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

**CARACTERES VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS E DESENVOLVIMENTO
PÓS-SEMINAL EM BROMELIACEAE**

KLEBER RESENDE SILVA

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

**RIO CLARO/SP
Novembro - 2018**

KLEBER RESENDE SILVA

**CARACTERES VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS E DESENVOLVIMENTO PÓS-
SEMINAL EM BROMELIACEAE**

Orientadora: Profa. Dra. Aline Oriani

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo M. Versieux

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

Rio Claro – SP

2018

S586c Silva, Kleber Resende
Caracteres vegetativos e reprodutivos e
desenvolvimento pós-seminal em Bromeliaceae / Kleber
Resende Silva. -- Rio Claro, 2018
102 f. : il., tabs., fotos

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

1. Anatomia. 2. Envoltório seminal. 3. Campos
rupestres. 4. Germinação. 5. Plântula. 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: CARACTERES VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS E DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL EM BROMELIACEAE

AUTOR: KLEBER RESENDE SILVA

ORIENTADORA: ALINE ORIANI MAGANHATO

COORIENTADOR: LEONARDO DE MELO VERSIEUX

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



Profa. Dra. ALINE ORIANI MAGANHATO

Pós Doutoranda do Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



Profa. Dra. VERA LUCIA SCATENA

Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



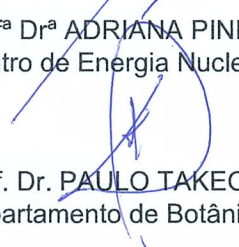
Profa. Dra. DANIELA GUIMARÃES SIMÃO

Departamento de Biologia / Centro de Ciências Naturais e Exatas / Universidade Federal de Santa Maria - RS



Profª Drª ADRIANA PINHEIRO MARTINELLI

Centro de Energia Nuclear na Agricultura / CENA/USP


Prof. Dr. PAULO TAKEO SANO

Departamento de Botânica / Universidade de São Paulo

Rio Claro, 29 de novembro de 2018

*Com carinho, à minha família e amigos
e gratidão àqueles que me incentivaram e abriram portas*

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Obteve-se também financiamento pelo DAAD (Co-financed Short-Term Research Grant Brazil, 2017) para realização de estágio no exterior (Ruhr Universität Bochum, Alemanha).

Agradeço à Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Câmpus de Rio Claro e ao Departamento de Botânica do Instituto de Biociências pela infraestrutura concedida. Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal), professores e funcionários. À Profa. Dra. Alessandra Ike Coan que foi coordenadora do PPG da data do meu ingresso até meados do doutorado e ao Prof. Dr. Douglas Silva Domingues atual coordenador desse PPG. À Celinha Hebling, secretária do Departamento de Botânica e a todos os funcionários da Seção de Pós-Graduação. Agradeço a Ruhr Universität Bochum, Alemanha, pela infraestrutura concedida durante estágio no exterior e também aos funcionários do Welcome Centre desta universidade por todo o suporte com os procedimentos burocráticos e pelas atividades integrativas promovidas aos estudantes de outros países.

À minha orientadora, Dra. Aline Oriani, o meu muito obrigado por aceitar me orientar, me incentivar sempre, sua amizade e confiança, compartilhando do seu tempo e conhecimento, contribuindo à minha formação profissional e pessoal. Ao meu coorientador, Dr. Leonardo Versieux pelo incentivo, por contribuir na elaboração do projeto de pesquisa, pelas dicas, sugestões e suporte sempre que solicitados, e auxílio em campo durante expedições de coleta na Chapada Diamantina, Bahia. Agradeço também à Profa. Dra. Daniela Guimarães Simão, minha professora na graduação e orientadora no mestrado, por toda sua dedicação, amizade, sabedoria e empenho durante minha formação. Ao Prof. Dr. Denis Coelho de Oliveira do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia por abrir as portas do seu laboratório e auxiliar com as análises imunohistoquímicas. Também agradeço ao Prof. Dr. Thomas Stützel por me supervisionar durante o estágio na Alemanha, providenciando todas as medidas para minha chegada e estadia, e a todos do seu departamento, em especial à Sabine Adler, Petra Lerch, Christoph Elpe e Julian Herting por todas as dicas e informações, paciência e auxílio. Vielen danke! Também agradeço ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ/USP pelo uso do microscópio eletrônico de varredura durante a execução dos capítulos 1 e 2 dessa tese.

Aos membros da banca pela disponibilidade e pelas contribuições.

Ao Prof. Dr. Paulo Sano pelo auxílio em campo e pelos momentos divididos em Diamantina, Minas Gerais.

Agradeço aos meus amigos e colegas, em especial à Kaire pela amizade desde a graduação, sempre ajudando e contribuindo; à Ana Angélica, Arthur, Blanca, Fernanda, Gisele, Letícia, Lucimara (Mara), Luís, Mariana, Naiara, Paula, Rafael e Thales, pela troca de vivências, convívio em laboratório e por estarem dispostos a ajudar. Ao Marcos pelo auxílio na coleta de material botânico e pela troca de informações. À Ester pelas aulas de inglês, contribuindo com meu aprendizado. Ao André pelo apoio sempre, dedicação e por estar sempre torcendo por mim. Ao Bernardo (que inclusive auxiliou na coleta de materiais na Serra do Cipó) e Danilo, que mesmo a distância, sempre me ajudaram e dedicaram do seu tempo para dar conselhos pessoais e profissionais. À Deicy, Laiza e Watson pela amizade e por estarem sempre torcendo por mim. Ao Helson e Missiani por toda a ajuda, amizade e troca de vivências em Bochum. À Carla que também me ajudou em Bochum, antes e durante a minha estadia. À minha família, especialmente aos meus pais e irmãos, pelo amor incondicional, por me apoiarem e se preocuparem comigo. Lembrarei com carinho de todos os momentos compartilhados.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher (Cora Coralina)”. Ainda tenho o que caminhar, semear e colher, e levo comigo um pouco de todos, que de forma direta ou indireta, contribuíram à minha formação e a quem sou grato por mais essa etapa da minha vida.

“O sentido da vida é um sentimento.”

(Rubem Alves)

RESUMO

Análises filogenéticas apontam Bromeliaceae como uma família monofilética e basal dentre as Poales. Contudo, a sistemática enfrenta dificuldades quanto ao estabelecimento de gêneros e espécies. Caracteres anatômicos, especialmente das folhas, têm sido utilizados na sistemática, taxonomia e para entender respostas ao ambiente. Já entre os órgãos reprodutivos, as sementes e os frutos são importantes para o reconhecimento de suas subfamílias. Bromelioideae é uma das subfamílias com divergência mais recente, apresentando frutos do tipo baga e sementes com envoltório mucilaginoso, o que difere da maioria das demais subfamílias, que possuem frutos do tipo cápsula e sementes aladas ou plumosas. Essa tese teve como objetivos identificar caracteres anatômicos de órgãos vegetativos e do eixo da inflorescência úteis para resolver dois complexos de espécies (*Neoregelia bahiana* – Bromelioideae, e *Vriesea oligantha* – Tillandsioideae), devido à variação morfológica de seus representantes; avaliar a germinação, anatomia de sementes e desenvolvimento pós-seminal de *N. bahiana* para entender adaptações e características do desenvolvimento relacionadas ao estabelecimento das plântulas; elucidar a ontogênese de frutos carnosos em espécies de Bromelioideae, relacionando sua estrutura a características do desenvolvimento das sementes para um melhor entendimento de aspectos funcionais. Dentre os caracteres vegetativos, a anatomia foliar e a arquitetura da planta são importantes para o reconhecimento de populações, indicando a presença de mais de um táxon em cada complexo. A germinação em *N. bahiana* inicia-se com o desenvolvimento da raiz primária e do hipocótilo. O cotilédone permanece preso ao endosperma no interior das sementes (hiperfilo haustorial) até o estabelecimento das plantas jovens. Cotilédone haustorial e o desenvolvimento da raiz primária por certo período de tempo, indicam maior necessidade nutricional para as plântulas de Bromelioideae. A anatomia dos frutos, formados por tecidos carpelares e não carpelares, que se tornam carnosos e envolvem diversas sementes, caracteriza-os como bagas. A disposição e número de óvulos no ovário estão relacionados com a área disponível nos lóculos para o desenvolvimento das sementes e à presença ou não e comprimento dos apêndices nas sementes. A suculência dos frutos, conferida pelas células do mesocarpo e pela secreção de substâncias no interior dos lóculos pelo obturador, assim como a testa mucilaginosa das sementes, aparecem em estágios posteriores do desenvolvimento e se destacam como estratégias à dispersão zoocórica.

Palavras-chave: anatomia; bagas; envoltório seminal; campos rupestres; germinação; imunohistoquímica; *Neoregelia*; órgãos vegetativos; plântula; *Vriesea*.

ABSTRACT

Phylogenetic analyzes point to Bromeliaceae as a monophyletic and an earlier-diverging family within Poales. However, the systematics faces difficulties in genera and species delimitation. Anatomical characters, especially for the leaves, have been used in systematics, taxonomy and to understand adaptive responses to the environment. Among the reproductive structures, seeds and fruits are important for the recognition of Bromeliaceae subfamilies. Bromelioideae is one of the latest-diverging subfamilies and exhibits berry-type fruits with mucilaginous seeds, different from the majority of the remaining subfamilies which has capsules with winged or plumose seeds. This thesis aimed to identify anatomical characters with taxonomic value in the vegetative organs and inflorescence axis of two species complexes (*Neoregelia bahiana* – Bromelioideae, and *Vriesea oligantha* – Tillandsioideae), due to the great morphological variation of their individuals; to analyse the germination, seed anatomy and the post-seminal development in *N. Bahiana* to understand adaptations and the traits related to seedling establishment; and to elucidate the ontogeny of fleshy fruits in species of Bromelioideae, relating their structure to the seed features and to functional aspects. Among the vegetative characters, the leaf anatomy together with the plant architecture are important to delimit populations, evidencing the presence of more than one taxon in each species complex. The germination in *N. bahiana* occurs by the development of the primary root and hypocotyl. The cotyledon remains attached to endosperm inside the seeds (haustorial hyperphyll) until the establishment of the young plants. This condition together with the development of the primary root for a certain period of time indicate a great nutritional need of the seedlings. The fruit anatomy, showing its formation by carpellary and non-carpellary fleshy tissues with several seeds characterizes it as a true berry. The arrangement and number of ovules in the ovary are related to the available area inside the locule for seed development and to the presence and length of seed appendages. The juiciness of the fruits, given by the mesocarp cells and by secretion of substances inside the locules by the obturator, and the mucilaginous testa of seeds, appear later in the development, and are strategies to dispersal by animals.

Palavras-chave: anatomy; berries; *campos rupestres*; germination; immunohistochemistry; *Neoregelia*; seed coat; seedling; vegetative organs; *Vriesea*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	11
Referências bibliográficas	19
 CAPÍTULO 1. Anatomy of the vegetative organs, inflorescence axis and pedicel in the <i>Neoregelia bahiana</i> complex (Bromeliaceae): taxonomic and ecological importance	25
Abstract.....	26
Introduction	27
Material and methods.....	28
Results.....	29
Discussion.....	33
References.....	42
Illustrations.....	47
Tables.....	66
 CAPÍTULO 2. Variações morfológicas e anatômicas de raiz, folha, eixo da inflorescência e bráctea no complexo <i>Vriesea oligantha</i> (Bromeliaceae): perspectivas para a taxonomia e aspectos adaptativos.....	71
Resumo.....	72
Introdução.....	73
Material e métodos.....	74
Resultados.....	75
Discussão.....	80
Referências.....	86
Ilustrações.....	92

Tabelas.....	106
--------------	-----

CAPÍTULO 3. Aspectos estruturais da semente, germinação e desenvolvimento pós-seminal em <i>Neoregelia bahiana</i> (Bromeliaceae): entendendo o desenvolvimento das plântulas.....	109
--	-----

Resumo.....	110
-------------	-----

Introdução.....	111
-----------------	-----

Material e métodos.....	112
-------------------------	-----

Resultados.....	114
-----------------	-----

Discussão.....	120
----------------	-----

Referências.....	131
------------------	-----

Ilustrações.....	138
------------------	-----

Tabelas.....	158
--------------	-----

CAPÍTULO 4. Seed development and its relation to fruit structure in species of Bromelioideae (Bromeliaceae) with fleshy fruits.....	161
---	-----

Abstract.....	162
---------------	-----

Introduction.....	163
-------------------	-----

Material and methods.....	165
---------------------------	-----

Results.....	165
--------------	-----

Discussion.....	169
-----------------	-----

References.....	174
-----------------	-----

Illustrations.....	178
--------------------	-----

Table.....	198
------------	-----

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	199
---------------------------	-----

INTRODUÇÃO GERAL

Bromeliaceae: morfologia e relações filogenéticas em um panorama atual

Bromeliaceae inclui cerca de 3400 espécies, distribuídas em 58 gêneros que ocorrem, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais da América (LUTHER 2014). *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr. é a única exceção, ocorrendo na África (JACQUES-FELIX 2000). Os representantes de Bromeliaceae crescem em diferentes ambientes e habitats, desde florestas úmidas a campos de altitude, com solos arenosos e pedregosos (SMITH 1934; PITTENDRIGH 1948; RUNDEL; DILLON 1998), o que demonstra grande versatilidade morfológica e ecofisiológica (BENZING 2000). No Brasil, a família está bem representada, com 46 gêneros e 1340 espécies (com pelo menos 1177 espécies endêmicas) relatadas até o momento, ocorrendo em diferentes fitofisionomias dos domínios Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (BFG 2015). O domínio Mata Atlântica se destaca como um dos seus principais centros de diversidade (MARTINELLI ET AL. 2008).

Seus representantes, em geral, são plantas herbáceas, epífitas, rupícolas, ou terrícolas, com raízes absorptivas, por vezes apenas para a fixação (comum em espécies epífitas). O caule pode ser aéreo (geralmente curto), rizomatoso ou estolonífero. As folhas, com margens inteiras ou espinescentes, estão dispostas em roseta, podendo ou não formar um tanque armazenador de água. O eixo da inflorescência, com comprimento variável entre as espécies, geralmente está inserido no interior da roseta, porta inflorescências simples ou compostas, com flores monoclinas, que podem ser sésseis ou pediceladas, protegidas por brácteas. Sépalas e pétalas podem ser livres ou conadas. O androceu é diplostêmone. O gineceu possui estigma trifido e ovário súpero, ínfero ou semi-ínfero, tricarpelar e trilocular, com placentação axilar e nectários septais. Os frutos são do tipo cápsula (na grande maioria das espécies) ou baga e as sementes podem ser aladas ou plumosas nos frutos do tipo cápsula. (SMITH; DOWNS 1974; SMITH; TILL 1998; BENZING 2000). Devido à coloração das folhas e brácteas, e pelo arranjo da inflorescência, grande parte de seus representantes apresenta potencial ornamental (BENZING 2000; SOUZA; LORENZI 2012), como espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav., *Billbergia* Thunb., *Neoregelia* L.B.Sm e *Vriesea* Lindl., estudadas nessa tese.

Do ponto de vista filogenético, a família está incluída em Poales (APG IV 2016) e, em conjunto com Thyphaceae, são as primeiras linhagens divergentes na ordem (BOUCHENAK-KHELLADI ET AL. 2014). Seu status monofilético é sustentado por dados moleculares,

citogenéticos e morfológicos (TOMLINSON 1969; BROWN; GILMARTIN 1989a, b; GIVNISH ET AL. 2007; BENZING 2000). Bromeliaceae foi tradicionalmente dividida em três subfamílias: Bromelioideae, Tillandsioideae e Pitcairnioideae, pela combinação de certos caracteres, como a morfologia da margem da folha, inteira ou espinescente; posição do ovário; tipo de fruto; e morfologia das sementes (SMITH; DOWNS 1974, 1977, 1979; SMITH; TILL 1998). Atualmente, a família encontra-se dividida em oito subfamílias: Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae, a partir de dados moleculares (GIVNISH ET AL. 2007). Isso porque nas análises filogenéticas a subfamília Pitcairnioideae mostrou-se parafilética e, a partir dela, foram criadas novas subfamílias, a fim de tornar os grupos monofiléticos. Nessas análises, Brocchinioideae aparece como grupo irmão das demais subfamílias, enquanto Bromelioideae aparece como uma das linhagens com divergência mais recente. Essas duas subfamílias compartilham flores epíginas, apesar do tipo de fruto ser diferente, cápsula ou baga (SAJO ET AL. 2004; GIVNISH ET AL. 2007).

Segundo GIVNISH et al. (2007) a origem de Bromeliaceae se deu a partir de representantes terrícolas, no Planalto das Guianas, e se expandiu para outras regiões da América do Sul e Central, há cerca de 15 milhões de anos. Durante esse processo ocorreram especializações paralelas nas espécies que ocupam nichos semelhantes, o que pode explicar a similaridade morfológica (como o tanque armazenador de água), fisiológica (como o mecanismo CAM) e de formas de vida (como o epifitismo) observadas em linhagens distintas da família.

Os complexos de espécies Neoregelia bahiana e Vriesea oligantha e a importância de caracteres anatômicos para a taxonomia e ecologia

Apesar de monofilética, Bromeliaceae apresenta problemas de delimitação de gêneros e espécies (SMITH; DOWNS 1974, 1979; BENZING 2000), como se observa para os complexos de espécies *Neoregelia bahiana* (Bromelioideae) e *Vriesea oligantha* (Tillandsioideae), que são endêmicos dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, nos Estados de Minas Gerais e Bahia, no Brasil (VERSIEUX ET AL. 2008; BFG 2015), inclusive com ocorrência simpátrica.

Neoregelia bahiana (Ule) L.B.Sm. apresenta grande variação morfológica (principalmente com relação à forma, coloração e textura das folhas), sendo considerados como seus sinônimos: *Nidularium bahianum* Ule, *Aregelia bahiana* (Ule) Mez, *Neoregelia*

bahiana var. *bahiana* Spruce ex Engl., *Neoregelia bahiana* var. *viridis* L.B.Sm., *Neoregelia bahiana* f. *viridis* (L.B.Sm.) L.B.Sm., *Neoregelia hatschbachii* L.B.Sm., *Neoregelia pabstiana* E.Pereira, *Neoregelia diamantinensis* E.Pereira, *Neoregelia intermedia* E.Pereira e *Neoregelia bahiana* f. *bahiana* (SMITH; DOWNS 1979; LEME 1998; BFG 2015). Todos esses nomes têm intrigado os pesquisadores a respeito de sua identidade como uma única espécie.

Neoregelia foi indicado como um gênero parafilético no estudo de Santos-Silva et al. (2017), que incluiu dados estruturais foliares de gêneros próximos filogeneticamente, a saber: *Canistrum* E.Morren, *Canistropsis* (Mez) Leme, *Edmundoa* Leme, *Nidularium* Lem. e *Wittrockia* Lindm.; todos esses gêneros constituem o complexo Nidularioide (SANTOS-SILVA ET AL. 2017). Desta forma, esforços buscando indicar caracteres diagnósticos para espécies desse gênero são necessários a fim de estabelecer relações filogenéticas mais robustas, ainda mais levando-se em conta as variações estruturais das mesmas em resposta ao ambiente.

Já *Vriesea oligantha* (Baker) Mez em conjunto com outras duas espécies *Vriesea lancifolia* (Baker) L.B.Sm. e *Vriesea pseudoligantha* Philcox compartilham, além de sua distribuição geográfica, caracteres vegetativos, como folhas densamente recobertas por escamas e propagação vegetativa com novos indivíduos se desenvolvendo na base da planta e no seu eixo da inflorescência, e reprodutivos, como a inflorescência simples com flores secundas na antese (SMITH; DOWNS 1977). Dessa forma, a caracterização anatômica de folhas, raiz, eixo da inflorescência e brácteas pode contribuir na delimitação destas espécies, bem como determinar se existem variações intraespecíficas decorrentes do ambiente.

