxford University Press. 696p.
- PRIDGEON, A.M.; SOLANO, R.; CHASE, M.W. 2001. Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. Am. J. Bot. 88(12): 2286–2308.
- PRIDGEON, A.M.; STERN, W.L.; BENZING, D.H. 1983. Tilosomes in roots of Orchidaceae: morphology and systematic occurrence. Amer. J. Bot. 70(9): 1365–1377.
- PRIDGEON, A.M.; WILLIAMS, N.H. 1979. Anatomical aspects of *Dresslerella*. Selbyana 5(2): 120–134.
- PYLRO, V.S.; NOGUEIRA, R.E.; LANNA, M.C.S. 2013. Anatomical Characterization of Mycorrhizal Fungi in Neotropical Orchids. Adv. stud. biol. 5(5): 215–221.
- RODRIGUES, V.T., SMIDT, E.C., BOLSON, M. 2017. Phylogeny of *Acianthera* sect. Pleurobotryae (Orchidaceae: Pleurothallidinae), an endemic group of the Atlantic Forest
- SANDFORD, W.W.; ADANLAWO, I. 1973. Velamen and exodermis characters of West African epiphytic orchids in relation to taxonomic grouping and habitat tolerance. Bot. J. Linn. Soc. 66: 307–321.

- SCATENA, V.L.; NUNES, A.C. 1996. Anatomia de *Pleurothallis rupestris*. Lindl. (Orchidaceae) dos campos rupestres. Bol. Bot. Univ. São Paulo. 15: 35–43
- SCHREIBER, L.; FRANK, R.B. 2011. Endodermis and Exodermis in Roots. In: eLS. John Wiley, Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0002086.pub2
- SILVA, I. V. et. al. 2010. Anatomia de Raízes de Espécies de Orchidaceae do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. Hoehnea 37(1): 147-161.
- STENZEL, H. 2000. Pollen morphology of the subtribe Pleurothallidinae Lindl. (Orchidaceae). Grana 39: 108– 125.
- STERN, W.L. 2014. Anatomy of the Monocotyledons Volume X. Orchidaceae, Oxford University Press. 288p.
- TAMURA, K ET al. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol Biol Evol. 30(12): 2725–2729.
- THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22(22):4673-80.
- WILSON, G.S. et al. 2017. Phylogenetic analysis of *Andinia* (Pleurothallidinae; Orchidaceae) and a systematic re-circumscription of the genus. Phytotaxa. 295(2): 101-131
- ZOTZ, G.; WINKLER, U. 2013. Aerial roots of epiphytic orchids. the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. Oecologia 171: 733–741.

CAPÍTULO II

KEDROVSKI, H.R.; SAJO, M.G. 2019. What are tilosomes? An update and new perspectives. **Acta Botanica Brasilica**. 33(1): 106-115. doi: 10.1590/0102-33062018abb0273



Acta Botanica Brasílica - 33(1): 106-115. Jan-Mar 2019.
doi: 10.1590/0102-33062018abb0273

What are tilosomes? An update and new perspectives¹

Halisson Rafael Kedrovski^{2*}  and Maria das Graças Sajo² 

Received: August 3, 2018
Accepted: November 7, 2018

ABSTRACT

Characterization of tilosomes and study of their development revealed that they are similar to the cell wall ingrowths of transfer cells. Roots from *Anathallis sclerophylla* were used to examine the development, histochemistry and ultrastructure of tilosomes using light, confocal and electron microscopy (both SEM and TEM). Tilosomes initiate as cellulose papillae in the root elongation zone, increasing the apo/symplast surface throughout the wall-membrane apparatus. Both the development and structure of tilosomes and velamen strips appear similar to the reticulated and flange cell wall ingrowths of *Vicia faba* transfer cells. We suggest two functional phases for tilosomes: a) in young tissues they increase the symplast connection and thus improve outside-inside transport; and b) in mature tissues they direct solutes to passage cells. Both the physiology and the genetic mechanisms controlling the ontogeny of tilosomes remain obscure.

Keywords: autofluorescence, callose, cell wall biochemistry, ontogeny, oriented wall deposition, waxes

Introduction

A tilosome historic and current view

The tilosomes known as protrusions or excrescences (Pridgeon *et al.* 1983; 1999) actually are wall ingrowths (WI) on the inner periclinal wall of the endovelamen cells that lay adjacent to the exodermis passage cells (Fig. 1). They occur in the aerial roots of specific epiphytic orchids. These branched lignified structures (Porembski & Barthlott 1988; Pridgeon *et al.* 1999; Stern 2014) were first described in *Bulbophyllum careyanum* (Chatin 1856) and *Sobralia liliastrum* (Oudemans 1861) and interpreted as adaptations that developed in association with the epiphytic habit in the Orchidaceae (Pridgeon 1983; Benzing 1990). Their function seems to be directly associated with water balance in the plant, reducing the evapotranspiration or promoting the condensation of atmospheric moisture (Benzing *et al.* 1982). Besides their ecophysiological importance (Zotz 2016),

they are important taxonomic characters in the groups in which they occur and define seven morphological types (Pridgeon *et al.* 1983), although others can also occur. Tilosomes predominate in the Polystachyae tribe, subtribes Sobraliinae, Coelogyneinae, Laeliinae, Pleurothallidinae, Bulbophyllinae, Lycastinae, and Maxillariinae (Pridgeon 1983; Pridgeon *et al.* 1983). Within the Pleurothallidinae, the largest orchid subtribe (Karremans 2016), the presence of tilosomes can be considered a plesiomorphic characteristic however frequent and showing a high morphological diversity (HR Kedrovski, unpubl. res.).

The ultrastructure of developed tilosome was first shown for *Sobralia macrantha* (Benzing *et al.* 1982). Subsequent anatomical studies pointed out their taxonomic importance (Stern & Judd 2001; 2002; Stern *et al.* 2004; Carlsward *et al.* 2006; Figueroa *et al.* 2008; Stern & Carlswards 2009; Silva *et al.* 2010; 2015; Pedroso-de-Moraes *et al.* 2012; Andreota *et al.* 2015) but did not show when or how the tilosomes are formed and neither correlate their morphology with the

¹ This article is part of the first author PhD thesis.

² Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal), Departamento de Botânica, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil

* Corresponding author: h.r.kedrovski@hotmail.com



What are tilosomes? An update and new perspectives

wall-membrane apparatus of transfer cells (TC) (Talbot *et al.* 2002; McCurdy *et al.* 2008). Unlike other types of structure where WI are observed such as in seeds (Monjardino *et al.* 2013; Rocha *et al.* 2014; Arun-Chinnappa & McCurdy 2016), phloem parenchyma (Arun-Chinnappa *et al.* 2013; Nguyen & McCurdy 2017; Nguyen *et al.* 2017), giant-cells in nematode feeding tubes (Cabrera *et al.* 2014; Miyashita & Koga 2017), phi cells (Fernandez-Garcia 2009; Melo 2011; Idris & Collings 2015), tracheoidal idioblasts (Burr & Barthlott 1991; Leroux *et al.* 2011), haustorium flange cells (Fineran 1998; Fineran & Calvin 2000) and glands (Gama *et al.* 2016; Tozin & Rodrigues 2017; Wilson *et al.* 2017), the development, ultrastructure and wall composition of the tilosomes have not yet been described. According to Pridgeon (Stern 2014), the wall deposition that forms the tilosome in the endovelamen cells, is oriented early in development by plasmodesmos between an exodermis passage cell and an endovelamen cell. This author concluded that: "much more study is needed to determine the function and ontogeny of tilosomes and whether or not the environment plays a role in the extent of their development".