Ressalta-se que caracteres anatômicos vegetativos, principalmente das folhas, já foram abordados em vários estudos com representantes de Bromeliaceae, os quais trouxeram resultados relevantes para a taxonomia, contribuindo com a caracterização da família, gêneros e espécies (p. ex. TOMLINSON 1969; ROBINSON 1969; SAJO ET AL. 1998; AOYAMA; SAJO 2003; SCATENA; SEGECIN 2005; HORRES ET AL. 2007; PROENÇA; SAJO 2004, 2007; ALMEIDA ET AL. 2009; VERSIEUX ET AL. 2010; MONTEIRO ET AL. 2011; FARIA ET AL. 2012; GOMES-DA-SILVA ET AL. 2012; SANTOS-SILVA ET AL. 2014). Estudos anatômicos como esses têm indicado caracteres com potencial diagnóstico, como variações de espessamento de parede, posição dos estômatos em relação à epiderme, número de camadas no mesofilo e forma das células braciformes que preenchem os canais de ar. Grande parte desses trabalhos ainda discute a relação entre caracteres anatômicos foliares e o ambiente, indicando respostas quanto ao estresse hídrico e proteção contra o excesso de

luminosidade (p. ex. BENZING ET AL. 1978; LOESCHEN ET AL. 1993; REINERT; MEIRELLES 1993; PIERCE ET AL. 2001; FRESCHI ET AL. 2010; VOLTOLINI; SANTOS 2011; PEREIRA ET AL. 2013; SANTOS-SILVA ET AL. 2014; VIEIRA ET AL. 2017). Dentre esses caracteres, destacam-se as escamas peltadas, características da família, cuja evolução está relacionada com a redução estrutural e funcional do sistema radicular e com o desenvolvimento dos tecidos parenquimáticos e de suporte, e da hipoderme aquífera que armazena água no mesofilo (TOMLINSON 1969; BRAGA 1977). Já as raízes e o caule apresentam estrutura mais constante na família, como a presença de velame, córtex heterogêneo e cilindro vascular poliarco com células esclerenquimáticas na medula das raízes, e feixes vasculares com distribuição aleatória no caule (TOMLINSON 1969).

As escamas peltadas e o parênquima clorofiliano das folhas, a organização das folhas formando um tanque armazenador de água e a presença de velame nas raízes são as principais características que permitiram a evolução da forma de vida rupícola e epifítica na família.

Desenvolvimento de frutos em Bromelioideae

Em relação aos frutos, apesar da importância dos mesmos para o reconhecimento de subfamílias e da forma de dispersão (SMITH; DOWNS 1974, 1977, 1979; SMITH; TILL 1998; BENZING 2000), são poucos os estudos que descrevem sua ontogenia (FAGUNDES; MARIATH 2010; SANTOS-SILVA ET AL. 2015; THADEO ET AL. 2015). Dentre esses estudos, destaca-se aquele de Fagundes e Mariath (2010) que estudaram espécies de *Aechmea*, *Billbergia* (Bromelioideae), *Dyckia* Schult. & Schult.f., *Pitcairnia* L'Hér (Pitcairnioideae), *Tillandsia* L. e *Vriesea* (Tillandsioideae), relacionando a estrutura do fruto com a deiscência: cápsulas de Pitcairnioideae e Tillandsioideae exibem linhas de deiscência pré-determinadas enquanto que em Bromelioideae os frutos são indeiscentes pela fusão de tecidos carpelares e não carpelares. Em Bromelioideae parece ocorrer a redução de tecidos esclerenquimatosos, os quais se relacionam com a indeiscência de seus frutos (FAGUNDES; MARIATH 2010). Nas outras subfamílias estudadas células lignificadas ocorrem no exocarpo, mesocarpo e endocarpo em frutos de Tillandsioideae e no exocarpo ou no mesocarpo e endocarpo em frutos de Pitcairnioideae (FAGUNDES; MARIATH 2010; SANTOS-SILVA ET AL. 2015).

No estudo recente de Thadeo et al. (2015), analisou-se a ontogenia de frutos carnosos de monocotiledôneas, incluindo uma espécie de Bromelioideae, *Aechmea aquilega* (Salisb.) Griseb. Segundo Thadeo et al. (2015), frutos carnosos tiveram várias origens independentes nas monocotiledôneas, inclusive em Poales. No entanto, pouco se sabe sobre a ontogenia e

anatomia dos frutos carnosos em Bromeliaceae e estudos são necessários para que se possa entender sua estrutura.

Estrutura da semente e desenvolvimento das plântulas

Tradicionalmente, as sementes de Bromeliaceae são apontadas como ótimas ferramentas para a circunscrição de subfamílias, além de suas características estarem relacionadas ao modo de dispersão. Tillandsioideae apresenta sementes filiformes e com apêndices plumosos, enquanto que em Pitcairnioideae s.l. as sementes podem ser discóides ou aladas, indicando dispersão pelo vento em ambas as subfamílias (MÜLLER 1895; SMITH; DOWNS 1974, 1977; VARADARAJAN; GILMARTIN 1988; SMITH; TILL 1998; BENZING 2000). As Bromelioideae, entretanto, possuem sementes com envoltório mucilaginoso, usualmente denominado de sarcotesta (Smith; Till 1998), associado à dispersão zoocórica (SMITH; DOWNS 1974, 1979; VARADARAJAN; GILMARTIN 1988; SMITH; TILL 1998; BENZING 2000). Em relação à ontogenia das sementes, essa foi estudada em espécies de Tillandsioideae cujos apêndices plumosos se formam pelo alongamento e posterior separação das células da testa (SZIDAT 1922; PALACÍ ET AL. 2004). Para Pitcairnioideae s.l. também foi discutido que o aspecto morfológico mais variável de suas sementes (nuas, aladas ou caudadas) se deve à estrutura da testa (VARADARAJAN; GILMARTIN 1988). Já para Bromelioideae foi hipotetizado que o envoltório mucilaginoso das sementes deve desintegrar no interior dos frutos, fazendo parte da suculência dos mesmos (SZIDAT 1922; SMITH; DOWNS 1974; BENZING 2000); desta forma, o envoltório na semente madura seria formado apenas pelo tégmen. O envoltório mucilaginoso também tem sido associado com a função de proteção das sementes, evitando o dessecamento das mesmas no ambiente (SILVA; SCATENA 2011). Nesse sentido, os constituintes das células desse tecido merecem ser investigados para uma posterior comparação com a dispersão das sementes ou com sua capacidade de retenção de água. Seguindo a segunda hipótese, já foi relatado por Wester e Zotz (2011) que um substrato mais estável e úmido permite maiores taxas de germinação e de desenvolvimento de plântulas de *Catopsis sessiflora* (Ruiz & Pav.) Mez (Tillandsioideae).

Abaixo da testa, as sementes maduras de Bromeliaceae apresentam duas camadas no tégmen, constituindo o exotégmen com células de paredes espessadas e o endotégmen armazenando compostos fenólicos no interior de suas células (SZIDAT 1922; SMITH; DOWNS 1974; PALACÍ ET AL. 2004; MAGALHÃES; MARIATH 2012; PRADO ET AL.

2014). Apesar da estrutura uniforme desse tecido, em relação ao número de camadas, o grau de espessamento de parede de suas células pode ser importante para o reconhecimento de gêneros (BENZING 2000).

As sementes de Bromeliaceae são, na sua maioria, albuminosas, com endosperma diferenciado na camada de aleurona, adjacente ao envoltório seminal, e no parênquima armazenador de amido (SZIDAT 1922; SMITH; DOWNS 1974; BENZING 2000; PALACÍ ET AL. 2004; MAGALHÃES; MARIATH 2012; PRADO ET AL. 2014).

O embrião nas Bromeliaceae ocupa, geralmente, 1/3 da semente e é diferenciado em cotilédone e eixo hipocótilo-radicular (MÜLLER 1895; BILLINGS 1904; SZIDAT 1922; SMITH; DOWNS 1974; BENZING 2000; SCATENA ET AL. 2006; MENDES ET AL. 2010; MAGALHÃES; MARIATH 2012; PRADO ET AL. 2014). Durante a germinação o embrião se desenvolve e promove a ruptura do envoltório seminal (TILLICH 2007).

A germinação dos representantes de Tillandsioideae parece ser marcada pelo desenvolvimento do cotilédone (MÜLLER 1895; SCATENA ET AL. 2006; PEREIRA ET AL. 2008, 2009; SILVA; SCATENA 2011), enquanto que em representantes de Bromelioideae e Pitcairnioideae s.l. ocorre primeiramente o desenvolvimento da raiz primária (MÜLLER 1895; PEREIRA 1988; BENZING 2000; MANTOVANI; IGLESIAS 2005; SCATENA ET AL. 2006; TILLICH 2007; PEREIRA ET AL. 2008, 2009, 2010; SILVA; SCATENA 2011). Dentre esses estudos, destaca-se o trabalho de Tillich (2007), que descreve não apenas para Bromeliaceae, mas para Poales em geral, a estrutura do cotilédone durante o desenvolvimento pós-seminal. Segundo esse autor, a porção superior do cotilédone (hiperfilo) de Bromeliaceae se mantém aderida ao endosperma, com função haustorial. Já a porção basal (hipofilo) é mais variável, podendo ser modificada em uma bainha pouco desenvolvida, ou com um lobo mediano (hipofilo compacto), ou como uma estrutura laminar (hipofilo laminar). Outro trabalho importante é o de Pereira (1988), que descreve o desenvolvimento pós-seminal de várias espécies de Bromelioideae, comparando a morfologia de plântulas entre os gêneros, como por exemplo, para *Neoregelia*, cujas espécies possuem diferentes formas de vida e crescem em diferentes fitofisionomias (BFG 2015), sendo um gênero-chave para se investigar as adaptações dos indivíduos em estágios juvenis.

As modificações durante a transição entre os estágios de desenvolvimento da planta são importantes para o estabelecimento de Bromeliaceae em diferentes ecossistemas. Sabe-se, por exemplo, que as folhas jovens de *Tillandsia deppeana* Steud. são mais densamente cobertas por tricomas do que as dos indivíduos adultos, sendo tolerantes a longos períodos de seca (ADAMS; MARTIN 1986). Isso mostra que alguns caracteres estruturais estão

envolvidos com o desenvolvimento e estabelecimento das plântulas e podem indicar influências do habitat na seleção de caracteres morfológicos e anatômicos durante o desenvolvimento pós-seminal. Um ponto que ainda permanece com poucas informações para a família se refere à anatomia dos órgãos das plântulas, cujo desenvolvimento envolve processos de divisão e alongamento celular, diferenciação dos tecidos e órgãos, os quais são extremamente dependentes da dinâmica dos componentes da parede celular durante a ontogênese vegetal (ALBERSHEIM ET AL. 2011). Assim, elucidar esses processos mostra-se essencial para o entendimento da estrutura do corpo da planta e suas modificações/adaptações ao longo do desenvolvimento.

Estrutura geral da tese e apresentação dos capítulos

Pelo conjunto de fatores aqui apresentados quanto à dificuldade no reconhecimento de espécies, e daqueles que são úteis para o entendimento sobre a dispersão e o estabelecimento de suas espécies, essa tese foi organizada em quatro capítulos:

- Capítulo 1. Anatomy of the vegetative organs, inflorescence axis and pedicel in the *Neoregelia bahiana* complex (Bromeliaceae): taxonomic and ecological importance

Nesse capítulo foram estudadas 12 populações ao longo da Cadeia do Espinhaço, buscando descrever as variações morfológicas de raiz, estolho, folhas, eixo da inflorescência e pedicelo de seus representantes em condições naturais e em cultivo. Identificou-se um conjunto de caracteres que delimitam a espécie (maior parte das populações estudadas), enquanto que caracteres exclusivos para apenas três populações mostraram-se úteis para a delimitação destas.

- Capítulo 2. Variações morfológicas e anatômicas de raiz, folha, eixo da inflorescência e bráctea no complexo *Vriesea oligantha* (Bromeliaceae): perspectivas para a taxonomia e aspectos adaptativos

Nesse capítulo foram estudadas 17 populações ao longo da Cadeia do Espinhaço, buscando descrever as variações morfológicas de raiz, folhas, eixo da inflorescência e brácteas de seus representantes em condições naturais e em cultivo. Os caracteres com valor diagnóstico foram

submetidos à análise de similaridade entre as populações e indicam a existência de mais de um táxon.

- Capítulo 3. Aspectos estruturais da semente, germinação e desenvolvimento pós-seminal em *Neoregelia bahiana* (Bromeliaceae): entendendo o desenvolvimento das plântulas

Já nesse capítulo, sabendo da ampla variação morfológica e distribuição geográfica de *N. bahiana*, sementes de duas de suas populações foram colocadas para germinar e as etapas do desenvolvimento pós-seminal foram descritas. Adicionalmente, a anatomia e o desenvolvimento dos órgãos das plântulas, incluindo análises imunohistoquímicas, foram realizadas a fim de contribuir com o entendimento sobre o estabelecimento das plântulas.

- Capítulo 4. Seed development and its relation to fruit structure in species of Bromelioideae (Bromeliaceae) with fleshy fruits

Por fim, nesse capítulo foi estudado o desenvolvimento de frutos e sementes de três espécies de Bromelioideae. Os resultados foram discutidos em um panorama evolutivo, taxonômico e ecológico.

Referências bibliográficas

- ADAMS, W. W; MARTIN, C; E. Physiological consequences of changes in life form of the Mexican epiphyte *Tillandsia deppeana* (Bromeliaceae). Oecologia, v. 70, p. 298-304, 1986
- ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; ROBERTS, K.; SEDEROFF, A.; STAEHELIN, A. Plant Cell Walls. New York: Garland Science, Taylor and Francis Group, 2011.
- ALMEIDA, V. R.; COSTA, A. F.; MANTOVANI, A.; GONÇALVES-ESTEVES, V.; ARRUDA, R. C. O.; FORZZA, R. C. Morphological phylogenetics of *Quesnelia* (Bromeliaceae, Bromelioideae). Systematic Botany, v. 34, p. 660-672, 2009.
- AOYAMA, E. M.; SAJO, M. G. Estrutura foliar de *Aechmea* Ruiz & Pav. subgênero *Lamprococcus* (Beer) Baker e espécies relacionadas (Bromeliaceae). Brazilian Journal of Botany, v. 26, p. 461-473, 2003.
- APG IV. Na update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 181, p. 1-20, 2016.
- BENZING, D. H.; SEEMANN, J.; RENFROW, A. The foliar epidermis in Tillandsioideae (Bromeliaceae) and its role in habitat selection. American Journal of Botany, v. 65, p. 359-365, 1978.
- BENZING, D. H. Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation. USA: Cambridge University Press, 2000.
- BFG – THE BRAZIL FLORA GROUP. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. Rodriguésia, v. 66, p. 1085-1113, 2015.
- BILLINGS, F. H. A study of *Tillandsia usneoides*. Botanical Gazette, v. 38, p. 99-121, 1904.
- BOUCHENAK-KHELLADI, Y.; MUASYA, A. M.; LINDER, H. P. A revised evolutionary history of Poales: origins and diversification. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 175, p. 4-16, 2014.
- BRAGA, M. M. N. Anatomia foliar de Bromeliaceae da Campina. Acta Amazonica, v. 7, p. 5-73. 1977.
- BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Stigma types in Bromeliaceae – a systematic survey. Systematic Botany, v. 14, p. 110-132, 1989a.
- BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Cromossomes number in Bromeliaceae. American Journal of Botany, v. 76, p. 657-665, 1989b.
- Fagundes, N. F.; Mariath, J. E. A. Morphoanatomy and ontogeny of fruit in Bromeliaceae species. Acta Botanica Brasilica, v. 24, p. 765-779, 2010.

- FARIA, A. P. G.; VIEIRA, A. C. M.; WENDT, T. Leaf anatomy and its contribution to the systematics of *Aechmea* subgenus *Macrochordion* (de Vriese) Baker (Bromeliaceae). Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 84, p. 961-971, 2012.
- FRESCHI, L.; TAKAHASHI, C. A.; CAMBUI, C. A.; SEMPREBOM, T. R.; CRUZ, A. B.; MIOTO, P. T.; VERSIEUX, L. M.; CALVENTE, A.; LATANSIO-AIDAR, S. R.; AIDAR, M. P. M.; MERCIER, H. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. Journal of Plant Physiology, v. 167, p. 526–533, 2010.
- GIVNISH, T. J.; MILLAM, K. C.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. Aliso, v. 23, p. 3-26, 2007.
- GOMES-DA-SILVA, J.; VARGENS, F. A. C.; ARRUDA, R. C. O.; COSTA, A. F. A morphological cladistic analysis of the *Vriesea corcovadensis* group (Bromeliaceae: Tillandsioideae), with anatomical descriptions: new evidence of the non-monophyly of the genus. Systematic Botany, v. 37, p. 641-654, 2012.
- HORRES, R.; SCHULTE, K.; WEISING, K.; ZIZKA, G. Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) – Evidence from molecular and anatomical studies. Aliso, v. 23, p. 27-43, 2007.
- JACQUES-FELIX, H. The discovery of a bromeliad in Africa: *Pitcairnia feliciana*. Selbyana, v. 21, p. 118-124, 2000.
- LEME, E. M. C. Canistropsis. Bromélias da Mata Atlântica. Rio de Janeiro: GMT Editores Ltda, 1998.
- LOESCHEN, V. S.; MARTIN, C. E.; SMITH, M.; EDER, S. L. Leaf Anatomy and CO₂ recycling during crassulacean acid metabolism in twelve epiphytic species of *Tillandsia* (Bromeliaceae). International Journal of Plant Sciences, v. 154, p. 100-106, 1993.
- LUTHER H. An alphabetical list of bromeliad binomials. 14th ed. The Bromeliad Society International. The Marie Selby Botanical Gardens, Sarasota & Bromeliad Society International, 2014.
- MAGALHÃES, R. I.; MARIATH, J. E. A. Seed morphoanatomy and its systematic relevance to Tillandsioideae (Bromeliaceae). Plant Systematics and Evolution, v. 298, p. 1881-1895, 2012.

- MANTOVANI, A.; IGLESIAS, R. R. Quando aparece a primeira escama? Estudo comparativo sobre o surgimento de escamas de absorção em três espécies de bromélias terrestres de restinga. Rodrigésia, v. 56, p. 73-84, 2005.
- MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALES, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F.; FORZZA, R. C. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. Rodriguésia, v. 59, p. 209-258, 2008.
- MENDES, S. P.; COSTA, C. G.; TONI, K. L. G. Embryo development of *Dyckia pseudococcinea* (Pitcairnioideae-Bromeliaceae), an endangered Brazilian species. Australian Journal of Botany, v. 58, p. 485-492, 2010.
- MONTEIRO, R. F.; FORZZA, R. C.; MANTOVANI, A. Leaf structure of *Bromelia* and its significance for the evolution of Bromelioideae (Bromeliaceae). Plant Systematics and Evolution, v. 293, p. 53-64, 2011.
- MÜLLER F. Die Keimung einiger Bromeliaceen. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, v. 13, p. 75-182, 1895.
- PALACÍ, C. A.; BROWN, G. K.; TUTHILL, D. E. The seeds of *Catopsis* (Bromeliaceae: Tillandsioideae). Systematic Botany, v. 29, p. 518-527, 2004.
- PEREIRA, T. S. Bromelioideae (Bromeliaceae): Morfologia do desenvolvimento pós-seminal de algumas espécies. Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 29, p. 115-154, 1988.
- PEREIRA, A. R.; PEREIRA, T. S.; RODRIGUES, A. S.; ANDRADE, A. C. S. Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. Acta Botanica Brasilica, v. 22, p. 1150-1162, 2008.
- PEREIRA, A. R.; ANDRADE, A. C. S.; PEREIRA, T. S.; FORZZA, R. C.; RODRIGUES, A. S. Comportamento germinativo de espécies epífitas e rupícolas de Bromeliaceae do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. Revista Brasileira de Botânica, v. 32, p. 827-838, 2009.
- PEREIRA, A. R.; ANDRADE, A. S. C.; PEREIRA, T. S.; FORZZA, R. C.; RODRIGUES, A. S. Morphological aspects of seed, germination and storage of *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae). Seed Science and Technology, v. 38, p. 79-87, 2010.
- PEREIRA, T. A. R.; SILVA, L. C.; AZEVEDO, A. A.; FRANCINO, D. M. T.; COSER, T. S.; PEREIRA, J. D. Leaf morphoanatomical variations in *Billbergia elegans* and *Neoregelia mucugensis* (Bromeliaceae) exposed to low and high solar radiation. Botany, v. 91, p. 327-334, 2013.

- PIERCE, S.; MAXWELL, K.; GRIFFITHS, H.; WINTER, K. Hydrophobic trichome layers and epicuticular wax powders in Bromeliaceae. American Journal of Botany, v. 88, p. 1371-1389, 2001.
- PITTENDRIGH, C. S. The bromeliad-*Anopheles*-malaria complex in Trinidad. I - the bromeliad flora. Evolution, v. 2, p. 58-89, 1948.
- PRADO, J. P. C.; SCHIMIDT, E. C.; STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; BOUZON, Z. L.; VESCO, L. L. D.; PESCADOR, R. Seed morphology of *Vriesea friburguensis* var. *paludosa* L. B. Sm. (Bromeliaceae). Hoehnea, v. 41, p. 553-562, 2014.
- PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G. Estrutura foliar de espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. Acta Botanica Brasilica, v. 18, p. 319-331, 2004.
- PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G. Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. Acta Botanica Brasilica, v. 21, p. 657-673, 2007.
- REINERT, F.; MEIRELLES, S. T. Water acquisition strategy shifts in the heterophyllous saxicolous bromeliad, *Vriesea geniculata* (Wawra) Wawra. Selbyana, v. 14, p. 80-88, 1993.
- ROBINSON, H. A monograph on foliar anatomy of the genera *Connelia*, *Cottendorfia*, and *Navia* (Bromeliaceae). Smithsonian Contributions to Botany, v. 2, p. 1-41, 1969.
- RUNDEL, P. W.; DILLON, M. O. Ecological patterns in the Bromeliaceae of the lomas formations of coastal Chile and Peru. Plant Systematics and Evolution, v. 212, p. 261-278, 1998.
- SAJO, M. G.; MACHADO, S. R.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. Aspectos estruturais de folhas de bromélias e suas implicações no agrupamento de espécies. In: LEME, E. M. C. (ed). Canistropsis. Bromélias da Mata Atlântica. Rio de Janeiro: GMT Editores Ltda, pp. 102-111, 1998.
- SAJO, M. G.; RUDALL, P. J.; PRYCHID, C. J. Floral anatomy of Bromeliaceae, with particular reference to the evolution of epigyny and septal nectaries in commelinid monocots. Plant Systematics and Evolution, v. 247, p. 215-231, 2004.
- SANTOS-SILVA, F.; SARAIVA, D. P.; MONTEIRO, R. F.; PITA, P.; MANTOVANI, A.; FORZZA, R. C. Invasion of the South American dry diagonal: What can the leaf anatomy of Pitcairnioideae (Bromeliaceae) tell us about it? Flora, v. 208, p. 508-521, 2014.
- SANTOS-SILVA, F.; MASTROBERTI, A. A.; MARIATH, J. E. A. Capsule structure in three species of *Dyckia* (Bromeliaceae): ontogenetic and taxonomic issues. Journal of the Torrey Botanical Society, v. 142, p. 249-257, 2015.

- SANTOS-SILVA, F.; VENDA, A. K. L.; HALLBRITTER, H. M.; LEME, E. M. C.; MANTOVANI, A.; FORZZA, R. C. Nested in chaos: insights on the relations of the “Nidularioid Complex” and the evolutionary history of *Neoregelia* (Bromelioideae-Bromeliaceae). Brittonia, v. 69, p. 133-147, 2017.
- SCATENA, V. L.; SEGECIN, S. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. Brazilian Journal of Botany, v. 28, p. 635-649, 2005.
- SCATENA, V. L.; SEGECIN, S.; COAN, A. I. Seed morphology and post-seminal development of *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) from the “Campos Gerais”, Paraná, Southern Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 49, p. 945-951, 2006.
- SILVA, I. V.; SCATENA, V. L. Morfologia de sementes e de estádios iniciais de plântulas de espécies de Bromeliaceae da Amazônia. Rodriguésia, v. 62, p. 263-272, 2011.
- SMITH, L. B. Geographical evidence on the lines of evolution in the Bromeliaceae. Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie, v. 66, p. 446-468, 1934.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica Monograph, v. 14, p. 1-658, 1974.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Tillandsioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica Monograph, v. 14, p. 663-1492, 1977.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica Monograph, v. 14, p. 1493-2142, 1979.
- SMITH, L. B.; Till, W. Bromeliaceae. In: KUBITZKI, K. (ed.). The families and genera of vascular plants, v. 4, Berlin: Springer, pp. 74-99, 1998.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012.
- SZIDAT L. Die Samen der Bromeliaceen in ihrer Anpassung an den Epiphytismus. Botanisches Archiv, v. 1, p. 29-46, 1922.
- THADEO, M.; HAMPILOS, K. E.; STEVENSON, D. W. Anatomy of fleshy fruits in the monocots. American Journal of Botany, v. 102, p. 1-23, 2015.
- TILLICH, H. J. Seedling diversity and the homologies of seedling organs in the order Poales (Monocotyledons). Annals of Botany, v. 100, p. 1413-1429, 2007.
- TOMLINSON, P. B. III Commelinales-Zingiberales. In: METCALFE, C. R. (ed.), Anatomy of the monocotyledons. Clarendon Press, pp. 193-294, 1969.

- VARADARAJAN, G. S.; GILMARTIN, A. J. Seed morphology of the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae) and its systematic implications. American Journal of Botany, v. 75, p. 808-818, 1988.
- VERSIEUX, L. M.; WENDT, T.; LOUZADA, R. B.; WANDERLEY, M. G. L. Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. Megadiversidade, v. 4, p. 99-110, 2008.
- VERSIEUX, L. M.; ELBL, P. M.; WANDERLEY, M. G. L.; MENEZES, N. L. *Alcantarea* (Bromeliaceae) leaf anatomical characterization and its systematic implications. Nordic Journal of Botany, v. 28, p. 385-397, 2010.
- VIEIRA, E. A.; SILVA, K. R.; ORIANI, A.; MORO, C. F.; BRAGA, M. R. Mechanisms of desiccation tolerance in the bromeliad *Pitcairnia burchellii* Mez: biochemical adjustments and structural changes. Plant Physiology and Biochemistry, v. 121, p. 21-30, 2017.
- VOLTOLINI, C. H.; SANTOS, M. Variações na morfoanatomia foliar de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var. *Lindenii* (Bromeliaceae) sob distintas condições ambientais. Acta Botanica Brasilica, v. 25, p. 2-10, 2011.
- WESTER, S.; ZOTZ, G. Seed comas of bromeliads promote germination and early seedling growth by wick-like water uptake. Journal of Tropical Ecology, v. 27, p. 115-119, 2011.

Capítulo 1

Anatomy of the vegetative organs, inflorescence axis and pedicel in the *Neoregelia bahiana* complex (Bromeliaceae): taxonomic and ecological importance

Kleber Resende Silva, Leonardo M. Versieux and Aline Oriani

K. R. Silva (<https://orcid.org/0000-0002-6906-098X>) and A. Oriani, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), C. Postal 199, Rio Claro, SP 13506-900, Brazil. – L. M. Versieux, Departamento de Botânica e Zoologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Universitário, Natal, RN 59078-970, Brazil.

Corresponding author: K. R. Silva, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), C. Postal 199, Rio Claro, SP 13506-900, Brazil. E-mail: kleber_resende@hotmail.com

Abstract

Delimitation of Bromeliaceae into genera or species is often problematic, as observed for the *Neoregelia bahiana* complex, distributed throughout the rocky fields of Espinhaço Range, Brazil. Considering that the anatomical characterisation of different organs is potentially important for taxonomic and ecological interpretation of this complex, we analysed roots, stems (stolon), leaves, inflorescence axes (peduncle), and pedicels in individuals from different populations. In all the studied individuals, the roots are composed of velamen, a heterogeneous cortex, and a polyarch vascular cylinder with sclerenchymatous pith. The stolon features a parenchymatous cortex and collateral vascular bundles randomly distributed in the vascular cylinder. This organ may increase in diameter by the formation of new vascular bundles and a multi-layered cork. The leaf blade has epidermal cells with U-shaped thickened walls and peltate scales occur on the adaxial surface. The mesophyll consists of mechanical and water-storage hypodermis and a heterogeneous chlorenchyma. The inflorescence axis and the pedicel have a parenchymatous cortex and vascular bundles randomly distributed in an aerenchyma. Some variable leaf characters, such as presence of air lacunae in the mesophyll, are related to the size of the individuals and were interpreted as phenotypic variations related mainly to sunlight incidence. Leaf characters such as lamina shape, distribution of the peltate scales, and number of cell layers forming the water-storage hypodermis distinguish the populations of the Serra do Cabral and one population of the Diamantina (Minas Gerais) from the remaining studied populations, suggesting the existence of more than one taxon.

Keywords: leaf; *Neoregelia*; Poales; root; rocky fields; stolon

Introduction

Bromeliaceae are an early-diverging lineage of the order Poales (Linder and Rudall 2005, Givnish et al. 2010). Although monophyletic, the family is problematic in terms of generic and specific delimitation (Smith and Downs 1974, 1979, Benzing 2000, Santos-Silva et al. 2017), as observed in some complexes of species such as the *Neoregelia bahiana* (Ule) L.B.Sm. (Bromelioideae).

Neoregelia bahiana is a rupicolous species endemic to Brazil, restricted to the rocky fields of the Espinhaço Range, a mountain chain located in the states of Minas Gerais and Bahia (Versieux et al. 2008, BFG 2015). The species exhibits a wide morphological variation (particularly in the shape, size and colouration of the leaves) and a broad synonymy exists in the literature, including both homotypic (*Nidularium bahianum* Ule, *Aregelia bahiana* (Ule) Mez) and heterotypic synonyms and taxa of different hierarchical levels: *Neoregelia bahiana* var. *viridis* L.B.Sm., *Neoregelia bahiana* forma *viridis* (L.B.Sm.) L.B.Sm., *Neoregelia hatschbachii* L.B.Sm., *Neoregelia pabstiana* E.Pereira, *Neoregelia diamantinensis* E.Pereira, *Neoregelia intermedia* E.Pereira, *Neoregelia bahiana* forma *bahiana* (Smith and Downs 1979, BFG 2015).

In this context, the anatomical characterisation of individuals from different populations of *Neoregelia bahiana* is a potential source of diagnostic characters for the species, and may help ascertain the existence of intraspecific or interpopulational variations related to the environment. The importance of anatomical data for the taxonomic and ecological understanding of Bromeliaceae has already been demonstrated in many studies involving different organs such as root, stem, leaf and the inflorescence axis (e.g. Tomlinson 1969, Sajo et al. 1998, Pita and Menezes 2002, Aoyama and Sajo 2003, Segecin and Scatena 2004a, 2004b, Scatena and Segecin 2005, Horres et al. 2007, Proença and Sajo 2004, 2007, 2008a, 2008b, Versieux et al. 2010, Monteiro et al. 2011, Silva and Scatena 2011a, 2011b, Faria et al. 2012, Reinert et al. 2013, Santos-Silva et al. 2014).

For the Nidularioid complex, which comprises the genera *Nidularium* Lem., *Canistrum* E. Morren, *Canistropsis* (Mez) Leme, *Edmundoa* Leme, *Wittrockia* Lindm., and *Neoregelia* L. B. Sm., a recent phylogenetic study of representatives of these genera, including *N. bahiana*, showed that the leaf anatomical characters are useful for the phylogeny of the group (Santos-Silva et al. 2017). This study indicated that *Neoregelia* is paraphyletic, highlighting the importance of obtaining new anatomical data that can be used in future phylogenetic analyses of the genus.

Considering the wide variation in leaf morphology and plant architecture within the *Neoregelia bahiana* complex, the objective of this study was to describe the morphology and anatomy of the vegetative organs, inflorescence axis and pedicel of individuals collected from different locations along the Espinhaço mountain range, seeking to answer the following questions: Which characters have taxonomic value and contribute to the delimitation of the species or other taxa? How do the presented results increase the anatomical data available for the family? Which characters may be interpreted as adaptations to the environment and to the rupicolous life form?

Materials and methods

Individuals of *Neoregelia bahiana* were collected in rocky fields in the Brazilian states of Minas Gerais- MG (Grão Mogol, Santo Antônio do Itambé, Serra do Cabral, Serra do Cipó, and Diamantina municipalities) and Bahia- BA (Abaíra, Mucugê and Rio de Contas municipalities), as listed in Table 1. The general characteristics of luminosity for each collection point were recorded and on the basis of these characteristics the plants were classified as sciophyte (growing in total or partial shade) or heliophyte (growing under direct sunlight) (Table 1). Figure 1 shows the map of the populations' distribution, which was generated based on the geographic coordinates of the collection points using the public available Quantum Geographic Information Systems software (QGIS ver. 2.12.3). We kept some individuals in a greenhouse to observe possible variations in leaf morphology and plant architecture under cultivation conditions. Voucher specimens for each population are deposited in the Herbarium Rioclarense (HRCB) and duplicates in the herbarium of Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

For anatomical studies, roots, stolons, leaves (margin and central region of the lamina), inflorescence axis (peduncles) and pedicels of at least three individuals (rosettes) from each population were fixed in FAA 50 (37% formaldehyde, glacial acetic acid, 50% ethanol, 1:1:18 v/v) (Johansen 1940) and stored in 70% ethanol. Subsequently, the samples were dehydrated in a n-butyl alcohol series and embedded in (2-hydroxyethyl)-methacrylate (Leica Historesin Embedding Kit) (Gerrits and Smid 1983). Paradermal, cross and longitudinal sections were made in the middle portion of the studied organs using a rotary microtome (Leica RM 2245). For the stolon, cross sections were also made in its distal portion. The sections were stained with periodic acid–Schiff's reagent (PAS) and toluidine blue (O'Brien et al. 1964, Feder and O'Brien 1968) and mounted on permanent slides using

Entellan (Merck). We also performed cross and longitudinal handmade sections, which were bleached in a 20% sodium hypochlorite solution, double stained with safranin and Astra Blue (Bukatsch 1972) and mounted on slides with water. The images were obtained with a microscope (Leica DM 4000B) equipped with a camera (Leica DFC 450), using the software LAS (Leica Application Suite Version 4.0.0).

Histochemical tests were performed with Sudan III for lipid (Sass 1951), phenol for silica compounds (Johansen 1940), and hydrochloric acid and glacial acetic acid solutions for calcium oxalate detection (Chaberlain 1932).

For the scanning electron microscopy (SEM) study, the samples were dehydrated in an ethanol series (80, 90 e 100%), critical point dried (Balzers CPD 050), and coated with gold (Bal-Tec SCD 050). The results were documented by images obtained with a camera coupled to microscope (Zeiss, LEO 435 VP).

Quantitative data on the average size of the leaf rosette (average $\pm$ standard deviation) relative to the height and diameter (measured from the top view of the rosette) were obtained using the measurements from three adult individuals per population. We also measured the entire leaf length (including the leaf sheath) and the lamina width of three leaves on each of three individuals per population (totalizing nine leaves per population).

Results

Morphology – *Neoregelia bahiana* individuals grow on rocky outcrops (Fig. 2a) and occasionally on trees (Fig. 2b, Table 1). Its leaves, green to reddish in colour, are spirally arranged and overlapping on a short aerial stem, forming a small tank capable of storing water (Fig. 2c-d). In some populations from Minas Gerais (Populations 8, 10 and 12), the leaf apex is pinkish (Fig. 2d, Table 2). In the remaining populations, the leaf apex is green or reddish green (Figs. 2c, 3d, Table 2). In most of the studied individuals (Populations 1-5, 8-10 and 12), the leaf sheath is narrow (Fig. 3a) and the lamina is linear, varying in length (Fig. 3d - leaves 3 and 4). In the Populations 6 and 7 (Serra do Cabral, MG), the lamina is lanceolate with a wide sheath (Fig. 3b, d - leaf 1), whereas in the Population 11 (Diamantina, MG) the lamina is rounded to oblong with also a wide sheath (Fig. 3c, d - leaf 2, Table 2). Regarding the position of the leaf lamina relative to the plant's axis, the erect ascending position is predominant (Fig. 3a-b), except for the individuals of Population 11, which exhibit suberect-patent laminae (Fig. 3c).

The inflorescence axis, which bears the flowers and fruits, is achlorophyllous and nested in the leaf rosette (Fig. 2e). The vegetative propagation of the species occurs naturally through the formation of stolons, from which new ramets are formed (Figs. 2e, 3a-b, arrows). Adventitious roots develop in the distal portion of the stolon and from the short aerial stem (Fig. 3a-b, arrowheads).

In general, the individuals of the populations from Minas Gerais (Populations 5-12) (Figs. 2d-e, 3b-c) and of one population from Mucugê, BA (Population 3) are larger than those of the remaining populations from Bahia, exhibiting rosettes of greater height and diameter as well as longer leaves (Figs. 2d, 3b-d, Table 2). Only one population from Minas Gerais (Population 8) had smaller individuals, with an average size similar to that recorded for Populations 1, 2 and 4 from Bahia (Table 2). All of the smaller individuals are heliophilic, growing under high luminosity (Table 1). The individuals that grew in shaded areas (Table 1) generally exhibited rosettes of larger diameter and longer leaves with narrower laminas (Table 2).

Root anatomy – The roots consist of the velamen, heterogeneous cortex and vascular cylinder (Fig. 4a-b). The outermost layer of the velamen is the epivelamen, composed of cells differentiated into root hairs. The remaining layers of the velamen are formed by cells with slightly thickened and lignified walls (Fig. 4b).

The outer cortex has 1–3 layers of cells with thickened and lignified walls (Fig. 4b). The middle cortex is parenchymatous and is formed by about 10 layers of cells in compact arrangement (Fig. 4b). Idioblasts occur in the velamen, outer cortex and middle cortex (Fig. 4b, asterisks). These idioblasts are elongated longitudinally and contain raphides as well as mucilage, which reacted positively to the PAS, indicating the presence of polysaccharides (Fig. 4d, arrow). The inner cortex has 6–7 layers of rounded, thin-walled cells that delimit conspicuous intercellular spaces and are arranged radially around the endodermis (Fig. 4a-c). Sclereids occur between the middle cortex and inner cortex (Fig. 4b, detail). The endodermis is one-layered and composed of cells with thickened anticlinal walls (Fig. 4c).

The pericycle is one-layered and formed by thin-walled cells (Fig. 4b-c). The vascular cylinder is polyarch, with 20–30 protoxylem poles and a sclerenchymatous pith (Fig. 4c).

Stolon anatomy – The stolon has an atactostele, with a defined cortex and vascular bundles distributed randomly in the pith (Fig. 5a). During its development, the stolon becomes more rigid due to thickening and lignification of the cell walls, mainly of the epidermis, hypodermis

and pericycle, which can be observed when comparing cross sections of the younger, distal portion (Fig. 5b, f) to the middle portion (Fig. 5d, g).

In the distal portion of the stolon, the epidermis is single-layered and its cells have U-shaped thickened walls and contain silica bodies (Fig. 5b, arrow). The cortex is composed of rounded, thin-walled cells (Fig. 5e) and exhibits vascular traces (Fig. 5f), fiber bundles, and adventitious roots (Fig. 5k). The endodermal cells are undifferentiated from the other cortical cells (Fig. 5f). The vascular cylinder is delimited by a multi-layered pericycle, which is parenchymatous (Fig. 5f). The vascular bundles are collateral, simple or compound, and surrounded by a fibrous sheath (Fig. 5f). In the pith, as in the cortex, the cells are rounded, thin-walled, and delimit conspicuous intercellular spaces (Fig. 5e). Idioblasts containing raphides and polysaccharides occur in both the cortex and the pith (Fig. 5f, asterisks).

In the middle portion of the stolon, the thickening of the epidermal cell walls is more pronounced, thus their lumen is greatly reduced (Fig. 5c-d). In this portion of the stolon a new multi-layered protective tissue is produced in the outer layers of the cortex (Fig. 5c-d) and later its cells become suberized. Vascular traces and fiber bundles (Fig. 5i) are also observed in the cortex (Fig. 5g). The pericycle cells have thickened, lignified walls and there are more vascular bundles in the vascular cylinder, which are surrounded by fibrous sheaths (Fig. 5g-h). The cells of the pith may contain starch grains (Fig. 5j).