Materials and methods

Light microscopy

Root apices of *Anathallis sclerophylla* (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase were fixed in FAA 70 (Johansen 1940), stored in alcohol 70 %, dehydrated in terc-butanol series and imbedded in Paraplast. Longitudinal and transversal serial sections were cut at 20 µm using a rotary microtome. The permanent slides were stained with 0.05 % toluidine blue (Feder & O'Brien 1968) and safrablue (Bukatsch 1972; Kraus & Arduin 1997), mounted in Entellan. Photomicrographs were taken under a light microscope (DM 4000B, Leica Microsystem, Wetzlar, Alemanha) with attached camera (DFC 450, Leica Microsystem), through LAS 4.0 software (Leica Application Suite, Leica) in the Photomicrograph Laboratory at the Botany Department, UNESP - Rio Claro.

Scanning electron microscopy

The fixed samples were dehydrated in alcoholic series, and then in a critical point dryer (EM CDP 300 Leica Microsystem, Wetzlar, Gemany), sputter-coated with gold (EM SCD 500 Leica Microsystem, Wetzlar, Germany) and observed in SEM (JSM 6390 LV Jeol, Tokio, Japan) in the Electron Microscopy Central Laboratory of the Federal University of Santa Catarina – UFSC.

Transmission electron microscopy

The root tips were fixed in 2.5 % glutaraldehyde in 0.1M sodium phosphate buffer at pH 7.2 for 24 hours

(Kraus & Arduim 1997). The material was post-fixed in osmium tetroxide (OsO₄) 1 % in 0.1M phosphate buffer, pH 7.2 for 4 hours at room temperature (Bozzola & Russel 1999). After being dehydrated with increasing series of acetone, the material was infiltrated and embedded in a polymer mixture (Araudite, and Epon DDSA). The ultrathin transverse sections were taken by an ultramicrotome, stretched and attached to the grids, counterstained with uranyl acetate and lead citrate, according to Reynolds (1963) procedures, observed and photographed in a TEM (Tecnai Spirit - FEI Company) in the Electron Microscopy Center of the Biosciences Institute, UNESP – Botucatu.

Confocal microscopy

Roots previously fixed and stored were included in polyethylene glycol, 20 µm transversely and longitudinally sectioned using a rotary microtome in the Laboratory of Morphology of the Botany Department of UNESP-RC. Sections were stained separately with calcofluor to mark cellulose and aniline blue for callose, according to Kraus & Arduim (1997). The slides were observed in the Leica SP5 AOBs Point Scanning confocal Microscope from the UNESP-RC Electronic Microscopy Laboratory. The fluorophores were excited at 405 nm with near UV diode and the emission wavelengths were collected between 415 and 448 nm (blue). Lignin and waxes could be visualized by autofluorescence when respectively excited at 488 nm by Argon laser collected between 491 and 563 nm (green), and at 633 nm by HeNe laser collected between 522-622 nm (red). The laser intensity was set to the minimum necessary for imaging (~ 20%) in order to increase the specificity and definition of the wall components localization. The images were obtained in the 3 channels (blue, green and red) in z-stacking with 10 steps for three-dimensional reconstruction.

Samples

All fresh samples were obtained from vegetative clones under cultivation in UNESP-RC Botany Department greenhouses.

Results and discussion

Tilosome development, morphology and wall biochemistry

At the elongation zone of *Anathallis sclerophylla* root apex (Fig. 2), tilosomes develop as cellulosic inconspicuous papillae; on the inner primary cell wall of the endovelamen, adjacent to the exodermis passage cells (Figs. 2G, 3A-D). Papillae synthesis is associated with the presence of mitochondria and RER (Fig. 3). During cell differentiation, the tilosomes undergo lignin impregnations (Fig. 2G-I) to assume their final structure (Figs. 1, 4). Within the