Leaf anatomy – The leaf lamina is composed of epidermis, hypodermis, chlorenchyma, and the vascular system (Fig. 6a-e). The epidermis is single-layered, with U-shaped thick-walled cells (Fig. 7a, d). The epidermal cells may contain silica bodies (Fig. 7b, f, arrow) and are covered by a relatively thick cuticle (Fig. 7a, f). From the frontal view, the silica-containing cells have a quadrangular shape and sinuous walls (Fig. 7b). The stomata are tetracytic (Fig. 7e), with wide substomatal chambers (Figs. 6g-h, 7c-d, asterisks). They are arranged in bands on the abaxial surface of the lamina (Fig. 8b-c, f, arrowheads), slightly below the remaining epidermal cells (Figs. 6g-h, 7c), at the same level as the mechanical hypodermis (Fig. 7e). In the individuals of Populations 6, 7 (Serra do Cabral, MG), 10 (Diamantina, MG) and 12 (Serra do Cipó, MG), the stomata lie in intercostal grooves (Fig. 7d). These grooves are more pronounced in Populations 6 and 7, giving the abaxial surface of the lamina a more sinuous contour (Fig. 6e). In the remaining populations, the grooves occur between the bands of stomata, in the costal regions (Figs. 7c, 8b).

Peltate scales are present on the adaxial surface of the lamina in all the studied individuals (Fig. 8a-d). However, they are present on the abaxial surface only in individuals of

Populations 6, 7 (Serra do Cabral, MG), 10 (Diamantina, MG) and 12 (Serra do Cipó, MG), occurring in the intercostal grooves, together with the stomata (Fig. 8c-d, Table 3). In Populations 6 and 7, the scales are abundant and arranged in bands, with their shields overlapping (Fig. 8d, Table 3). In Populations 10 and 12, the scales are less numerous and arranged in rows (Fig. 8c). Each scale consists of 1–2 basal cells, a stalk with 3–4 cells, and a multicellular shield (Fig. 7f). The number of shield cells varies between individuals, or even between scales on the same leaf (Fig. 8e-f). The shield has polygonal cells, and the peripheral cells are elongated (Fig. 8g). All shield cells exhibit thickened inner periclinal and anticlinal walls (Figs. 7f, 8e-g).

A hypodermis differentiated into supporting tissue (mechanical hypodermis) and water-storage tissue is present on both surfaces of the lamina (Figs. 6a-e, g-h, 7a, d, f). The mechanical hypodermis is composed of lignified, thick-walled cells (Figs. 6b, d, 7e), with two or more layers of cells facing the adaxial surface (Fig. 7a) and one or two layers of cells facing the abaxial surface (Fig. 7d, f). The water-storage tissue, which is more developed on the adaxial surface, especially in the centre of the lamina, is composed of 4–6 layers of thin-walled cells with large lumen (Fig. 6a). Only in the individuals of Populations 6, 7 (Serra do Cabral, MG) and 11 (Diamantina, MG), the water-storage tissue is composed of more than 10 layers of cells (Fig. 6c, Table 2). In the centre of the lamina, the cells of the innermost layers of the water-storage tissue have elongated and sinuous anticlinal walls (Fig. 6c). Toward the margin of the lamina, the water-storage cells are rounded (Fig. 6b, d), except in the leaves of individuals of Populations 6 and 7, for which all the cells of the innermost layers of the water-storage tissue are anticlinally elongated (Fig. 6e). On the abaxial surface, the water-storage tissue is formed by 2–3 layers of rounded cells (Figs. 6g-h, 7d, f). These layers are interrupted by the substomatal chambers, which are supported by arm cells (Figs. 6g-h, arrowhead, 7c-d). Idioblasts containing raphides and polysaccharides occur in the water-storage tissue facing the adaxial surface and in the chlorenchyma near the leaf margin (Fig. 6j). The leaf margin in cross section is obtuse to acute in the individuals of Populations 1–5, 8–10 and 12 (Fig. 6b) and always acute in the individuals of Populations 6, 7 and 11 (Fig. 6d-e). The margin also exhibits spinescent emergences formed by the elongation of the thickened, lignified cells of the mechanical hypodermis (Fig. 6f).

The chlorenchyma is heterogeneous, with palisade cells facing the adaxial surface and rounded cells facing the abaxial surface of the lamina (Fig. 6a-c, i). Small druses (calcium oxalate crystals) occur in the chlorenchyma cells (Fig. 6k, arrow). In individuals of Minas Gerais (Populations 5–7, 9–12) and one population of Mucugê, BA (Population 3), air lacunae

are interspersed with the vascular bundles in the centre of the lamina; they are connected to the substomatal chambers and may be large (Fig. 6a, c, g) or small (Fig. 6i, Table 2). In the remaining populations, the air lacunae are restricted to the substomatal chambers (Fig. 6h, Table 2). These lacunae are supported by arm cells (Fig. 6g, i).

The vascular bundles are distributed in a single row in the cross section of the lamina and are not buttressed to surface layers (Fig. 6a-e). They are collateral and surrounded by a double sheath, the outer parenchymatous and the inner sclerenchymatous (Fig. 6g-i). The fibrous caps on the xylem and the phloem are more developed in the smaller vascular bundles, which alternate with the larger ones (Fig. 6g, i). In the individuals of Population 11 (Diamantina), the fibrous cap on the phloem are prominent and may form fiber strands isolated in the mesophyll (Fig. 6i). Commissural vascular bundles interconnect the vascular bundles that are distributed longitudinally through the leaf (Fig. 6l).

Anatomy of the inflorescence axis and pedicel – The inflorescence axis and the pedicel are cylindrical, with sinuous contours (Fig. 9a-b). They have a single-layered epidermis, composed of papillose thin-walled cells (Fig. 9d).

The cortex and the vascular cylinder are easily distinguishable (Fig. 9a-c). The cortex is narrow relative to the vascular cylinder (Fig. 9a-b) and consists of rounded, thin-walled cells (Fig. 9c). In the inflorescence axis, vascular traces occur in the cortex (Fig. 9e).

The vascular bundles are simple (Fig. 9h) or compound (Fig. 9i), and arranged randomly within the vascular cylinder (atactostele) (Fig. 9a-b). Most of the vascular bundles are collateral (Fig. 9h-i); however, some bundles formed by only phloem were also observed (Fig. 9j, arrowhead). The vascular bundles are surrounded by cellulosic thin-walled cells, except in the pedicels of the individuals of Population 1, in which the vascular bundles are surrounded by cells with lignified walls (Fig. 9j). The pith is composed of both rounded cells and arm cells (Fig. 9c, g), the later delimiting air spaces, which are larger in the pedicel (Fig. 9b). Idioblasts containing raphides and polysaccharides occur in both cortex and pith (Fig. 9f). Starch grains were found in the pith cells of the inflorescence axis, near the vascular bundles, confirmed by the positive reaction to PAS.

Discussion

Contributions to the taxonomy of *Neoregelia bahiana* – The Populations 1–5, 8–10 and 12 show the same anatomical pattern, without qualitative variations, in the roots, stolons, leaves,

inflorescence axes and pedicels, indicating that they belong to a single species: *Neoregelia bahiana*. Therefore, we can point to a set of characters that are useful in delimiting the species: root with velamen, heterogeneous cortex and polyarch vascular cylinder; stolon with atactostele, presenting growth in thickness; linear-shaped lamina without peltate scales on the abaxial surface or, when present, not overlapping; heterogeneous mesophyll, with mechanical and water-storage tissues on both surfaces of the lamina and palisade chlorenchyma facing the adaxial surface; water-storage tissue consisting of up to 10 layers of cells; and the presence of idioblasts containing raphides and polysaccharides in all organs.

The individuals of Populations 6 and 7 (Serra do Cabral, MG) are differentiated by the presence of lanceolate lamina, always with acute margins and with water-storage tissue composed of more than 10 layers of anticlinally elongated cells, as well as the presence of overlapping peltate scales on the lamina abaxial surface. The individuals of Population 11 (Diamantina, MG) also exhibit laminas with acute margins and with water-storage tissue consisting of more than 10 layers of cells; however they are differentiated by their rounded to oblong, suberect-patent laminas and by the presence of a prominent fibrous cap on the phloem, which may form fiber strands dispersed in the chlorenchyma. Such characters together delimit these populations and suggest the presence of more than one taxon in the complex. It must be emphasized that the Populations 6 and 7 occur in the Serra do Cabral, Minas Gerais, in a more xeric environment than the other rocky fields in the central or southern part of the Espinhaço mountain range.

Santos-Silva et al. (2017) recently studied the leaf anatomy of *Neoregelia bahiana* from a phylogenetic perspective and most of the character states identified by the authors agree with those described here, namely adaxial and abaxial epidermis with cells with thickened walls and a small lumen; scale stalk having more than two cells; adaxial mechanical hypodermis composed of more than one layer of thick-walled cells, and abaxial hypodermis composed of one layer of thick-walled cells and one or more transition layers; abrupt transition between water-storage tissue and chlorenchyma; and smaller vascular bundles with fibrous cap (taller than wide).

The extension of the water-storage tissue described by Santos-Silva et al. (2017) (up to 1/3 of the thickness of leaf blade) agrees with that observed in most of the populations studied here, except for the Populations 6, 7 (Serra do Cabral) and 11 (Diamantina), indicating the diagnostic potential of this character. The presence of extravascular fiber strands in the leaves of Population 11 (indicated as absent by Santos-Silva (2017) can also be used to delimit this population. Our results also demonstrate that the following character states described by

Santos-Silva et al. (2017) as diagnostic for *N. bahiana*: presence of air lacunae composed of cells with short arms in the mesophyll, and anticlinally elongated cells forming the water-storage tissue, may vary among the populations, and should be used with caution in future phylogenetic analyses. In addition to these interpopulational structural variations, we also observed the presence of palisade parenchyma in the leaves of all studied populations, a character described as absent in *N. bahiana* by Santos-Silva et al. (2017). These authors also indicated the occurrence of stomata at the same level as the remaining epidermal cells; however, our results show that the stomata are located slightly below the other epidermal cells, and they can occur in intercostal grooves, as in the individuals of Populations 6, 7 (Serra do Cabral), 10 (Diamantina) and 12 (Serra do Cipó). These anatomical differences emphasize the need for the taxonomic delimitation of *N. bahiana*, and the need to understand how representatives of the Nidularioid complex respond to the environmental factors for a more robust phylogeny.

The air lacunae alternated with the vascular bundles in the mesophyll is a character with interpopulational variation. They are absent in most of the populations from Bahia (Populations 1, 2 and 4) and in one population from Minas Gerais (Population 8), whose individuals are smaller (reduced diameter and height of the rosette and shorter leaf length) and grow in areas of high light intensity. Therefore, the presence of air lacunae may be related to the size of the lamina (longer leaves have air lacunae), which is in turn related to environmental factors, particularly sunlight incidence. Dai et al. (2009) demonstrated that in *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg (Vitaceae), the plants growing in a 67% shade condition showed a higher photosynthetic activity and growth. When the light intensity exceeded that of 50% shade, photosynthetic activity was depressed likely due to photoinhibition (Dai et al. 2009). In the same way, the presence of air lacunae in the longer leaves of *N. bahiana* may be related to a higher photosynthetic activity and growth, since the air lacunae may facilitate the gas flow within the lamina, improving the photosynthetic performance and the carbon gain. A recent study that associated the leaf anatomy with the photosynthetic pathways in Bromeliaceae showed that CAM plants, in general, show a higher chlorenchyma thickness and reduced internal air spaces (Males 2018). In this sense, the absence of air lacunae in the heliophyte individuals of *N. bahiana* may indicate an ability to express a degree of CAM in response to stresses such as high sunlight, as demonstrated for other bromeliad species (Pierce et al. 2002). In addition to the length, sunlight incidence may also influence the width of the lamina, since the individuals occurring in shady areas have narrower laminas compared to those occurring in sunny areas of the same location

(Populations 2 and 3, 6 and 7, 8 and 9). However, it should be noted that light is not the only factor influencing leaf ontogeny and regulating the morphological aspects of the organ. In the Populations 10 (Diamantina, MG) and 12 (Serra do Cipó, MG), for example, whose individuals grow exposed to high luminosity, the leaves are long and have wide air lacunae. This longer leaf length may be related to the fact that, in these individuals, the stomata lie in the intercostal grooves, protected by the scales, conferring an adaptive advantage.

Another variable character between populations of *N. bahiana* is the pink colouration of the leaf apex, present in the individuals of Population 8, 9 (Santo Antônio do Itambé, MG), 10 (Diamantina, MG) and 12 (Serra do Cipó, MG). The most uniform morphological aspect among these populations may be due to their relative geographic proximity (Fig. 1), sharing more genetic similarities among themselves. Despite the genetic factor, we observed that the light incidence can also influence this pattern of colouration. For example, individuals of the Population 9 that grow in shaded areas of the gallery forests have a green leaf apex, while those individuals growing in areas between the gallery forest and the rocky outcrops (more exposed to the sun) have a pinkish leaf apex. Furthermore, in individuals of the four populations transplanted and maintained under cultivation in a greenhouse, the leaf apices ended up presenting a less intense pinkish colour. Pereira et al. (2013), comparatively analysing sun and shade leaves of *Billbergia elegans* Mart. ex Schult. & Schult. f. and *N. mucugensis* Leme, also observed that individuals that grew in sunny environments exhibited leaves that were reddish and smaller than those of the individuals in shaded areas, which were green and larger.

It must be noted, however, that other environmental factors may be influencing the pinkish colouration of the leaves, since low temperatures and nutritional and water stresses can increase anthocyanin production (Close and Beadle 2003). All *N. bahiana* populations with pinkish leaves occur in altitudinal rocky fields with low average temperatures; hence, climate is another environmental factor to be considered. The diversity in leaf morphology illustrates the phenotypic plasticity of the *N. bahiana* populations and points to this species as one of the most variable in leaf texture, colour and size in the genus.

Contributions to the knowledge on Bromeliaceae – Many of the characters observed in *Neoregelia bahiana* are common in the family, including the root with multi-layered velamen, heterogeneous cortex, one-layered endodermis and pericycle, polyarch vascular cylinder, and pith with thick-walled cells (Tomlinson 1969, Pita and Menezes 2002, Segecín and Scatena 2004a, Proença and Sajo 2008a, Silva and Scatena 2011a).

An endodermis with cells presenting only thickened anticlinal walls in the roots characterises Bromelioideae and Pitcairnioideae, as it is also observed in the species of *Acanthostachys* Klotzsch, *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill., *Billbergia* Thunb. (Bromelioideae), *Dyckia* Schult. & Schult. f. and *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Pitcairnioideae) (Pita and Menezes 2002, Proença and Sajo 2008a, Silva and Scatena 2011a). On the other hand, endodermal cells with thin walls or with O-shaped or U-shaped thickened walls are common among the Tillandsioideae (Segecin and Scatena 2004a, Proença and Sajo 2008a). The radial arrangement of the cells of the inner cortex in *N. bahiana* may be due to meristematic activity of the endodermis, as demonstrated by Menezes et al. (2005) for other monocotyledons that grow in thickness.

Regarding the stem, Tomlinson (1969) presents a general pattern, with distinct cortex and vascular cylinder, common for most Bromeliaceae. The short aerial stem has been studied anatomically by Segecin and Scatena (2004a) and Proença and Sajo (2008a), who termed it rhizome. However, rhizomes are generally characterised as subterranean stems with storage tissue, originating from the plumule, and constituting a monopolar system (Appezato da Glória 2015), differing from what is observed in Bromeliaceae. Therefore, we use here the term short aerial stem to refer to the stem axis that bears the leaf rosette, and stolon to refer to that which develops from an axillary bud of the short aerial stem and grows horizontally, producing a new ramet. The stolon has defined nodes and internodes and cataphylls that protect the organ. It has no storage parenchyma and develops during vegetative propagation, possibly functioning to place the new ramet away from the mother-plant. The anatomy of the stolon in Bromeliaceae is described here for the first time: it is very similar to the short aerial stem, with a well-defined cortex and bundles distributed randomly in a parenchymatous pith, and may increase in diameter, by the formation of new vascular bundles and a multi-layered protective tissue with suberized cells. The presence of such suberized tissue on the stem has been reported for the species of *Acanthostachys*, *Aechmea*, *Ananas*, *Billbergia*, *Bromelia* L. (Bromelioideae), *Dyckia* (Pitcairnioideae) and *Tillandsia* L. (Tillandsioideae) (Segecin and Scatena 2004a, Proença and Sajo 2008a), indicating that the short aerial stem probably grows in thickness as well. This growth is probably promoted by the pericycle and/or endodermis (primary thickening meristem), as occurs in other monocotyledons (Diggle and DeMason 1983, Menezes et al. 2005), including Poales such as Cyperaceae (Rodrigues and Estelita 2009), Eriocaulaceae (Scatena and Menezes 1995, Oriani et al. 2008, Oliveira and Oriani 2016) and Rapateaceae (Menezes et al. 2005). Ontogenetic studies are necessary to elucidate

the stem structure in Bromeliaceae and its relationship to the different life forms found in the family.

Regarding the leaves, characters common to the family include the presence of tetracytic stomata restricted to the abaxial surface, as well as epidermal cells with silica bodies and a small lumen (Tomlinson 1969, Sajo et al. 1998, Aoyama and Sajo 2003, Proença and Sajo 2004, 2008a, Scatena and Segecin 2005, Sousa et al. 2005). The silica bodies are frequent in monocotyledons, especially in the commelinid clade, which includes the Poales (Prychid et al. 2003). For this order, the presence of silica bodies is considered a plesiomorphic condition (Prychid et al. 2003) and also occurs in the leaf and inflorescence axis epidermis of Rapateaceae (Ferrari et al. 2014, Daltin et al. 2015), a family closely related to Bromeliaceae (Linder and Rudall 2005, Givnish et al. 2010).

The structure of the scales observed in *N. bahiana* follows the pattern reported for Bromelioideae, with respect to the number of cells in the stalk and the arrangement of cells in the shield (Tomlinson 1969, Smith and Downs 1974, Smith and Till 1998, Benzing 2000). Furthermore, the presence of elongated peripheral cells in the shield corroborates the pattern described for *Neoregelia* (Smith and Till 1998).

Another characteristic of *Neoregelia* is the spinescent leaf margin, though it is not exclusive to this genus, but a characteristic of Bromelioideae and Pitcarnioideae (Tomlinson 1969, Leme 1998). In the literature, these projections on the leaf margin are described as spines, including for *Neoregelia bahiana* (Tomlinson 1969, Leme 1998, Benzing 2000); however, we refer to them here as spinescent emergences, since they are not vascularized, but formed from both epidermal and hypodermal cells, conforming to the definition of emergences (Theobald et al. 1979, Evert 2006). Also, the use of aculeate margins as descriptive terminology is confuse, since the emergences observed are not a simple epidermal projection (i.e. not an aculeus or prickle).

Regarding the inflorescence axis, it has been studied anatomically in the species of *Acanthostachys*, *Aechmea*, *Ananas*, *Billbergia*, *Dyckia*, *Tillandsia* and *Vriesea* Lindl. (Segecin and Scatena 2004b, Proença and Sajo 2008b, Silva and Scatena 2011b) and has been termed as floral scape. However, due to the presence of nodes and internodes, as well as the presence of bracts in the nodes, we use here the term inflorescence axis. The anatomical characterisation of the inflorescence axis in the *Neoregelia bahiana* complex is similar to that described for other genera (Segecin and Scatena 2004b, Proença and Sajo 2008b, Silva and Scatena 2011b). The anatomy of the pedicel is described here for the first time for Bromeliaceae and shows to be very similar to the anatomy of the inflorescence axis,

differentiated only by the absence of vascular traces in the cortex and by the presence of wider intercellular spaces in the pith.

The presence of raphide-containing idioblasts, in both the vegetative and the reproductive organs, is another common feature of Bromeliaceae (Tomlinson 1969), being the raphides a typical calcium oxalate crystal among monocotyledons (Prychid and Rudall 1999, Prychid et al. 2008). The presence of mucilage is related to the formation of this type of crystal during the differentiation of the idioblasts (Kausch and Horner 1983, Webb et al. 1995, Prychid and Rudall 1999, Franceschi and Nakata 2005). In the *Neoregelia bahiana* complex, raphides occur in all the studied organs, in addition to small druses in the mesophyll of the leaf lamina. The type and shape of different calcium oxalate crystals are genetically regulated during cellular expansion and differentiation processes (Prychid and Rudall 1999, Franceschi and Nakata 2005) and therefore have taxonomic value.

Morphological and anatomical characters understood as adaptations to the rupicolous life form and to the environment – Considering that *Neoregelia bahiana* has a wide geographic distribution, growing on rocky outcrops, characters such as the water storage tank, roots with velamen, stolons with a suberized protective tissue, and leaves with water-storage tissue favour the rupicolous life form. Although individuals sometimes grow on trees, as observed for Populations 5 (Grão Mogol) and 7 (Serra do Cabral), the representatives of the complex cannot be classified as epiphytes, because these populations occur in areas where outcrops and large trees intersperse, and during vegetative propagation individuals that grow on the rocky outcrops emit stolons toward the tree trunks, where new ramets develop. Studies on seed dispersion, germination, and post-seminal development in different species of *Neoregelia* are necessary in order to understand whether there are distinctions and adaptations related to the establishment of rupicolous and/or epiphytic species.

The water storage tank formed by the leaves is a common feature of Bromelioideae (Benzing 2000, Schulte et al. 2009). The formation of this tank has great adaptive value for this subfamily, as it facilitates the accumulation and absorption of water and nutrients (Benzing 1970, Martin 1994). This is especially important for rupicolous species such *Neoregelia bahiana*, which grow in exposed soil with little available organic material and are subject to the climatic oscillations observed in the rocky fields.

An epivelamen with root hairs has been reported for other species of Bromeliaceae (Pita and Menezes 2002, Segecín and Scatena 2004a, Proença and Sajo 2008a, Silva and Scatena 2011a). It contributes to the fixation of the plants on the rocks and increases the

capacity to absorb water and nutrients (Peterson and Farquhar 1996). However, an epivelamen with cells undifferentiated into root hairs also occurs in *Tillandsia* (Segecin and Scatena 2004a, Proença and Sajo 2008a, Silva and Scatena 2011a) and is probably associated with the epiphytic life form of most of its species. In *N. bahiana*, the velamen as well as the outer cortex with lignified cells may favour the rupicolous life form by providing mechanical support and minimising water loss, as demonstrated for epiphytic orchids (Dycus and Knudson 1957, Zotz and Winkler 2013).

Variation in leaf size among the different populations of *Neoregelia bahiana* may be related to the sunlight incidence, as previously discussed. For other Bromelioideae species, such as *Billbergia elegans* and *Neoregelia mucugensis* from rocky fields (Pereira et al. 2013) and *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Sm. from the Atlantic Forest (Reinert et al. 2013), a statistical difference in leaf size was registered, with longer and narrower leaves in low-light conditions, as was seen in shade leaves of the *N. bahiana* complex. Furthermore, Pereira et al. (2013) observed a larger area and thickness of the lamina in shade leaves, as well as a higher stomatal density and fewer scales density. Reinert et al. (2013) also found larger leaf area and fewer spinescent emergences on the margins of shade leaves. Differences in the plant architecture have also been observed: shade plants have a larger diameter and fewer leaves in the rosette (Reinert et al. 2013). All of these results show the ability of Bromelioideae species to respond to the environment with morphological adjustments, maximising their light-harvesting capacity and growth in low-light conditions.

The scales, typical of the family (Tomlinson 1969), protect the leaf against direct sunlight and have been linked to the absorption of water and nutrients (Benzing 1970, 2000, Benzing et al. 1976, Brighigna et al. 1984). The grooves that form on the abaxial surface of the lamina are modulated by the presence or absence of scales, and they function as drainage channels for water that is then stored in the tank. In Populations 6, 7 (Serra do Cabral), 10 (Diamantina) and 12 (Serra do Cipó), the grooves in the stomatal bands reduce the stomata's exposure to the environment, and it is probable that some of the water that flows through these grooves is assimilated along the lamina due to the absorptive properties of the scales.

The epidermis and the mechanical hypodermis both with lignified thick-walled cells protect the leaf against excessive water loss and maintain the integrity of the lamina if the water-storage tissue wilt (Scatena and Segecin 2005). The well developed water-storage tissue on the adaxial surface of the lamina contribute to the survival of the plant under water stress, and simultaneously protect the chlorenchyma against significant deterioration of the photosynthetic system due to high light intensity (Smith and Downs 1974, Brighigna et al.

1984), which is common in environments such as the rocky fields. The variations in shape and size of the water-storage cells and the sinuosity of the cell walls indicate metabolic activity in the process of water storage and loss, as demonstrated for *Pitcairnia burchellii* Mez, a desiccation tolerant bromeliad species (Vieira et al. 2017), and is a common xeromorphic feature in many Cactaceae (Calvente et al. 2008).

The characteristics of the inflorescence axis and the pedicel, such as the achlorophyllous aspect, sinuous contour, thin-walled cell, and pith with aerenchyma, were interpreted as adaptations to the inclusion of these structures in the water storage tank formed by the leaves. Nogueira et al. (2015), studying the anatomy of the ovary and ovule in the Nidularioid complex, also related the formation of aerenchyma in the ovary wall to hypoxic conditions because the inflorescence is nested in the leaf rosette.

Regarding the crystals present in both the vegetative and the reproductive organs, different functions are attributed to them and related to environmental factors or to the developmental stage of the organ or tissues in which they are formed (Franceschi and Nakata 2005). Among other functions, the occurrence of these metabolites in specialised cells (idioblasts) may be related to a defence against herbivores, regulation of calcium in the cells (Franceschi and Nakata 2005), and an increase in resistance and mass of the tissues (Evert 2006). The druses present in the cells of the chlorenchyma (crystal cells) may optimise the distribution of light in this tissue, especially among the palisade cells beneath the well-developed water-storage tissue facing the adaxial surface. Assuming that cellular metabolism during the photosynthesis and transpiration processes, as well as calcium availability in the environment, stimulate crystal formation (Franceschi and Nakata 2005), the presence or absence, size and abundance of these crystals may be related to the age of the leaf and to chemical characteristics of the substrate.

In conclusion, our results demonstrate the morphological and anatomical versatility of the *Neoregelia bahiana* complex, pointing to adaptive characters related to the rupicolous life form, different light conditions, water and nutrients availability, as well as characters with taxonomic value. From the evolutionary perspective, it is difficult to establish whether the populations of this complex can be considered as isolated entities, though the results presented here suggest the occurrence of speciation in some populations.

Acknowledgments – The authors thank CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for the financial support (#455510/2014-8). We also thank NAP/MEPA -

ESALQ/USP for the use of the scanning electron microscope, Marcos Vinicius Dantas de Queiroz and Kaire de Oliveira Nardi for assistance in the fieldwork, and the two anonymous referees for their valuable comments and suggestions on previous version of the manuscript.

Conflict of interest – The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Aoyama, E. M. and Sajo, M. G. 2003. Estrutura foliar de *Aechmea* Ruiz & Pav. subgênero *Lamprococcus* (Beer) Baker e espécies relacionadas (Bromeliaceae). – Braz. J. Bot. 26: 461-473.
- Appenzato da Glória, B. 2015. Morfologia de sistemas subterrâneos de plantas. – 3i Editora.
- Benzing, D. H. 1970. Foliar permeability and the absorption of minerals and organic nitrogen by certain tank bromeliads. – Bot. Gaz. 131: 23-31.
- Benzing, D. H. 2000. Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation. – Cambridge University Press.
- Benzing, D. H. et al. 1976. The absorptive capacities of bromeliad trichomes. – Am. J. Bot. 63: 1009-1014
- BFG – The Brazil Flora Group. 2015. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. – Rodriguésia 66: 1085-1113.
- Brighigna, L. et al. 1984. Structural characteristics of mesophyll in some *Tillandsia* species. – Phytomorphology 34:191-200.
- Bukatsch, F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. – Mikrokosmos 61: 255.
- Calvente, A. et al. 2008. Stem anatomy of *Rhipsalis* (Cactaceae) and its relevance for taxonomy. – Plant Syst. Evol. 276: 271-277.
- Chamberlain, C. J. 1932. Methods in plant histology. – The University of Chicago Press.
- Close, D. C. and Beadle, C. L. 2003. The ecophysiology of foliar anthocyanin. – Bot. Rev. 69: 149-161.
- Daltin, A. L. et al. 2015. Leaf and inflorescence axis anatomy of Brazilian species of Rapateoideae (Rapateaceae, Poales). – An. Acad. Bras. Ciênc. 87: 157-171.
- Dai, Y. et al. 2009. Effects of shade treatments on the photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence, and chlorophyll content of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg. – Environ. Exper. Bot. 65: 177-182.

- Diggle, P. K. and DeMason, D. A. 1983. The relationship between the primary thickening meristem and secondary thickening meristem in *Yucca whipplei* Torr. I. Histology of the mature vegetative stem. – Am. J. Bot. 1195-1204.
- Dycus, A. M. and Knudson, L. 1957. The role of the velamen of the aerial roots of orchids. – Bot. Gaz. 119: 78-87.
- Evert, R. F. 2006. Esau's plant anatomy. Meristems, cells and tissues of the plant body – their structure function and development. – Wiley-Interscience.
- Faria, A. P. G. et al. 2012. Leaf anatomy and its contribution to the systematic of *Aechmea* subgenus *Macrochordion* (de Vriese) Baker (Bromeliaceae). – An. Acad. Bras. Ciênc. 84: 961-971.
- Feder, N. and O'Brien, T. P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. – Am. J. Bot. 55: 123-142.
- Ferrari, R. C. et al. 2014. Leaf and inflorescence peduncle anatomy: a contribution to the taxonomy of Rapateaceae. – Plant Syst. Evol. 300: 1579-1590.
- Franceschi, V. R. and Nakata, P. A. 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. – Annu. Rev. Plant Biol. 56: 41-71.
- Gerrits, P. O and Smid, L. 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. – J. Microsc. 132: 81-85.
- Givnish, T. J. et al. 2010. Assembling the tree of the monocotyledons: plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. – Ann. Mo. Bot. Gard. 97: 584-616.
- Horres, R. et al. 2007. Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) – Evidence from molecular and anatomical studies. – Aliso 23: 27-43.
- Johansen, D. A. 1940. Plant microtechnique. – McGraw Hill Book.
- Kausch, A. P. and Horner, H. T. 1983. The development of mucilaginous raphide crystal idioblasts in young leaves of *Typha angustifolia* L. (Typhaceae). – Am. J. Bot. 70: 691-705.
- Leme, E. M. C. 1998. *Canistropsis*. Bromélias da Mata Atlântica. – GMT Editores Ltda.
- Linder, H. P. and Rudall, P. J. 2005. Evolutionary history of Poales. – Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst. 36: 107-124.
- Males, J. 2018. Concerted anatomical change associated with crassulacean acid metabolism in the Bromeliaceae. – Funct. Plant Biol. Doi: 10.1071/FP17071.
- Martin, C. E. 1994. Physiological Ecology of the Bromeliaceae. – Bot. Rev. 60: 1-82.

- Menezes, N. L. et al. 2005. Meristematic activity of the endodermis and the pericycle in the primary thickening in monocotyledons. Considerations on the “PTM”. – An. Acad. Bras. Ciênc. 77: 259-274.
- Monteiro, R. F. et al. 2011. Leaf structure of *Bromelia* and its significance for the evolution of Bromelioideae (Bromeliaceae). – Plant Syst. Evol. 293: 53-64.
- Nogueira, F. M. et al. 2015. Ovary and ovule anatomy in the nidularioid complex and its taxonomic utility (Bromelioideae: Bromeliaceae). – Bot. J. Linn. Soc. 177: 66-77.
- O’Brien, T. P. Et al. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. – Protoplasma 59: 368-373.
- Oliveira, F. M. G. and Oriani, A. 2016. Anatomical characterization of vegetative organs and scapes of *Rondonanthus* (Eriocaulaceae, Poales). – Braz. J. Bot. 39: 1103-1115.
- Oriani, A. et al. 2008. Morphological architecture of *Actinocephalus* (Koern.) Sano (Eriocaulaceae-Poales). – Flora 203: 341-349.
- Pereira, T. A. R. et al. 2013. Leaf morpho-anatomical variations in *Billbergia elegans* and *Neoregelia mucugensis* (Bromeliaceae) exposed to low and high solar radiation. Botany 91: 327-334.
- Peterson, R. L. and Farquhar, M. L. 1996. Root hairs: specialized tubular cells extending root surfaces. – Bot. Rev. 62: 1-40.
- Pierce, S. et al. 2002. Carbon isotope ratio and the extent of daily CAM use by Bromeliaceae. – New Phytol. 156: 75-83.
- Pita, P. B. and Menezes, N. L. 2002. Anatomia da raiz de espécies de *Dyckia* Schult. f. e *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil), com especial referência ao velame. – Braz. J. Bot. 25: 25-34.
- Proença, S. L. and Sajo, M. G. 2004. Estrutura foliar de espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. – Acta Bot. Bras. 18: 319-331.
- Proença, S. L. and Sajo, M. G. 2007. Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. – Acta Bot. Bras. 21: 657-673.
- Proença, S. L. and Sajo, M. G. 2008a. Rhizome and root anatomy of 14 species of Bromeliaceae. – Rodriguésia 59: 113-128.
- Proença, S. L. and Sajo, M. G. 2008b. Anatomy of the floral scape of Bromeliaceae. – Braz. J. Bot. 31: 399-408.
- Prychid, C. J. and Rudall, P. J. 1999. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematic. – Ann. Bot. 84: 725-739.

- Prychid, C. J. et al. 2003. Systematics and biology of silica bodies in monocotyledons. – Bot. Rev. 69: 377-440.
- Prychid, C. J. et al. 2008. Cellular ultrastructure and crystal development in *Amorphophallus* (Araceae). – Ann. Bot. 101: 983-995.
- Reinert, F. et al. 2013. Are Sun- and shade-type anatomy required for the acclimation of *Neoregelia cruenta*? – An. Acad. Bras. Ciênc. 85: 561-573.
- Rodrigues, A. C. and Estelita, M. E. M. 2009. Diferenciação dos feixes vasculares e dos elementos traqueais no rizoma de algumas Cyperaceae. – Braz. J. Bot. 32: 349-359.
- Sajo, M. G. et al. 1998. Aspectos estruturais de folhas de bromélias e suas implicações no agrupamento de espécies. – In: Leme, E. M. C. (ed.), *Canistropsis*. Bromélias da Mata Atlântica. GMT Editores Ltda, pp. 102-111.
- Santos-Silva, F. et al. 2014. Invasion of the South American dry diagonal: What can the leaf anatomy of Pitcairnioideae (Bromeliaceae) tell us about it? – Flora 208: 508-521.
- Santos-Silva, F. et al. 2017. Nested in chaos: insights on the relations of the “Nidularioid Complex” and the evolutionary history of *Neoregelia*. – Brittonia 69: 133-147.
- Sass, J. E. 1951. Botanical microtechnique. – The Iowa State College Press.
- Scatena, V. L. and Menezes, N. L. 1995. Aspectos morfológicos e anatômicos do caule em espécies de *Syngonanthus* Ruhl. Eriocaulaceae. – Bol. Bot. Univ. São Paulo 14: 91-107.
- Scatena, V. L. and Segecin, S. 2005. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. – Braz. J. Bot. 28: 635-649.
- Schulte, K. et al. 2009. Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. – Mol. Phylogenet. Evol. 51: 327-339.
- Segecin, S. and Scatena, V. L. 2004a. Morfoanatomia de rizomas e raízes de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, PR, Brasil. – Acta Bot. Bras. 18: 253-260.
- Segecin, S. and Scatena, V. L. 2004b. Anatomia de escapos de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais do Paraná, Brasil. – Braz. J. Bot. 27: 515-525.
- Silva, I. V. and Scatena, V. L. 2011a. Anatomia de raízes de nove espécies de Bromeliaceae (Poales) da região amazônica do estado de Mato Grosso, Brasil. – Acta Bot. Bras. 25: 618-627.
- Silva, I. V. and Scatena, V. L. 2011b. Anatomia de escapos de espécies de Bromeliaceae da Amazônia, Mato Grosso, Brasil. – Hoehnea 38: 51-59.
- Smith, L. B. and Downs, R. J. 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). – Flora Neotropica Monograph 14: 1-658.

- Smith, L. B. and Downs, R. J. 1979. Bromelioideae (Bromeliaceae). – Flora Neotropica Monograph 14: 1493-2142.
- Smith, L. B. and Till, W. 1998. Bromeliaceae. – In: Kubitzki (ed.), The families and genera of vascular plants IV. Springer, pp. 74-99.
- Sousa, G. M. et al. 2005. Anatomia foliar de espécies brasileiras de *Aechmea* subg. *Chevaliera* (Gaudich. ex Beer) Baker, Bromelioideae – Bromeliaceae. – Braz. J. Bot. 28: 603-613.
- Theobald, W. L. et al. 1979. Trichome description and classification. – In: Metcalfe, C. R. and Chalk, L. (eds.), Anatomy of the dicotyledons. Clarendon Press, pp. 40-53.
- Tomlinson, P. B. 1969. III Commelinales-Zingiberales. – In: Metcalfe, C. R. (ed.), Anatomy of the monocotyledons. Clarendon Press, pp 193-294.
- Versieux, L. M. et al. 2008. Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. – Megadiversidade 4: 99-110.
- Versieux, L. M. et al. 2010. *Alcantarea* (Bromeliaceae) leaf anatomical characterization and its systematic implications. – Nord. J. Bot. 28: 385-397.
- Vieira, E. A. et al. 2017. Mechanisms of desiccation tolerance in the bromeliad *Pitcairnia burchellii* Mez: biochemical adjustments and structural changes. – Plant Physiol. Biochem. 121: 21-30.
- Webb, M. A. et al. 1995. The intravacuolar organic matrix associated with calcium oxalate crystals in leaves of *Vitis*. – The Plant J. 7: 633-648.
- Zotz, G. and Winkler, U. 2013. Aerial roots of epiphytic orchids: the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. – Oecologia 171: 733-741.

Illustrations

Figure 1. Distribution of the studied populations of *Neoregelia bahiana* complex. (BA, Bahia; MG, Minas Gerais; 1-12, collection points, according data from Table 1).

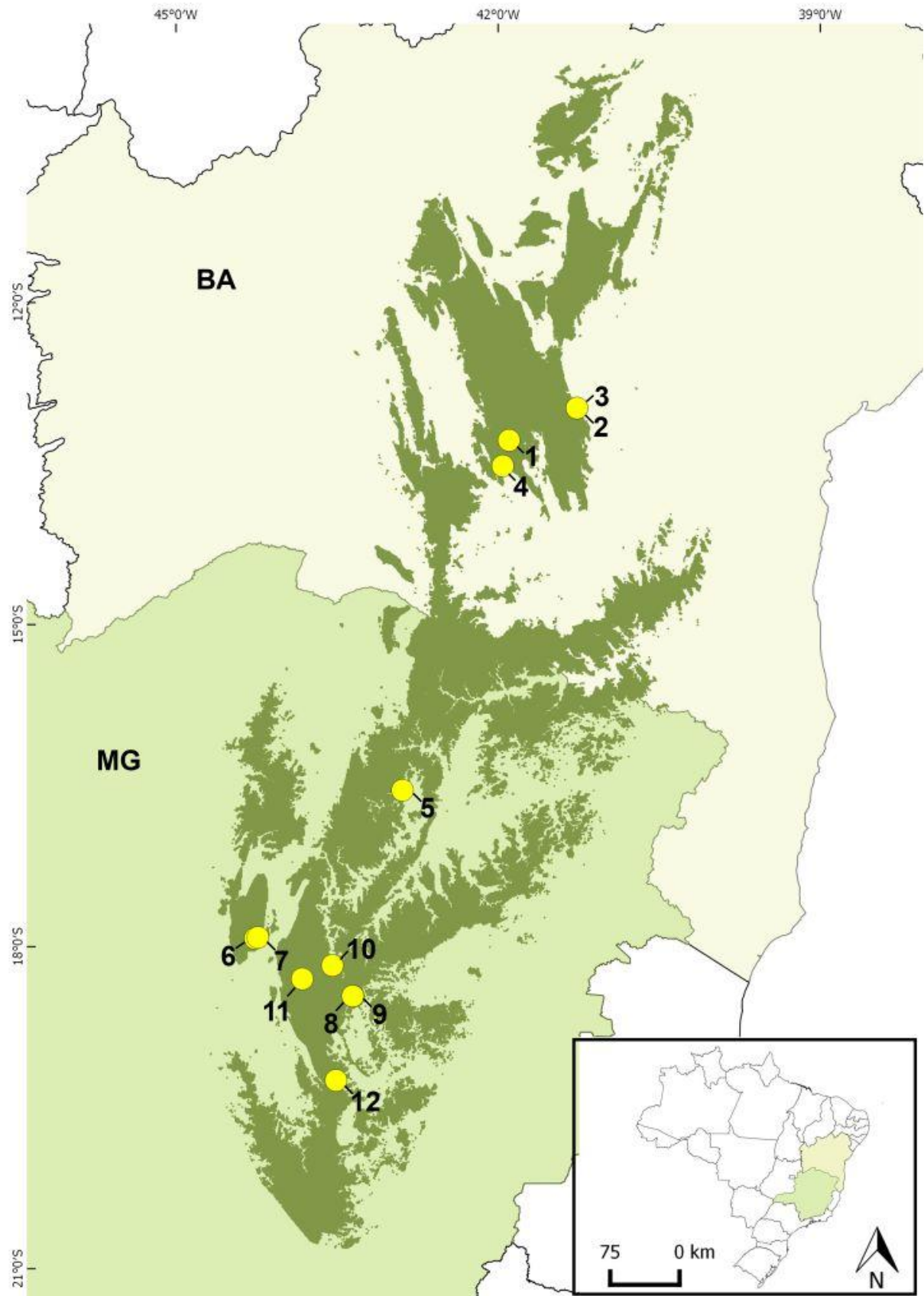


Figure 2. *Neoregelia bahiana* complex, habit and vegetative morphology. (a)-(b) habit, (c)-(d) detail of the leaf rosette, (e) individual in the reproductive stage, showing a short aerial stem with spirally arranged leaves surrounding a short inflorescence axis (peduncle), and a stolon with a new ramet. (a), (e) Population 12 (Serra do Cipó, MG); (b) Population 5 (Grão Mogol, MG); (c) Population 2 (Mucugê, BA); (d) Population 10 (Diamantina, MG). Arrow = stolon. Scale Bars = 5 cm.