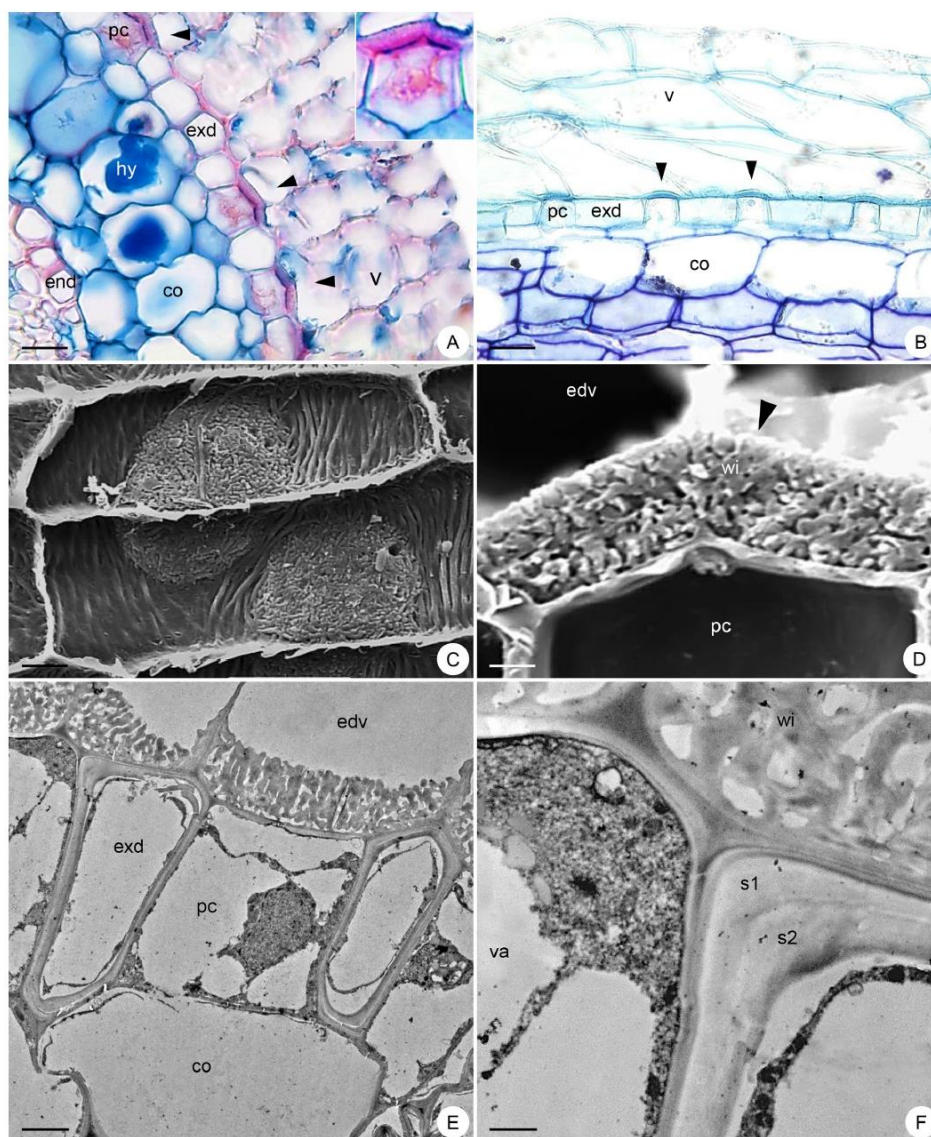


Figure 1. Tilosome morphology in *Anathallis sclerophylla* root. **A-B** Light Microscopy. **C-D** SEM. **E-F** TEM. **A.** Cross section of differentiated roots stained with safrablue, showing "O" thickened endodermis cells (end), cortical cells (co) with pelotons (hy), dead exodermis cells (exd), passage cells of dense cytoplasm (pc), tilosomes (arrowhead) with a thin blue primary wall and the stratified velamen (v). **B.** Longitudinal section stained with toluidine blue, showing by metachromasy the lignified walls (green) in velamen (v), tilosome (arrowhead) and exodermis (exd); note the cortex cellulosic walls (anil blue) (co) and the difference between the common and the passage cells of exodermis. **C-D.** Paradermic (C) and cross section (D) showing the tilosomes (arrowhead) adjacent to the exodermis passage cells (pc) and the reticulated and flange patterns of the endovelamen (edv) WIs. **E-F.** Velamen-exodermis complex showing dead cells in the endovelamen (edv), WIs lumen directed to environment, common exodermis cell (exd) with two layers of secondary wall (s1, s2), vacuolated passage cells (pc) with conspicuous nucleus, mitochondria, ribosomes on an electron-dense matrix and vesicles adjacent to the tonoplast. Scale bars: 25 μ m(A), 50 μ m(B), 10 μ m(C), 3 μ m(D), 5 μ m(E).



What are tilosomes? An update and new perspectives

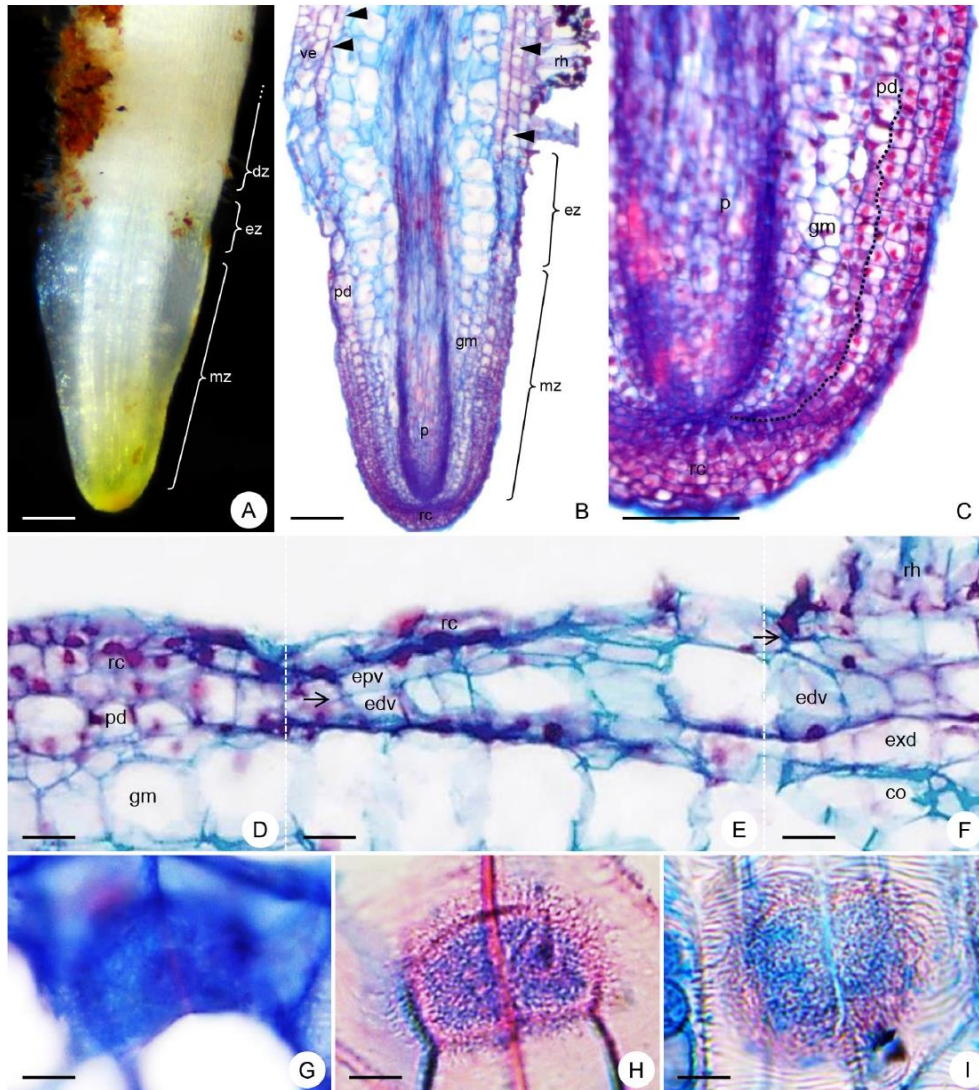


Figure 2. Macro (A) and micromorphology (B-I) of *Anathallis sclerophylla* roots. Longitudinal (B-I) sections of the apex, showing the epidermis and cortex (D-F) and the tilosomes (G-I) development. There are three zones in the apex (A-B): **1.** Meristematic (mz) (C) with isodiametric protodermis cells (pd), ground meristem (gm) of elliptical cells and procambium (p) of fusiform cells (B-C); **2.** Short elongation zone (ez) at the boundary of the root cap (D) with primary walled cells (B); it is characterized by the increase of the cellular volume in the median region of the ground meristem (causing a compression in the exodermis layer (E)), and by the first division of the protodermis originating the endo and epivelamen (edv, epv); **3.** Differentiation zone (dz) (D-F), with a second division in the epivelamen, the development of root hairs (rh) and the progressive tissue specialization (A-B). The tilosome (G) begin as small, papillose-like regions in the inner wall of some endovelamen cells laying adjacent the exodermis passage cells. The secondary wall deposition in these cells follow the orientation of the primary WI (G), leading to the tilosomes or velamen stripes formation (H-I). The dotted line indicates the boundary between protoderm and root cap, and the arrows indicate the velamen cell divisions. Scale bars: 120 μ m (A-B), 50 μ m (C), 25 μ m (D-F), 10 μ m (G-I).



elongation zone of the root apex (Fig. 2A-B, E), we can see that: **1.** the protodermis is exposed to the external environment, once no root cap is observed; **2.** periclinal divisions on the protodermis cells give rise to a multilayered velamen, composed by an epi and endovelamen; **3.** cells of the outer layer of the ground meristem, which give rise to the exodermis, are collapsed due to the rapid grow of the

cortical cells. The protodermal cells that give rise to WI possess a larger nuclear region and fewer vacuoles in the cytoplasm if compared to the ground meristem that gives rise to the root cortex (Fig. 3A-C).

Study of the changes in morphology and wall composition during tilosome development, using light, confocal and transmission microscopy has revealed that

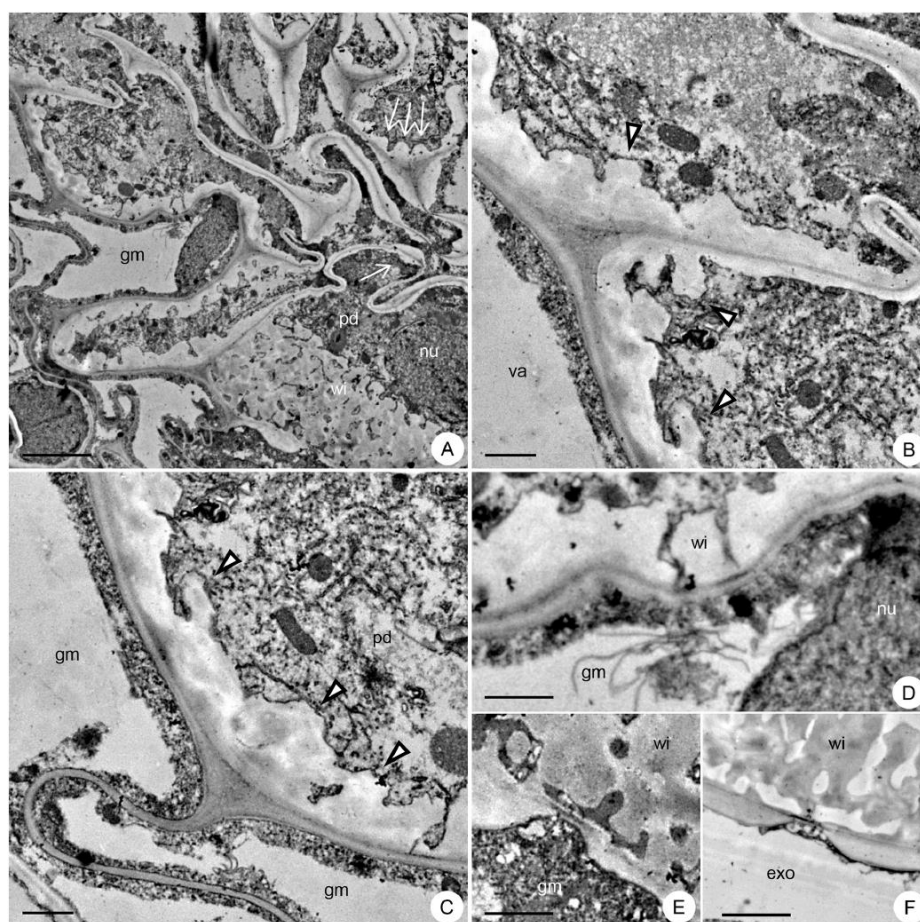


Figure 3. Ultrastructural details of the protodermis and ground meristem during the tilosomes formation in *Anathallis sclerophylla* root. The asynchronous WIs deposition (A) in the inner protodermis layer (dp) is noted by small papillae (arrowhead) of fibrillar material in the inner cell wall adjacent to the ground meristem (gm) (A-C). Each papillae is a precursor of the wall system that characterize the reticulate tilosome. In the outer protodermis layers (A), the cells are poorly vacuolated and vesicles/organelles rich; they possess flange-like projections (arrows) on the walls, that will give rise to the characteristic velamen strips. The protodermis cells that develop walls ingrowth had increased nuclear region (nu) and few vacuoles in the cytoplasm compared to those which give rise to the cortex in ground meristem. The papillae wall synthesis is closely related to the presence of mitochondria and RER (A-C) and to the increase of cell surface. The ground meristem cells possess large vacuolated (va) and thin walls. The limit between the velamen cell walls and tilosome is not visible. Velamen-exodermis are continuous through the tilosome- exodermis (exo) passage cell; these cells possess many plasmodesmata both before (D-E) and after cell differentiation (F) that can or not be occluded by callose. Scale bars: 5 μ m(A), 2 μ m(F), 1 μ m(B, C, D, E).