Figure 3. *Neoregelia bahiana* complex, leaf morphology. (a)-(c) leaf rosettes, showing erect ascending laminae (a-b), present in most of populations, and suberect-patent laminae (c), a diagnostic character of Population 11, (d) leaf morphology variation (1- lanceolate lamina with a wide sheath; 2- rounded to oblong lamina, with a wide sheath; 3 and 4- linear lamina, with a narrow sheath). (a), (d3) Population 4 (Rio de Contas, BA); (b), (d1) Population 6 (Serra do Cabral, MG); (c), (d2) Population 11 (Diamantina, MG); (d4) Population 9 (Santo Antônio do Itambé, MG). Arrows = stolon, arrowheads = adventitious roots. Scale Bars = 5 cm.



Figure 4. *Neoregelia bahiana* complex, roots in cross (a)-(c) and longitudinal (d) sections. (a) general aspect, (b) epidermis, velamen and cortex, with a detail showing a sclereid and conspicuous intercellular spaces in the inner cortex, (c) detail of the vascular cylinder, (d) detail of the cortical idioblasts containing raphides and polysaccharides. Arrow = PAS positive reaction, Arrowhead = sclereid, roots c = cortex, en = endodermis, ic = inner cortex, mc = median cortex, mx = metaxylem vessel element, oc = outer cortex, p = pith, ph = phloem, vc = vascular cylinder, v = velamen, * = idioblasts. Scale Bars = (a) 500 μm ; (b), (c) 100 μm ; (b-detail), (d) 50 μm .

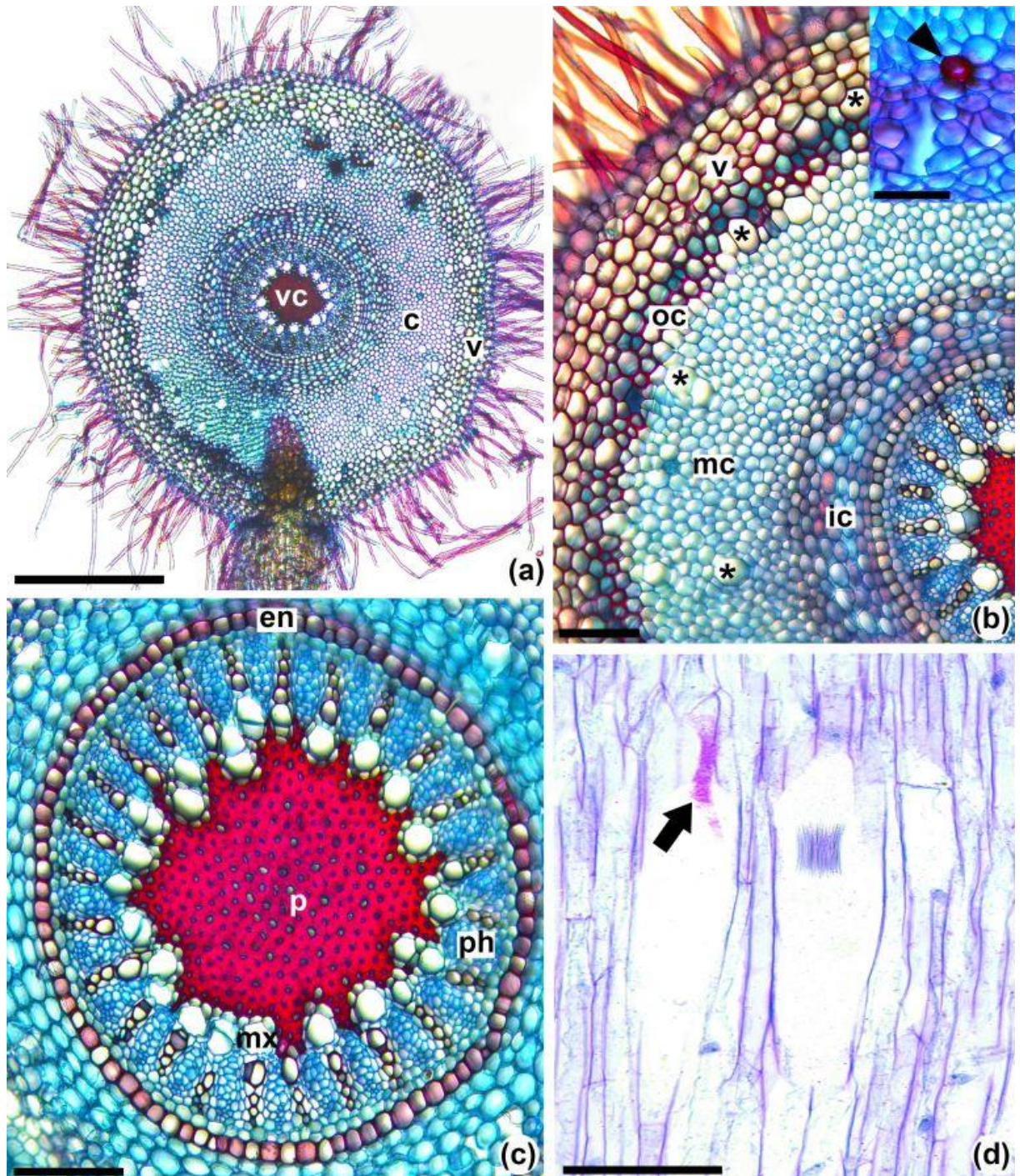


Figure 5. *Neoregelia bahiana* complex, stolon in cross sections of its distal (b), (e)-(f), (k) and middle portion (a), (c)-(d), (g)-(j). (a) general aspect, (b) detail of the epidermis, (c)-(d) formation of a multi-layered protective tissue, (e) detail of the cortical cells, (f)-(g) detail of the cortex and vascular cylinder, (h) detail of a collateral vascular bundle, (i) detail of a cortical fiber bundle, (j) detail of the pith cells containing starch grains, (k) cortical root. Arrows = silica bodies, c = cortex, fb = fiber bundle, pe = pericycle, mc = multi-layered cork, vc = vascular cylinder, v = velamen, vt = vascular trace, * = idioblasts. Scale Bars = (a) 0.5 cm; (b)-(e), (h)-(j) 50 μ m; (f)-(g) 500 μ m; (k) 200 μ m.

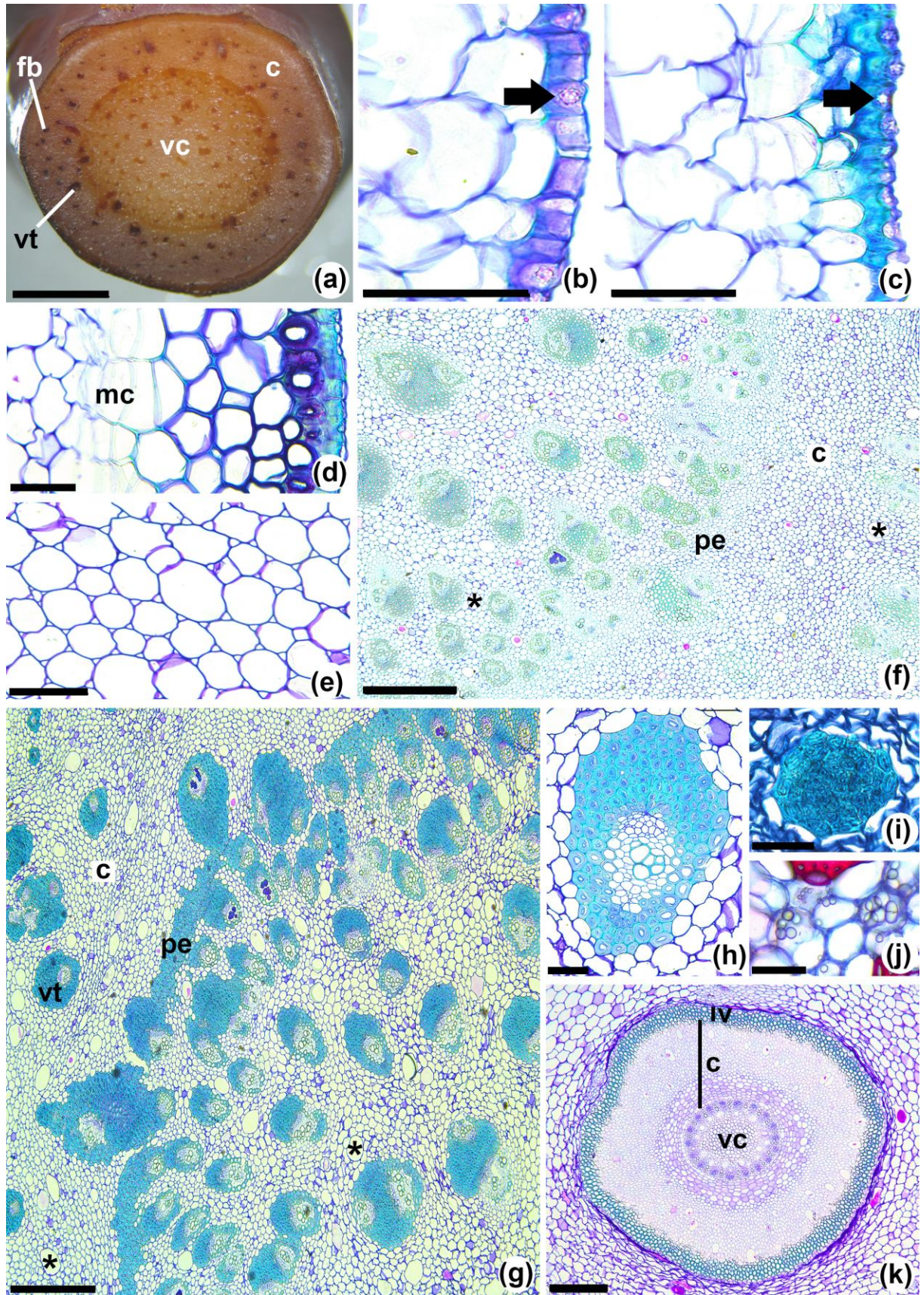


Figure 6. *Neoregelia bahiana* complex, leaves in cross (a)-(i), (k) and longitudinal (j), (l) sections. (a), (c) general aspect of the central region of the lamina, (b), (d)-(e) general aspect of the leaf margin, (f) detail of the espinescent emergence, (g)-(h) details showing the epidermis and stomata with substomatal chamber on the abaxial surface, (i) detail showing the air lacuna alternated with vascular bundles, and a extravascular fiber strand, (j) detail of an idioblast containing raphides and polysaccharides in the chlorenchyma, (k) detail of the chlorenchyma cells containing small druses, (l) detail showing the commissural vascular bundles. (a)-(b), (f), (j), (l) Population 12 (Serra do Cipó, MG); (c)-(d), (i) Population 11 (Diamantina, MG); (e) Population 6 (Serra do Cabral, MG); (g), (k) Population 3 (Mucugê, BA); (h) Population 4 (Rio de Contas, BA). Arrow = druse, arrowheads = arm cells, al = air lacuna, cb = commissural vascular bundle, cl = chlorenchyma, em = emergence, fc = fiber cap, h = hypodermis, mh = mechanical hypodermis, vb = vascular bundle, wt = water-storage tissue, pt = palisade tissue, * = substomatal chamber. Scale Bars = (a), (c), (e) 500 μm ; (b), (d), (f), (l) 200 μm ; (g)-(j) 100 μm ; (k) 20 μm .

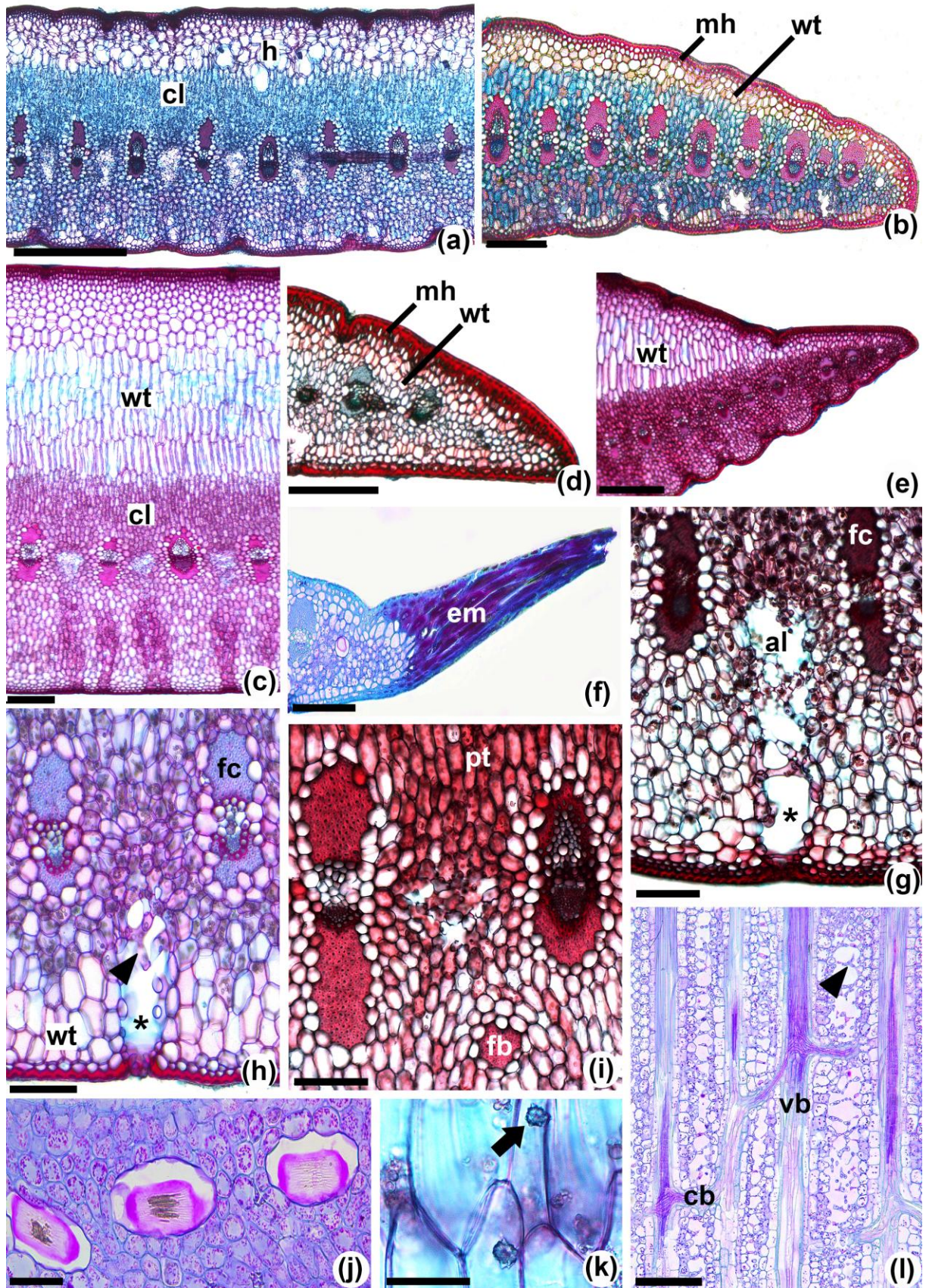


Figure 7. *Neoregelia bahiana* complex, leaf epidermis in cross (a), (c)-(d), (f) and longitudinal (e) sections, and in frontal view (b). (a) adaxial epidermis and hypodermis, (b) adaxial epidermis, with silica-containing cells, (c) costal grooves on the abaxial epidermis, (d) stomata at a level below the other epidermal cells, (e) abaxial epidermis with tetracytic stomata, (f) adaxial epidermis with a peltate scale. (a)-(b), (e)-(f) Population 12 (Serra do Cipó, MG); (c) Population 11 (Diamantina, MG); (d) Population 10 (Diamantina, MG). Arrows = silica bodies, st = stoma, wt = water-storage tissue, mh = mechanical hypodermis, cl = chlorenchyma, cg = costal groove, * = substomatal chamber. Scale Bars = 50 μ m.