What are tilosomes? An update and new perspectives

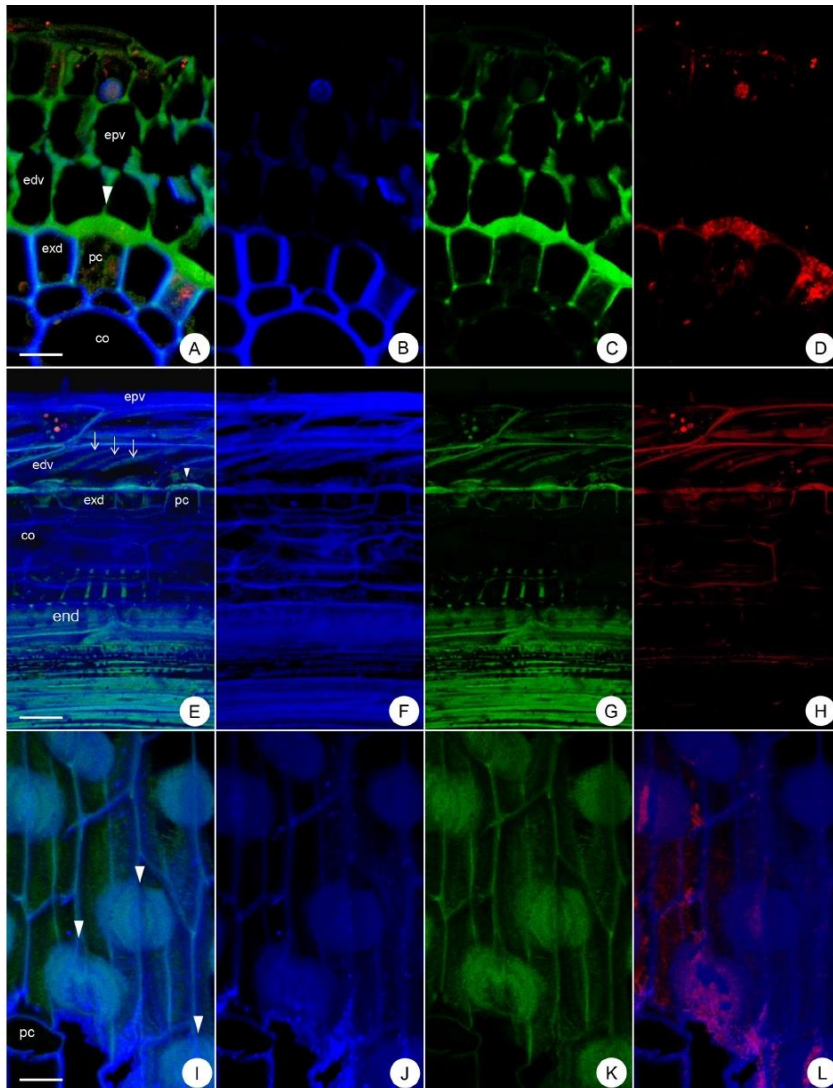


Figure 4. Three-dimensional z-stack reconstructions of cross (A-D), and longitudinal (E-L) sections of *Anathallis sclerophylla* roots stained with calcofluor (A-D) and aniline blue (E-L) fluorophores, in order to demonstrate the wall compositions. Cellulose (A-B) and callose (E, G) shown in blue and lignin in green (C, G, K) are the main walls constituents, although waxes could also be evidenced by autofluorescence when excited by low intensity red light in argon diode (D, H, L). By intense fluorescence, cellulose can be observed in cortical parenchyma (co) and in "O"-thickened cells of exodermis (ex), except for the outer periclinal wall of the passage cells (A-B). Lignin is found in endovelamen (edv), velamen stripes (arrow) (A), tilosomes (arrowhead) (C), "∩"-thickened exodermis cells (C, G), intercellular spaces of outer cortical parenchyma (C), spiral thickenings of internal cortical parenchyma (G), endodermis (en) and vascular cylinder (E, G). Callose occurs in all cell walls, with the highest concentration in the epivelamen (epv) (E-F), in the plasmodesmata around the tilosomes (J) and in the inner layer of the cortical parenchyma including endodermis (F). Waxes (suberin and cutin) occur in a smaller quantity when compared to the fluorescence of other polymers; it is concentrated in the outer layers of the velamen (D, H) but it is diffuse in the tilosomes (D), in the "∩"-thickened exodermis cells, intercellular spaces of the cortical parenchyma, endodermis and phloem (H). Note the occurrence of infections by algae and fungi. Scale bars: 30µm (E-H), 15µm (A-D), 10µm (I-L).



the papillary shape of the tilosomes at early development stages, are similar to those of the wall-membrane-apparatus of cotyledon TCs in *Vicia faba* (Gunning & Pate 1969; Offler *et al.* 2002). Its cellulosic composition may contribute to the out/inward transport over the root peripheral region that is in contact with the external medium and spatially distant from the vascular cylinder. Offler *et al.* (2002) argues that TC differentiation is strongly related both to the organ development stage and to the availability of solutes. When the tilosome WI is deposited, in the roots of *A. sclerophylla*, both the xylem and phloem are differentiated and thus able to perform transport in the elongation zone. As the cells differentiate the papillae (Fig. 2G-I), the velamen cell stripes and the exodermis cells undergo a progressive lignification (Fig. 4C, G, K), assisting the epidermal and exodermis cells to maintain their shape. The physiological properties of lignin (mechanical support, compressive strength and plant defense) (Zeier *et al.* 1999) support this interpretation. If so, the lignin is synthesized as a response to the potential collapse of the exodermis cells, in order to maintain the shape and volume of both the cortex and velamen cells. Benzing (1986) also pointed out that the lignified velamen and cortex cells are essential to prevent collapse and maintain the shape of aerial roots exposed to desiccation.

Callose is usually deposited in specialized walls (Chen & Kim 2009) during the division, growth and differentiation of plant cells (Vatén *et al.* 2011) and can also appear in the plasmodesmata to regulate the cell-to-cell transport (Xie *et al.* 2012; Cui & Lee 2016). In the root of *A. sclerophylla*, callose occurs in the cell walls of the outer velamen layers and tilosomes, in the plasmodesmata between exodermis-velamen and endodermis-cortical parenchyma cells (Fig. 4E-F, I-J). Callose deposition can be induced by injury, pathogen infections, presence of chitin and chitosan, presence of aluminum, ABA and salicylic acid (Luna *et al.* 2011; Nedukha 2015). There is an antagonism between the presence of callose and symplastic transport as this transport considerably decreases after callose is deposited (Lee & Lu 2011). However, callose can be degraded, thereby reestablishing normal transport via the plasmodesmata opening. There is less or no callose deposition on the tilosomes plasmodesmata when compared to the adjacent flange walls (Fig. 4I-J). This indicates that these regions are capable of transport via the symplast.

Waxes, such as suberin and cutin (Nawrath 2002), are deposited on the cell wall of both aerial and underground plant organs. They reduce water loss and the penetration of incident UV, impose a barrier to apoplastic transport (Schreiber 2010) and protecting tissues against extreme temperatures, pathogens and herbivores (Ingram & Nawrath 2011). The presence of a suberized lamella in the exodermis and endodermis cells, as evidenced in *A. sclerophylla* by autofluorescence under red laser (Fig. 4D, H, L), is very common (Enstone *et al.* 2003; Schreiber & Franke 2011).

The occurrence of hydrophobic compounds in the tilosomes and velamen cell walls may be related to an absence of root cap, to a protection against photooxidation (Chomicki *et al.* 2015) and to the retention of water inside the organ. Cutin is also involved in the recognition of symbiotic hyphae (Murray *et al.* 2013), required for seed germination and for the establishment of the protocorm and seedling. In tangential view, we noticed gaps in the distribution of fat compounds in the inner periclinal walls of the endovelamen, specifically inside the tilosome (Fig. 2L), indicating water permeable regions.

After the complete root differentiation and expansion (Fig. 1), the velamen cells degenerate remaining leaving only the secondary walls and tilosomes connecting the thin walled exodermis passage cells to the environment. The velamen cells lack protoplasts, the lumen of tilosomes is reduced (Fig. 3F) due to their labyrinthine wall systems (Fig. 1C-F) and they are connected to the exodermis passage cells via plasmodesmata (Fig. 4J). The passage cells are small (Fig. 1B) and covered by primary walls at their anticlinal and inner periclinal sides (Fig. 1A), with a thin layer of irregular secondary wall on the outer periclinal side (Fig. 1E). They possess a conspicuous nucleus and vacuole that together limit the cytoplasm to the cell margin (Fig. 1E-F). The remaining exodermal cells, dead at maturity, are completely covered by secondary walls (Fig. 1F). The tilosome walls are seen to be impregnated with lignin as revealed by a positive reaction to toluidine blue (Fig. 1B) and to acidified phloroglucinol.

Updating the interpretation of tilosomes

Tilosome originate as cellulosic papillae in cells of the inner layer of the stratified protodermis, adjacent to the exodermis passage cells. The exodermis does not participate in the WI deposition. Tilosomes probably have two functional phases: in young tissues, they increase the symplast connection, facilitating transport over the outer root regions, like the wall-membrane apparatus of TC; while, in mature tissues, they protect, direct solutes to the passage cells, imposing a physicochemical barrier for pathogens and recognizing symbionts. The structure of tilosomes is related to biotic and abiotic factors: cellulose forms the thin primary wall, lignin gives support, waxes acts in water retention and organ defence and callose regulates transport in the symplastic sites. Although the function of water supply and balance is widely accepted for the tilosomes (Engard 1944; Dycus & Knudson 1957; Sandford & Adanlawo 1973; Pridgeon *et al.* 1983; Zotz & Winkler 2013), the velamen cells are not interpreted as TC. It seems reasonable, since epidermal cells are alive when young and thus able to transport solutes; only when mature, the velamen cells form a saturated microclimate providing condensation and retention of atmospheric water through the WI hygroscopic and contact surfaces.