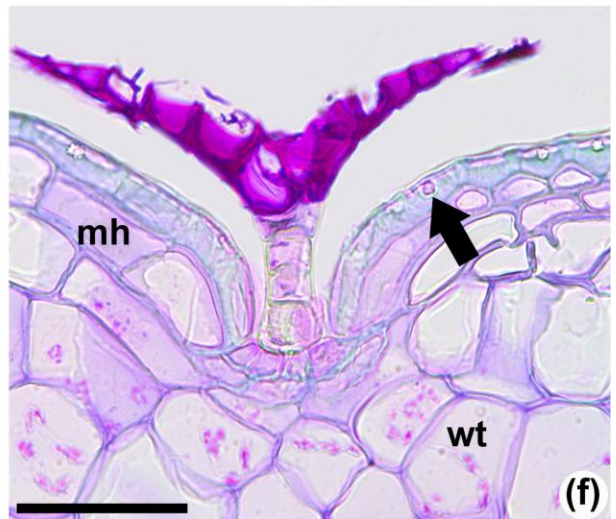
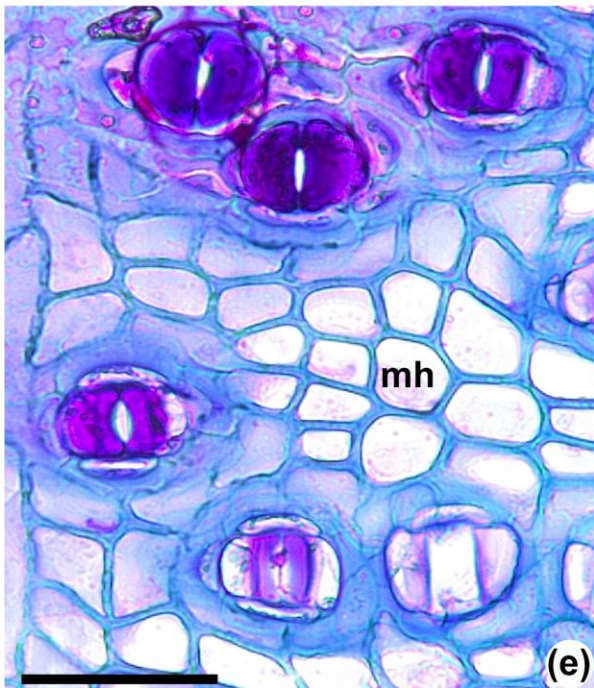
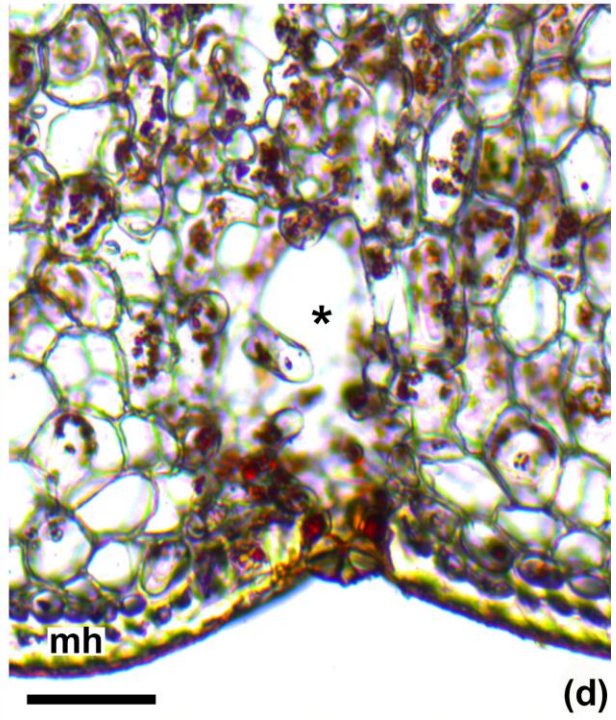
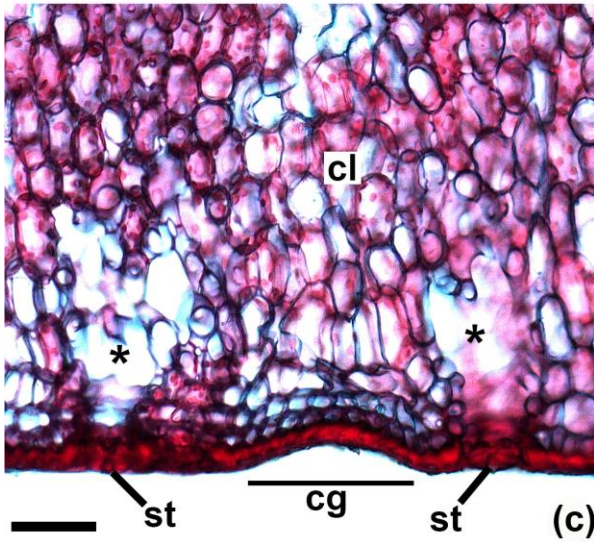
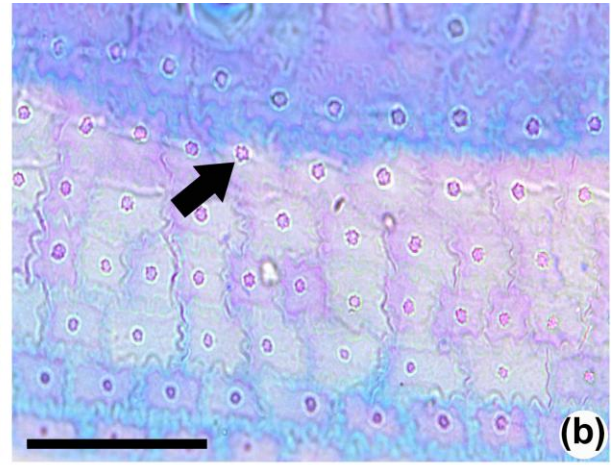
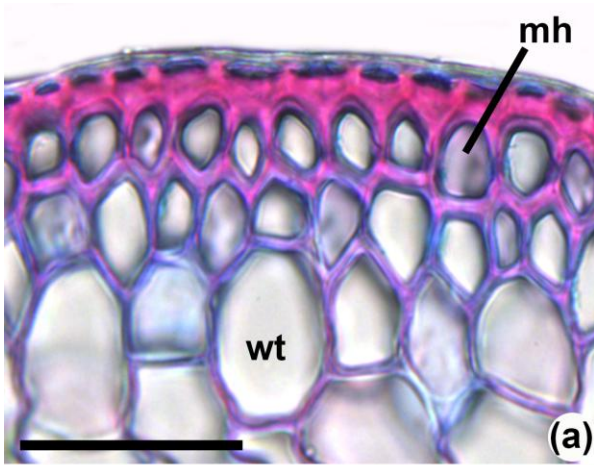


Figure 8. *Neoregelia bahiana* complex, leaf epidermis under scanning electron microscopy. (a) distribution of the peltate scales on the adaxial epidermis, (b) stomata distributed in bands on the abaxial epidermis, between the costal grooves, (c) peltate scales arranged in rows on intercostal grooves of the abaxial epidermis, (d) peltate scales arranged in bands on intercostal grooves of the abaxial epidermis, (e)-(f) peltate scales on adaxial and abaxial epidermis, respectively, showing the variation on the number of cells forming the shield, (g) detail of a peltate scale, showing the peripheral elongated cells of the shield. (a), (f) Population 12 (Serra do Cipó, MG); (b) Population 1 (Abaíra, BA); (c) Population 10 (Diamantina, MG); (d) Population 6 (Serra do Cabral, MG); (e) Population 4 (Rio de Contas, BA); (g) Population 9 (Santo Antônio do Itambé, MG). Arrowheads = stomata, cg = costal groove, ig = intercostal groove, ps = peltate scale. Scale Bars = (a) 300 μm ; (b)-(d) 200 μm ; (e)-(f) 100 μm ; (g) 50 μm .

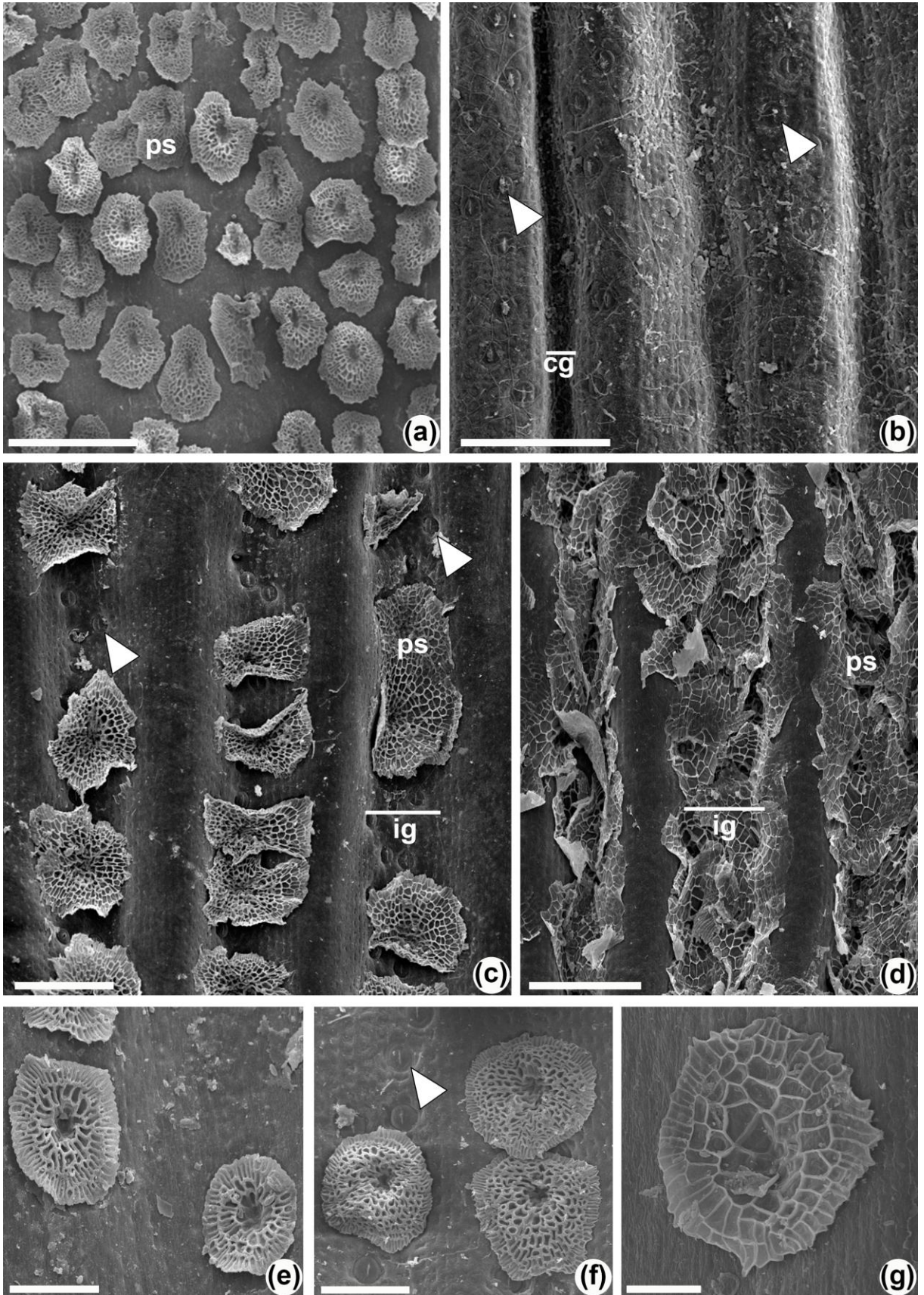


Figure 9. *Neoregelia bahiana* complex, inflorescence axis (a), (c)-(j) and pedicel (b) in cross sections. (a)-(b) general aspect, (c) detail of the cortex and vascular cylinder, (d) detail of the epidermis and outer cortex, (e) detail of a vascular trace, (f) detail of an idioblast containing raphides and polysaccharides, (g) detail of the arm cells in the pith, (h) detail of a simple vascular bundle, (i) detail of a compound vascular bundle, (j) detail showing a vascular bundle with only phloem cells (arrowhead). c = cortex, e = epidermis, ph = phloem, vc = vascular cylinder, x = xylem. Scale Bars = (a)-(b) 500 μm ; (c) 200 μm ; (d) 25 μm ; (e)-(j) 50 μm .

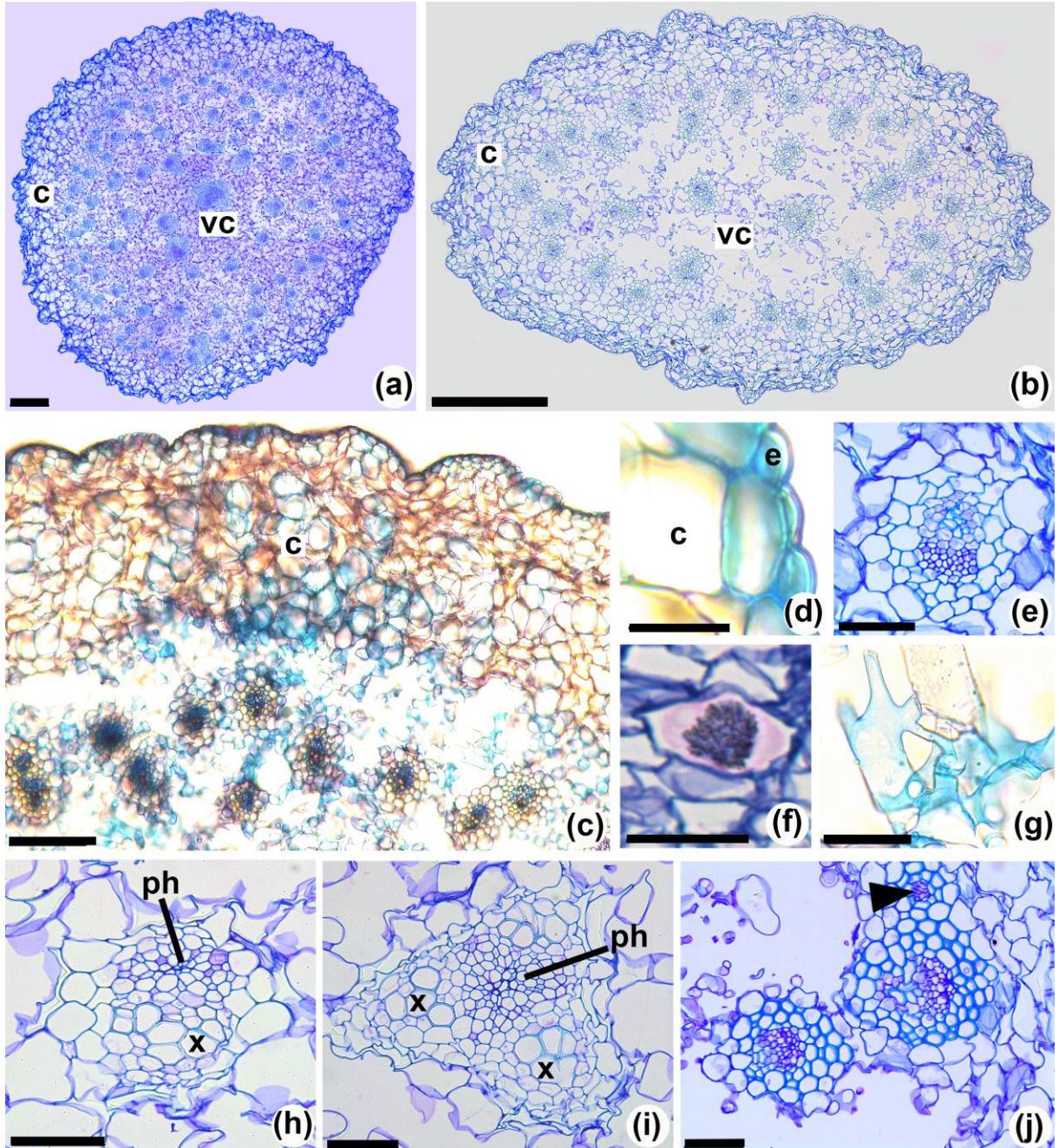


Table 1. Studied populations of the *Neoregelia bahiana* complex.

Populations	Municipalities, states	Life forms	Plant classification in relation to light incidence and environment	Geographic coordinates	Vouchers
1	Abaíra, Bahia	Rupicolous	Heliophyte, on the rocky outcrops	13°17'04,4''S 41°54'01,5''W	<i>M. V. Dantas-Queiroz et al. 135</i>
2	Mucugê, Bahia	Rupicolous	Heliophyte, on the rocky outcrops	12°58'60''S 41°15'59''W	<i>M. V. Dantas-Queiroz et al. 129</i>
3	Mucugê, Bahia	Rupicolous	Sciophyte, on the rocky outcrops with shrubby-herbaceous vegetation	12°58'60''S 41°15'59''W	<i>M. V. Dantas-Queiroz et al. 130</i>
4	Rio de Contas, Bahia	Rupicolous	Heliophyte, on the rocky outcrops	13°30'57''S 41°56'46,8''W	<i>M. V. Dantas-Queiroz et al. 147</i>
5	Grão Mogol, Minas Gerais	Rupicolous and eventually growing on trees	Heliophyte and sciophyte, on the rocky outcrops interspersed by large trees	16°32'40,9''S 42°53'27,8''W	<i>M. V. Dantas-Queiroz et al. 150</i>
6	Serra do Cabral, Minas Gerais	Rupicolous	Heliophyte, on the rocky outcrops	17°55'26,4''S 44°15'48''W	<i>M. V. Dantas-Queiroz et al. 152</i>
7	Serra do Cabral, Minas Gerais	Rupicolous and eventually growing on trees	Sciophyte, on the rocky outcrops interspersed by large trees	17°54'54,2''S 44°14'14,9''W	<i>M. V. Dantas-Queiroz et al. 151</i>
8	Santo Antônio do Itambé, Minas Gerais	Rupicolous	Heliophyte, on the rocky outcrops	18°27'44,4''S 43°20'52,3''W	<i>M. V. Dantas-Queiroz et al. 155</i>
9	Santo Antônio do Itambé, Minas Gerais	Rupicolous	Sciophyte, in gallery forests	18°27'42,4''S 43°21'18,0''W	<i>M. V. Dantas-Queiroz et al. 156</i>
10	Diamantina, Minas Gerais	Rupicolous	Heliophyte, on the rocky outcrops	18°10'33,6''S 43°32'38,0''W	<i>M. V. Dantas-Queiroz et al. 154</i>
11	Diamantina, Minas Gerais	Rupicolous	Heliophyte and sciophyte, on the rocky outcrops interspersed by large trees	18°18'04,4''S 43°49'30,6''W	<i>M. V. Dantas-Queiroz et al. 153; K. R. Silva et al. 85</i>
12	Serra do Cipó, Minas Gerais	Rupicolous	Heliophyte, on the rocky outcrops	19°14'48,75''S 43°30'36,7''W	<i>K. R. Silva & K. O. Nardi 75</i>

Table 2. Interpopulational variations in plant architecture and leaf morphology in the *Neoregelia bahiana* complex.

Populations	Average size of the leaf rosette (cm)	Leaf					
		Morphology			Anatomy		
	Height x diameter (cm)	Total length x width of the lamina (cm)	Colour of the apex	Shape and position of the lamina; shape of the margin in cross section	Number of cell layers of the water-storage tissue	Shape of water-storage cells in the marginal region of the lamina	Air channels between the vascular bundles
1	13,17±0,76 x 4,50±0,00	12,28±1,43 x 2,32±0,30	Green	Linear, erect-ascending, with obtuse to acute margins	4-6	Rounded	Absent
2	14,50±1,50 x 7,67±1,16	13,11±1,19 x 1,87±0,28	Green	Linear, erect-ascending, with obtuse to acute margins	4-6	Rounded	Absent
3	18,33±4,04 x 27,00±2,65	25,50±3,81 x 1,54±0,25	Green	Linear, erect-ascending, with obtuse to acute margins	4-6	Rounded	Present, large
4	16,83±1,89 x 5,33±0,76	13,94±1,36 x 2,70±0,28	Reddish green	Linear, erect-ascending, with obtuse to acute margins	4-6	Rounded	Absent
5	19,50±3,12 x 17,17±3,25	21,44±1,51 x 2,80±0,32	Reddish green	Linear, erect-ascending, with obtuse to acute margins	4-6	Rounded	Present, small
6	19,50±2,18 x 10,33±0,76	14,73±1,05 x 2,50±0,38	Green or reddish green	Lanceolate, erect-ascending, with acute margins	> 10	Anticlinally elongated	Present, small
7	18,23±2,58 x 30,03±4,32	32,16±5,50 x 1,70±0,45	Green or reddish green	Lanceolate, erect-ascending, with acute margins	> 10	Anticlinally elongated	Present, large

8	15,00±2,29 x 8,50±1,73	13,91±3,30 x 3,64±0,30	Pinkish	Linear, erect- ascending, with obtuse to acute margins	4-6	Rounded	Absent
9	21,50±1,32 x 11,9±3,50	23,22±3,26 x 2,59±0,56	Green or pinkish	Linear, erect- ascending, with obtuse to acute margins	4-6	Rounded	Present, small
10	22,83±5,80 x 12,50±0,87	18,83±2,57 x 3,77±0,48	Pinkish	Linear, erect- ascending, with obtuse to acute margins	4-6	Rounded	Present, large
11	17,83±2,84 x 13,33±3,69	17,83±3,59 x 4,21±0,28	Green or reddish green	Rounded to oblong, suberect-patent, with acute margins	> 10	Rounded	Present, large or small
12	21,50±1,50 x 13,17±1,04	24,19±2,94 x 3,49±0,53	Pinkish	Linear, erect- ascending, with obtuse to acute margins	4-6	Rounded	Present, large

Table 3. Distribution of the peltate scales in the leaves of the studied populations of *Neoregelia bahiana* complex.