What are tilosomes? An update and new perspectives

The morphology of the reticulate and flange TC WIs are identical to those of the tilosomes (Pridgeon *et al.* 1983) and velamen stripes (Sandford & Adanlawo 1973), corroborating the hypothesis of a dual physiological function. Two patterns of TC WIs are recognized (Talbot *et al.* 2002; McCurdy *et al.* 2008): the flange pattern, with curvilinear, rib-shaped non lignified projections that are more or less parallel, often bifurcated and fused that give rise to secondary wall ridges; and the reticulate pattern, that is a labyrinthine network of tubular projections, that start as small papillae emerging from the underlying wall at discrete loci (Talbot *et al.* 2001). These differences are related to the cytoskeleton. In the reticulate type, the WI coincides with the accumulation of actin filaments amongst the disordered microtubules arrangement; the rosettes concentration at specific points determines its cylindrical shape. The flange pattern originates by a cellulose deposition in parallel with the cytoplasm microtubules (Talbot *et al.* 2001; 2007a; b; Thompson *et al.* 2001). What distinguishes these two types of WIs in TC (flange or reticulate) is the presence or not of direct contact of the cell wall along its entire length, instead of the tilosomes architecture (Pridgeon 1983; Pridgeon *et al.* 1983). The lignification and, more importantly, the death of the velamen cells caused by aerial environment make this structure unique among those that possess WI keeping cells always alive.

Conclusion

New perspectives

Within the "Next-Generation Sequencing blast", the lack of information on the genetic mechanisms controlling tilosome formation should encourage comparison of the genomics of orchids with and without tilosomes, in order to clarify which gene(s) are being expressed in different root zones or tissues and to investigate how this control occurs. In this context, some questions remain unanswered such as: is the tilosome a phenotypic feature always expressed? When did this genetic expression appear, during subtribe history? Are there differences in the transport rate between root zones, tissues and roots with and without tilosomes? Studies on wall development and composition are of interest especially in tilosomes and other structures which depend on the oriented wall deposition. Disregarding easy serial sectioning, orchid roots are excellent models for cellular morphological and developmental studies, since they are easy to grow, to obtain, and to maintain under different stress conditions. Aseptic media, water supply, light or ionic stress and inoculations could delimit experiments designed to evaluate which factors interfere on the tilosomes development and to describe the occurrence of morphohistochemical and cytological alterations of roots under treatments. Essays using cellulose-synthase / callose-synthase / lignin-inhibiting

drugs, hydrogen peroxide, chitosan, phytohormones, gene inactivation and cytoskeleton label may also be used to increase understanding of the mechanisms underlying wall structuring. Researches with labeled isotopes could reveal the physiology of transport (in or out) in young root tissues. Analyzes using light, transmission, scanning and confocal microscopy are indispensable to monitor the development, histochemical composition and the three-dimensional morphology of wall ingrowths occurring in orchid roots.

Acknowledgements

We wish to thank Prof. Edwin W. Taylor, School of Biosciences, University of Birmingham, UK for his helpful assessment of our manuscript and Dra. Silvia Rodrigues Machado, UNESP, Botucatu, for her critical suggestions. HR Kedrovski thanks CAPES and MG Sajo thanks CNPq for your fellowships.

References

- Andreota RC, Barros F, Sajo MG. 2015. Root and leaf anatomy of some terrestrial representatives of the Cranichideae tribe (Orchidaceae). *Brazilian Journal of Botany* 38: 367-378.
- Arun-Chinnappa KS, McCurdy DW. 2016. Identification of candidate transcriptional regulators of epidermal transfer cell development in *Vicia faba* cotyledons. *Frontiers in Plant Science* 4: 1-12.
- Arun-Chinnappa KS, Nguyen TTS, Hou J, Wu Y, McCurdy DW. 2013. Phloem parenchyma transfer cells in *Arabidopsis* - an experimental system to identify transcriptional regulators of wall ingrowth formation. *Frontiers in Plant Science* 4: 1-6.
- Benzing DH. 1986. The vegetative basis of vascular epiphytism. *Selbyana* 9: 23-43.
- Benzing DH. 1990. *Vascular epiphytes: General biology and related biota*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Benzing D, Ott D, Friedman W. 1982. Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen-exoderm complex. *American Journal of Botany* 69: 608-614.
- Bozzola JJ, Russell LD. 1999. *Electron microscopy: Principles and techniques for biologists*. Boston, Jones and Bartlett Publishers
- Bukatsch F. 1972. *Bermerkungen zur Dopelfärbung Astrablau-Safranin*. *Mikrokosmos* 61: 255.
- Burr B, Barthlott W. 1991. On a velamen-like tissue in the root cortex of orchids. *Flora* 185: 313-323.
- Cabrera J, Barcala M, Fenoll C, Escobar C. 2014. Transcriptomic signatures of transfer cells in early developing nematode feeding cells of *Arabidopsis* focused on auxin and ethylene signaling. *Frontiers in Plant Science* 5: 1-9.
- Carlsward BS, Stern WL, Bytbeier B. 2006. Comparative vegetative anatomy and systematics of the angraecoids (Vandaeae, Orchidaceae) with an emphasis on the leafless habit. *Botanical Journal of the Linnean Society* 151: 165-218.
- Chatin AG. 1856. *Anatomie des plantes aeriennes de l'ordre des Orchidees, 1, Memoire: Anatomie des racines*. *Mémoires de la Société des Sciences Naturelles de Cherbourg* 4: 5-18.
- Chen XY, Kim JY. 2009. Callose synthesis in higher plants. *Plant Signaling & Behavior* 4: 489-492.
- Chomicki G, Bidet LP, Ming F, *et al.* 2015. The velamen protects photosynthetic orchid roots against UV-B damage, and a large dated phylogeny implies multiple gains and losses of this function during the Cenozoic. *New Phytologist* 205: 1330-1341.



- Cui W, Lee JY. 2016. Arabidopsis callose synthases CalS1/8 regulate plasmodesmal permeability during stress. *Nature Plants* 16034: 1-9.
- Dycus AM, Knudson L. 1957. The role of the velamen of the aerial roots of orchids. *Botanical Gazette* 119: 78-87.
- Engard CJ. 1944. Morphological identity of the velamen and exoderm in orchids. *Botanical Gazette* 105: 457-462.
- Enstone DE, Peterson CA, Ma F. 2003. Root endoderm and exoderm: structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 335-351.
- Feder N, O'Brien TP. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* 55: 123-142.
- Fernandez-García N. 2009. Role of phi cells and the endoderm under salt stress in *Brassica oleracea*. *New Phytologist* 181: 347-360.
- Figueroa C, Salazar GA, Zavaleta HA, Engleman EM. 2008. Root character evolution and systematics in Cranichidinae, Prescottinae and Spiranthinae (Orchidaceae, Cranichideae). *Annals of Botany* 101: 509-520.
- Fineran BA. 1998. Flange cells: a review. In: Bhatia B, Shkula AK, Sharma HL. (eds.) *Plant form and function*. New Delhi, Angkor Publishers. p. 111-132.
- Fineran BA, Calvin CL. 2000. Transfer cells and flange cells in sinkers of the mistletoe *Phoradendron macrophyllum* (Viscaceae), and their novel combination. *Protoplasma* 211: 76-93.
- Gama TSS, Aguiar-Dias ACA, Damaceno D. 2016. Transfer cells in trichomatous nectary in *Adenocalymma magnificum* (Bignoniaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 88: 527-537.
- Gunning BES, Pate JS. 1969. "Transfer cells" plant cells with wall ingrowths, specialized in relation to short distance transport of solutes: their occurrence, structure, and development. *Protoplasma* 68: 107-133.
- Idris NA, Collings DA. 2015. The life of phi: the development of phi thickenings in roots of the orchids of the genus *Miltoniopsis*. *Planta* 241: 489-506.
- Ingram G, Nawrath C. 2011. The roles of the cuticle in plant development: organ adhesions and beyond. *Journal of Experimental Botany* 68: 5307-5321.
- Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. New York, McGraw Hill Book.
- Karremans AP. 2016. Genera Pleurothallidinarum, An updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. *Lankesteriana* 16: 219-241.
- Kraus JE, Arduin M. 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro, Seropédica.
- Lee JY, Lu H. 2011. Plasmodesmata: the battleground against intruders. *Trends in Plant Science* 16: 201-210.
- Leroux O, Bagniewska-Zadworna A, Rambe SK, et al. 2011. Non-lignified helical cell wall thickenings in root cortical cells of Aspleniaceae (Polypodiales): histology and taxonomical significance. *Annals of Botany* 107: 195-207.
- Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J. 2011. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular Plant Microbe Interact* 24: 183-193.
- McCurdy DW, Patrick JW, Offer CE. 2008. Wall ingrowth formation in transfer cells: novel examples of localized wall deposition in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 653-661.
- Melo HC. 2011. Espessamento em fi de parede celular. *Hoehnea* 38: 1-7.
- Miyashita N, Koga H. 2017. Three-dimensional ultrastructure of feeding tubes and interconnected endoplasmic reticulum in root-knot nematode-induced giant cells in rose balsam. *Protoplasma* 254: 941-951.
- Monjardino P, Rocha S, Tavares AC, et al. 2013. Development of flange and reticulate wall ingrowths in maize (*Zea mays* L.) endosperm transfer cells. *Protoplasma* 250: 495-503.
- Murray JD, Cousins DR, Jackson KJ, Liu C. 2013. Signaling at the root surface: The role of cutin monomers in mycorrhization. *Molecular Plant* 6: 1381-1383.
- Nawrath C. 2002. The biopolymers cutin and suberin, The Arabidopsis Book. *American Society of Plant Biologists* 1: e0021. doi: 10.1199/tab.0021
- Nedukha OM. 2015. Callose: Localization, functions, and synthesis in plant cells. *Cytology and Genetics* 49: 49-57.
- Nguyen STT, McCurdy DW. 2017. Wall ingrowth deposition in phloem parenchyma transfer cells in *Arabidopsis*: heteroblastic variations and a potential role in pathogen defence. *Plant Signaling & Behavior* 12: 1-15.
- Nguyen ST, Greaves T, McCurdy DW. 2017. Heteroblastic development of transfer cells is controlled by the microRNA miR156/SPL Module. *Plant Physiology* 173: 1676-1691.
- Offer CE, McCurdy DW, Patrick JW, Talbot MJ. 2002. Transfer cells: cells specialized for a special purpose. *Annual Review of Plant Biology* 54: 431-454.
- Oudemans C. 1861. Ueber den Sitz der Oberhaut bei den Luftwurzeln der Orchideen. *Verh Kon Ned Akad Wetensch* 9: 1-32.
- Pedroso-de-Moraes C, Souza-Leal TD, Brescansin RL, Pettini-Benelli A, Sajo MG. 2012. Radicular anatomy of twelve representatives of the Catasetinae subtribe (Orchidaceae: Cymbidieae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 84: 455-467.
- Porembski S, Barthlott W. 1988. Velamen radicum micromorphology and classification of Orchidaceae. *Nordic Journal of Botany* 8: 117-137.
- Pridgeon AM. 1983. The velamen and exoderm of orchid roots. In: Arditti K. (ed.) *Orchid biology, reviews and perspectives*. Ithaca, Cornell University Press. p. 139-192.
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen F. 1999. *Genera Orchidacearum*. Vol. 1: General Introduction, Apostasioideae and Cyripedioideae. Oxford, Oxford University Press.
- Pridgeon AM, Stern WL, Benzing DH. 1983. Tilosomes in roots of Orchidaceae: morphology and systematic occurrence. *American Journal of Botany* 70: 1365-1377.
- Reynolds ES. 1963. The use of the lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 17: 208-212.
- Rocha S, Monjardino P, Mendonça D, et al. 2014. Lignification of developing maize (*Zea mays* L.) endosperm transfer cells and starchy endosperm cells. *Frontiers in Plant Science* 5: 102-112.
- Sandford WW, Adanlawo I. 1973. Velamen and exoderm characters of West African epiphytic orchids in relation to taxonomic grouping and habitat tolerance. *Botanical Journal of the Linnean Society* 66: 307-321.
- Schreiber L. 2010. Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in Plant Science* 15: 546-553.
- Schreiber L, Franke RB. 2011. Endoderm and exoderm in roots. In eLS. Chichester, John Wiley and Sons.
- Silva IV, Meira RMSA, Azevedo AA. 2010. Anatomia de raízes de espécies de Orchidaceae do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Minas Gerais. *Hoehnea* 37: 147-161.
- Silva IV, Oliveira RM, Rossi AAB, Silva AB, Oliveira DM. 2015. Use of anatomical root markers for species identification in *Catasetum* (Orchidaceae) at the Portal da Amazônia region, MT, Brazil. *Acta Amazônica* 45: 21-28.
- Stern WL. 2014. *Anatomy of the monocotyledons* Vol. X: Orchidaceae. Oxford, Oxford University Press.
- Stern WL, Carlswald BS. 2009. Comparative vegetative anatomy and systematics of Laelliinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 160: 21-41.
- Stern WL, Judd WS. 2001. Comparative anatomy and systematics of Catasetinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 136: 153-178.
- Stern WL, Judd WS. 2002. Systematic and comparative anatomy of Cymbidieae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 139: 1-27.
- Stern WL, Judd WS, Carlswald BS. 2004. Systematic and comparative anatomy of Maxillarieae (Orchidaceae), sans Oncidiinae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 144: 251-274.
- Talbot MJ, Franceschi VR, McCurdy DW, Offer CE. 2001. Wall ingrowth architecture in epidermal transfer cells of *Vicia faba* cotyledons. *Protoplasma* 215: 191-203.
- Talbot MJ, Offer CE, McCurdy DW. 2002. Transfer cell wall architecture: a contribution towards understanding localized wall deposition. *Protoplasma* 219: 197-209.



What are tilosomes? An update and new perspectives

- Talbot MJ, Wasteneys G, McCurdy DW, Offler CE. 2007a. Deposition patterns of cellulose microfibrils in flange wall ingrowths of transfer cells indicate clear parallels with those of secondary wall thickenings. *Functional Plant Biology* 34: 307-313.
- Talbot MJ, Wasteneys GO, Offler CE, McCurdy DW. 2007b. Cellulose synthesis is required for deposition of reticulate wall ingrowths in transfer cells. *Plant Cell Physiol* 48: 147-158.
- Thompson RD, Hueros G, Becker H, Maitz M. 2001. Development and functions of seed transfer cells. *Plant Science* 160: 775-783.
- Tozin LRS, Rodrigues TM. 2017. Morphology and histochemistry of glandular trichomes in Lamiaceae. *Acta Botanica Brasilica* 31: 330-343.
- Vatén A, Dettmer J, Wu S, *et al.* 2011. Callose biosynthesis regulates symplastic trafficking during root development. *Developmental Cell* 21: 1144-1155.
- Wilson H, Mycock D, Weiersbye IM, Wilson H. 2017. The salt glands of *Tamarix usneoides* E. Mey, ex Bunge (South African Salt Cedar). *International Journal of Phytoremediation* 19: 587-595.
- Xie B, Deng Y, Kanaoka MM, Okada K, Hong Z. 2012. Expression of Arabidopsis callose synthase 5 results in callose accumulation and cell wall permeability alteration. *Plant Science* 183: 1-8.
- Zeier J, Ruel K, Ryser U, Schreiber L. 1999. Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta* 209: 1-12.
- Zotz G, Winkler U. 2013. Aerial roots of epiphytic orchids, the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. *Oecologia* 171: 733-741.
- Zotz G. 2016. *Plants on plants - The biology of vascular epiphytes*. Berlin, Springer.



APÊNDICES

Apêndice 1. Matriz de presença ou ausência. Caracteres:

- (1) Velame uniestratificado
- (2) Velame biestratificado
- (3) Velame com tres camadas
- (4) Velame com quatro camadas
- (5) Velame com cinco camadas
- (6) Tilossomos
- (7) Exoderme fina
- (8) Exoderme espessada em "O"
- (9) Exoderme espessada em "U"
- (10) Exoderme espessada em "∩"
- (11) Parênquima cortical com 3 a 4 camadas
- (12) Parênquima cortical com 5 a 6 camadas
- (13) Parênquima cortical com 7 a 8 camadas
- (14) Parênquima cortical com 9 ou mais camadas
- (15) Parênquima cortical homogêneo
- (16) Parênquima cortical heterogêneo
- (17) Periciclo uniestratificado
- (18) Periciclo estratificado
- (19) 3 a 5 arcos de protoxilema
- (20) 6 a 8 arcos de protoxilema
- (21) 9 ou mais arcos de protoxilema
- (22) Medula parenquimática
- (23) Medula esclerificada

Status: (1) Presente, (0) Ausente.

Táxon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
<i>Acianthera crinita</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Acianthera glanduligera</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Acianthera glumacea</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
<i>Acianthera karlii</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
<i>Acianthera ochreatea</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
<i>Acianthera recurva</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
<i>Acianthera sonderiana</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Acianthera sonderiana</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Acianthera strupifolia</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
<i>Acronia culpameae</i>	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Acronia pyelophera</i>	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Anathallis liparanges</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Anathallis spiculifera</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
<i>Andinia dielsii</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>Andinia pendens</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
<i>Andinia schizopogon</i>	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
<i>Barbosella australis</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Barbosella cogniauxiana</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
<i>Barbosella cucullata</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
<i>Barbosella gardneri</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
<i>Barbosella gardneri</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
<i>Dracula bella</i>	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1

Táxon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
<i>Dracula mopsus</i>	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
<i>Dresslerella caesariata</i>	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Dresslerella lasiocampa</i>	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Dryadella atalaiensis</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
<i>Dryadella aviceps</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>Dryadella edwallii</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>Dryadella lilliputiana</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>Dryadella simula</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>Dryadella sp.</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>Echinosepala shuarii</i>	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
<i>Echinosepala uncinata</i>	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
<i>Kraenzlinella lappago</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
<i>Lepanthes calodictyon</i>	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
<i>Lepanthopsis floripecten</i>	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
<i>Lepanthopsis ubangii</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
<i>Masdevallia infracta</i>	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
<i>Masdevallia norae</i>	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
<i>Masdevallia pteroglossa</i>	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
<i>Madisonia kerrii</i>	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Myoxanthus exasperatus</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
<i>Octomeria concolor</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
<i>Octomeria fialhoensis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Octomeria grandiflora</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
<i>Pabstiella bacillaris</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
<i>Pabstiella carinifera</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
<i>Pabstiella fusca</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
<i>Pabstiella sordida</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Phloeophila nummularia</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
<i>Phloeophila pleurothalloopsis</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Platystele misera</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>Platystele muscicola</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>Platystele stellaris</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
<i>Pleurothalloopsis nemorosa</i>	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Porroglossum amethystinum</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
<i>Porroglossum dalstroemii</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
<i>Porroglossum muscosum</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
<i>Restrepia aspasicensis</i>	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Restrepia brachypus</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
<i>Sansonia bradei</i>	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Sansonia vandenberghii</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
<i>Scaphosepalum bicristatum</i>	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Scaphosepalum microdactylum</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
<i>Scaphosepalum rapax</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1

Táxon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
<i>Specklinia grobyi</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
<i>Specklinia subpicta</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>Stelis argentata</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
<i>Stelis deregularis</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
<i>Stelis intermedia</i>	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
<i>Stelis intermedia</i>	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
<i>Stelis papaquerensis</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Stelis pauciflora</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Trichosalpinx arbuscula</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>Trichosalpinx berlineri</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>Trichosalpinx memor</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
<i>Trisetella regia</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	?	?	?	?	?	?	1	0	1	0	0	0	1
<i>Trisetella triglochin</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	?	?	?	?	?	?	1	0	1	0	0	0	1
<i>Zootrophion dayanum</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
<i>Zootrophion dodsonii</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
<i>Zootrophion griffin</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Zootrophion hirtzii</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1

Apendice 2. Tabela de caracteres multiestado

1. Camadas do velame: (0) uniestratificada, (1), biestratificada, (2) três camadas, (3) quatro camadas, (4) cinco camadas
2. Exoderme: (0) fina, (1) espessada em "O", (2) espessada em U, (3) espessada em "∩"
3. Camadas do córtex: (0) 3 a 4 camadas, (1) 5 a 6 camadas, (2) 7 a 8 camadas, (3) mais que 9 camadas
4. Tipo de parênquima cortical: (0) homogêneo, (1) heterogêneo
5. Periciclo: (0) uniestratificado, (1) biestratificado
6. Número de arcos de protoxilema: (0) 3 a 5 arcos, (1) 6 a 8 arcos, (2) 9 ou mais arcos
7. Medula: (0) parenquimática, (1) esclerificada