Populations	Adaxial surface	Abaxial surface
1	Numerous scales arranged in rows	Absent
2	Numerous scales arranged in rows	Absent
3	Sparse scales arranged in rows	Absent
4	Numerous scales arranged in rows	Absent
5	Numerous scales arranged in rows	Absent
6	Numerous scales arranged in rows	Numerous scales arranged in bands, with shields overlapping
7	Numerous scales arranged in rows	Numerous scales arranged in bands, with shields overlapping
8	Numerous scales arranged in rows	Absent
9	Numerous scales arranged in rows	Absent
10	Numerous scales arranged in rows	Numerous scales arranged in rows
11	Numerous scales arranged in rows	Absent
12	Numerous scales arranged in rows	Numerous scales arranged in rows

Capítulo 2

Variações morfológicas e anatômicas de raiz, folha, eixo da inflorescência e bráctea no complexo *Vriesea oligantha* (Bromeliaceae): perspectivas para a taxonomia e aspectos adaptativos

² Manuscrito a ser submetido ao periódico *Brittonia*

Resumo: *Vriesea* se destaca como um dos gêneros com maior diversidade morfológica de Bromeliaceae, incluindo espécies de difícil reconhecimento, muitas delas formando complexos, como *Vriesea oligantha*. Considerando que caracteres morfológicos e anatômicos de órgãos vegetativos e reprodutivos têm valor para a taxonomia e filogenia da família, estudou-se neste trabalho raízes, folhas, eixo da inflorescência e brácteas de diferentes populações de Minas Gerais e Bahia, Brasil, com enfoque taxonômico e ecológico. Anatomicamente, as raízes de todos os indivíduos analisados apresentam velame, córtex heterogêneo e cilindro vascular poliarco, semelhante ao observado nas demais espécies da família. As folhas apresentam hipoderme aquífera em ambas as faces e parênquima clorofiliano com células braciiformes formando canais de ar entre os feixes vasculares colaterais. O eixo da inflorescência apresenta córtex parenquimático e atactostelo. A presença de feixes de fibras subepidérmicos nas folhas diferencia as populações de Minas Gerais daquelas da Bahia. A análise de similaridade (WPGMA) baseada em dados morfológicos das folhas e no diâmetro do tanque indica a presença de quatro grupos, apontando a existência de mais de uma espécie no complexo. Caracteres como o formato da margem e coloração das folhas e brácteas mostraram-se relacionados ao ambiente, apresentando variação intrapopulacional. Raízes com velame desenvolvido e folhas com amplas bainhas e com lâminas densamente recobertas por escamas, além de mesofilo com hipoderme aquífera mais desenvolvida que o parênquima clorofiliano mostram-se como estratégias relacionadas à manutenção do suprimento hídrico, como adaptações ao hábito epifítico ou rupícola.

Palavras-chave: anatomia, campos rupestres, *Vriesea lancifolia*, *Vriesea pseudoligantha*, epífitas, WPGMA.

Introdução

Bromeliaceae inclui 58 gêneros e cerca de 3400 espécies (Luther 2014). Muitos dos seus representantes são difíceis de serem reconhecidos quando em estado vegetativo ou mesmo em estado reprodutivo, formando complexos de espécies (Versieux et al. 2008; Costa et al. 2009; Gomes-da-Silva et al. 2012).

Vriesea Lindl. (Tillandsioideae) se destaca como um dos gêneros com maior diversidade morfológica, incluindo cerca de 300 espécies (Costa et al. 2014; Luther 2014), predominando a forma de vida epífita (Benzing 2000). Seus representantes ocorrem preferencialmente em ambientes méxicos, como a Mata Atlântica (Martinelli et al. 2008), mas podem ocorrer também em ambientes xéricos, como os campos rupestres (Costa et al. 2009), onde se destacam os representantes do complexo *Vriesea oligantha*, que são endêmicos da Cadeia do Espinhaço, nos Estados de Minas Gerais e Bahia, Brasil (Versieux et al. 2008; BFG 2015). Apesar do elevado número de espécies no gênero e da importância de estudos anatômicos para o conhecimento do grupo, apenas cerca de 5% das espécies de *Vriesea* já foram investigadas quanto aos aspectos anatômicos, abrangendo órgãos vegetativos, como raízes, caules (Proença e Sajo 2008a) e folhas (Benzing e Burt 1970; Braga 1977; Reinert e Meirelles 1993; Arruda e Costa 2003; Proença e Sajo 2007; Derwidueé e Gonzalez 2010; Gomes-da-Silva et al. 2012), e reprodutivos, como o eixo da inflorescência (Proença e Sajo 2008b). Neste contexto, análises anatômicas, em conjunto com aspectos morfológicos, mostram-se úteis, principalmente para subsidiar análises filogenéticas do gênero, como já realizado para *Bromelia* L. (Monteiro et al. 2011), *Quesnelia* Gaudich. (Almeida et al. 2009; Mantovani et al. 2012), para a subfamília Bromelioideae (Horres et al. 2007) e para o complexo Nidularioide (Santos-Silva et al. 2017), cujas filogenias basearam-se tanto em caracteres moleculares quanto morfológicos e anatômicos. Caracteres morfológicos e anatômicos de órgãos vegetativos e reprodutivos também têm sido utilizados para resolver diferentes complexos de espécies, como visto em *Vriesea paraibica* (Costa et al. 2009) e *Vriesea corcovadensis* (Gomes-da-Silva et al. 2012), além de *Neoregelia bahiana* (Silva et al. 2018), que também ocorre nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, em simpatria com os representantes do complexo *Vriesea oligantha* (Versieux et al. 2008; BFG 2015).

Vriesea oligantha (Baker) Mez, *V. lancifolia* (Baker) L.B.Sm. e *V. pseudoligantha* Philcox formam um grupo críptico por compartilharem caracteres vegetativos e reprodutivos e formas de vida (epífita e rupícola), além de ocorrerem simpatricamente (Versieux et al. 2008).

Assim, a análise anatômica de órgãos vegetativos e reprodutivos é necessária para a caracterização do grupo e delimitação das espécies.

Estudou-se neste trabalho a morfologia e anatomia de raiz, folha, eixo da inflorescência (pedúnculo) e bráctea de diferentes populações do complexo *Vriesea oligantha*, buscando indicar quais caracteres apresentam valor taxonômico a nível específico e quais caracteres podem ser interpretados como adaptações ao ambiente e ao hábito epifítico.

Material e métodos

Indivíduos de diferentes populações do complexo *Vriesea oligantha* foram coletados em áreas de campos rupestres na Bahia, nos municípios de Abaíra, Jacobina, Miguel Calmon, Morro do Chapéu, Mucugê e Rio de Contas e, em Minas Gerais, na Serra do Cabral, Serra do Cipó, Serra de Ouro Branco, no planalto de Diamantina e no Município de Grão Mogol (Tabela 1). A Figura 1A apresenta o mapa da distribuição das populações, construído a partir de sistema de georreferenciamento (QGIS ver. 2.12.3), baseado nas coordenadas geográficas dos pontos de coleta. Material testemunho foi depositado no Herbarium Rioclarense (HRCB) da Universidade Estadual Paulista. Parte dos indivíduos coletados foi mantida em cultivo em casa de vegetação para se observar variações na estrutura da folha e arquitetura da planta. Para o estudo anatômico e sob microscopia eletrônica de varredura, amostras foram fixadas em FAA 50 (formaldeído 37%, ácido acético glacial, etanol 50%, 1:1:18 v/v; Johansen 1940) e armazenadas em etanol 70%.

Foram analisadas amostras de raízes (região apical e mediana), assim como da região mediana de folhas e brácteas expandidas (margem e região central da lâmina) e eixos da inflorescência (entrenó na região mediana) de pelo menos três indivíduos por população. As brácteas foram retiradas da região mediana do eixo da inflorescência – brácteas pedunculares. As amostras foram desidratadas em série n-butílica, incluídas em (2-hidroxietil)-metacrilato (Leica Historesin Embedding Kit) (Gerrits e Smid 1983) e seccionadas de forma paradérmica, transversal e longitudinal em micrótomo rotativo (Leica RM 2245), com 6-8 µm de espessura. Essas secções foram coradas com ácido periódico – reativo de Schiff (PAS) e azul de toluidina (O'Brien et al. 1964; Feder e O'Brien 1968) e montadas em lâminas permanentes com Entellan (Merck). Também foram realizadas secções transversais e longitudinais à mão livre, as quais foram clarificadas com hipoclorito de sódio (20%), coradas com azul de Astra e Safranina (Bukatsch 1972) e montadas em gelatina glicerizada. Testes histoquímicos foram realizados com Sudan III para detectar lipídios (Sass 1951) e com cloreto férrico para detectar

compostos fenólicos (Johansen 1940). As imagens foram registradas com capturador de imagens (Leica, DFC 450) acoplado ao microscópio (Leica, DM 4000B), utilizando-se o programa de digitalização de imagens LAS (Leica Application Suite V4.0.0).

Para a análise sob microscopia eletrônica de varredura, amostras fixadas foram desidratadas em série etílica (80, 90 e 100%), submetidas à secagem ao ponto crítico (Balzers CPD 050) e metalizadas com ouro (Bal-Tec SCD 050). Os resultados foram documentados por meio de imagens obtidas com capturador de imagens acoplado ao microscópio (Zeiss, LEO 435 VP).

O diâmetro do tanque foi medido para três indivíduos de cada localidade. Variações qualitativas interpopulacionais das folhas (Tabela 2) foram utilizadas para análise de similaridade WPGMA, com índice de Jaccard, utilizando-se o servidor DendroUPGMA, disponível em <http://genomes.urv.cat/UPGMA/> (Garcia-Vallve et al. 1999). O coeficiente de correlação cofenética foi calculado utilizando-se a mesma ferramenta.

Resultados

Morfologia – Os indivíduos do complexo *Vriesea oligantha* podem ter forma de vida epífita (Fig. 2A-B) ou rupícola (Fig. 2C-D; Tabela 1), com caule aéreo curto e folhas que se sobrepõem formando um pequeno tanque, cujo diâmetro é $\leq 1,0$ cm nas Populações 3, 5-7 (Fig. 2E); 1,5 a 2,5 cm nas populações 8-15 (Fig. 2F); e $> 3,0$ cm nas Populações 1-2, 4 (Fig. 2G; Tabela 2). As populações 3, 5-7 (Bahia) e 14-15 (Minas Gerais) apresentam folhas eretas, lanceoladas, e com base muito alargada em relação ao ápice foliar (Figs. 1C-G3 e G4; 2A, E, H), enquanto que nas demais populações de Minas Gerais (Populações 8-13), as folhas são suberetas e estreito-lanceoladas (Figs. 1C-G2; 2C, Tabela 2). Já nas Populações 1, 2 e 4 (Bahia) as folhas são eretas, oblongas a levemente triangulares (Fig. 1C-G1) e apresentam ápice revoluto (Fig. 2B, D). O formato do ápice das folhas também é variável entre as populações, podendo ser acuminado (Fig. 1D) ou agudo (Fig. 1E; Tabela 2). Em todas as populações as folhas apresentam coloração verde-acinzentada (Figs. 1C-G2 e G3; 2A-B, D-F), podendo ser vináceas (Figs. 1C-G1 e G4; 2C, G). Alguns indivíduos apresentam ainda folhas com listras longitudinais conspícuas de coloração vinácea em ambas as faces, tanto sob condições naturais, como sob condições de cultivo (Fig. 2H). As variações de coloração da folha foram observadas dentro de uma mesma população.

No ápice caulinar desenvolve-se um longo eixo reprodutivo de coloração verde ou vinácea, que apresenta brácteas e sustenta as flores e os frutos (Fig. 2A-B). Na porção mais

basal do caule formam-se raízes adventícias (Fig. 2I). Observa-se também que ocorre propagação vegetativa, com formação de novos rametes a partir do caule (Fig. 2J). Eventualmente, foram observados brotamentos de novos rametes a partir do eixo da inflorescência (Fig. 2K).

Anatomia da raiz – As raízes apresentam tecidos organizados em velame, córtex heterogêneo e cilindro vascular (Fig. 3A, E).

O velame apresenta a camada periférica diferenciada em epivelame (Fig. 3B), o qual é formado por células de paredes delgadas, que se desintegram com a formação das camadas subsequentes (Fig. 3C-E). As células das cinco ou seis novas camadas que se formam mais internamente ao epivelame possuem paredes suberizadas (Fig. 3D-E).

O córtex externo é composto por cerca de quatro camadas de células de paredes espessadas e lignificadas (Fig. 3B-D). O córtex mediano e o córtex interno são formados por células arredondadas e parenquimáticas, de paredes delgadas (Fig. 3B, D-E). No córtex interno, observam-se espaços intercelulares conspícuos e lacunas de ar podem se formar pelo rompimento de algumas das células corticais (Fig. 3E). Idioblastos contendo ráfides ocorrem nas camadas mais externas do córtex mediano e no córtex externo (Fig. 3D-E), sendo alongados longitudinalmente (Fig. 3F). A endoderme uniestratificada é composta por células com espessamento de parede em “O” e por células de passagem (Fig. 3G-H).

O cilindro vascular é delimitado pelo periciclo uniestratificado com células de paredes delgadas (Fig. 3G, H). O cilindro vascular é poliarco e a medula é constituída por células de paredes finas e lignificadas na porção mais diferenciada da raiz (Fig. 3G).

Anatomia foliar – As folhas constituem-se de epiderme, hipoderme, parênquima clorofiliano e sistema vascular (Fig. 5A-B).

A epiderme é uniestratificada, com células de paredes delgadas a pouco espessadas na face adaxial (Fig. 5C), e com células de paredes espessadas em “U” na face abaxial (Figs. 4E; 5B, D). Já na margem da lâmina as células epidérmicas apresentam espessamento em “U” em ambas as faces (Fig. 6A-D). Em vista frontal, as células epidérmicas são quadrangulares a retangulares e suas paredes são sinuosas (Fig. 4A) em ambas as faces da folha. As folhas são hipostomáticas (Figs. 5A, D; 6A, C) e os estômatos são tetracíticos, podendo ocorrer alguns com cinco células subsidiárias (Fig. 4B). Os estômatos localizam-se no mesmo nível que as demais células epidérmicas e apresentam amplas câmaras subestomáticas conectadas aos canais de ar, que entremeiam os feixes vasculares (Figs. 4E; 5D). Escamas peltadas ocorrem

nas duas faces da lâmina (Fig. 6A, D, cabeças de seta), estão dispostas em fileiras em vista frontal da lâmina (Fig. 4F) e apresentam densidade aparentemente semelhante nas duas faces (Fig. 4G-H). Observa-se que os escudos das escamas se sobrepõem (Fig. 4G-H, K), recobrando inclusive grande parte dos estômatos. O escudo é multicelular, com quatro células centrais, circundadas por duas camadas de células periféricas (4-8-16) e ala com células alongadas (Fig. 4L-M). Em secção transversal da folha, as escamas possuem 1-2 células basais e pedículo com 3-4 células (Fig. 4Q). As células do escudo possuem parede periclinal externa espessada, com celulose (Fig. 4Q). As células do pedículo acumulam mucilagem (Fig. 4Q). Polissacarídeos, identificados positivamente com PAS, ocorrem principalmente nas células centrais (Fig. 4L).

Abaixo da epiderme observa-se hipoderme mecânica composta por uma camada de células com paredes levemente espessadas, seguida pela hipoderme aquífera bastante desenvolvida nas duas faces da folha, apresentando células de maior lume com paredes delgadas (Figs. 5A-D; 6A-D). Na face adaxial, este tecido é composto por 5-8 camadas de células arredondadas, enquanto que na face abaxial são observadas em torno de 2-4 camadas de células, geralmente mais alongadas anticlinalmente que aquelas da face adaxial (Fig. 5A). A hipoderme aquífera é interrompida pelas câmaras subestomáticas na face abaxial, as quais são conectadas aos canais de ar (Fig. 5A, D). Gotículas lipídicas ocorrem nas células da hipoderme aquífera (Fig. 5E), enquanto antocianinas podem ocorrer nas células da hipoderme mecânica. Idioblastos com ráfides e polissacarídeos ocorrem nas camadas da hipoderme voltada à face adaxial, próximas ao parênquima clorofiliano (Fig. 5F), embora sejam mais frequentes entre as células do parênquima clorofiliano (Fig. 5G-H). Feixes de fibras subepidérmicos também ocorrem na porção central da lâmina, voltados à face adaxial, nos indivíduos das populações de Minas Gerais (Fig. 5A-B; Tabela 2). O parênquima clorofiliano é formado por células braciiformes, que delimitam canais de ar entre os feixes vasculares (Fig. 5A-B). Suas células podem apresentar braços longos (Fig. 5I) ou curtos (Fig. 5J), e esta variação ocorre inclusive entre folhas de um mesmo indivíduo.

A margem da folha apresenta formato bastante variável em secção transversal, inclusive entre indivíduos de uma mesma localidade, podendo ser afilada (Fig. 6A), aguda (Fig. 6B), arredondada (Fig. 6C), ou truncada (Fig. 6D; Tabela 3). Nos indivíduos da População 14 mantidos em cultivo na casa de vegetação, as novas folhas que se desenvolveram apresentaram o formato da margem diferente daquele das folhas formadas previamente, no ambiente natural (Tabela 3). Na margem foliar ocorre hipoderme aquífera e calotas de fibras abaixo da hipoderme aquífera, voltadas à face adaxial (Fig. 6A-D).

Os feixes vasculares distribuem-se em fileira única por toda a lâmina (Figs. 5A; 6A-D). São do tipo colateral, circundados por bainha dupla, sendo a externa parenquimática e a interna esclerenquimática (Fig. 5K). Feixes vasculares comissurais também ocorrem interligando os feixes vasculares que se distribuem longitudinalmente na folha (Fig. 5L).

Anatomia do eixo da inflorescência – O eixo da inflorescência é cilíndrico, apresentando epiderme, córtex e cilindro vascular bem delimitados (Fig. 7A-B).

A epiderme é uniestratificada, com células arredondadas de paredes levemente espessadas e recobertas por cutícula espessa (Fig. 7C, G). Em vista frontal, as células epidérmicas são retangulares, de paredes retas a levemente sinuosas, e os estômatos são tetracíticos (Fig. 7F), às vezes apresentando cinco células subsidiárias. Os estômatos ocorrem no mesmo nível das demais células da epiderme (Fig. 7G).

Logo abaixo da epiderme, observam-se duas a três camadas de células de paredes levemente espessadas, celulósicas, e que podem conter compostos fenólicos e antocianinas (Fig. 7B-C). Nas demais camadas do córtex, as células apresentam paredes delgadas (Fig. 7B-C). Idioblastos com ráfides e/ou polissacarídeos (Fig. 7E-cabeça de seta), assim como traços vasculares (Fig. 7B-C) estão presentes no córtex.

O cilindro vascular é delimitado por periciclo multiestratificado, com células de paredes espessadas e lignificadas (Fig. 7B). Os feixes vasculares são colaterais, simples ou compostos, e envolvidos por células de paredes lignificadas (Fig. 7B, D). Os feixes vasculares têm distribuição aleatória na medula, caracterizando um atactostelo (Fig. 7A-B). A medula é composta por células arredondadas, de paredes delgadas, e idioblastos com ráfides podem estar presentes (Fig. 7B, D-cabeça de seta). Grãos de amido ocorrem nas células da medula (Fig. 7D, seta).

Anatomia das brácteas – As brácteas apresentam os tecidos organizados em epiderme, hipoderme aquífera, parênquima clorofiliano e sistema vascular (Fig. 6E-F).

A epiderme, em secção transversal, é uniestratificada com células de paredes delgadas a pouco espessadas (Fig. 6E-F, H). Em vista frontal, as células epidérmicas são quadrangulares a retangulares e suas paredes são sinuosas em ambas as faces da lâmina (Fig. 4D). Os estômatos, restritos à face abaxial, localizam-se no mesmo nível das demais células epidérmicas e são tetracíticos (Fig. 4D) ou às vezes apresentam cinco células subsidiárias (Fig. 4C). As escamas peltadas ocorrem nas duas faces da lâmina (Fig. 6I, cabeça de seta), apresentam 1-2 células basais, pedículo com 2-4 células e escudo multicelular (Fig. 4R). O

escudo apresenta quatro células centrais, 1-4 camadas periféricas e ala com células mais curtas do que aquelas observadas nas folhas, especialmente nas escamas distribuídas na face adaxial (Fig. 4O-P). O tamanho das escamas pode variar entre brácteas de um mesmo indivíduo e dentro de uma mesma bráctea (Fig. 4N). A densidade das escamas é visualmente maior na face abaxial (Fig. 4J), quando comparada com a face adaxial (Fig. 4I). As células do escudo possuem parede periclinal externa espessada, com celulose (Fig. 4R), e polissacarídeos foram identificados pela reação positiva com PAS, principalmente nas células centrais.

A hipoderme aquífera é bastante desenvolvida nas duas faces e, diferentemente da folha, pode apresentar número de camadas de células semelhante ou maior na face abaxial, na região central da lâmina (Fig. 6E-F). Já na face adaxial, principalmente na região central da lâmina, podem ocorrer canais secretores, localizados entre e/ou acima dos feixes vasculares (Fig. 6F) e distribuídos longitudinalmente na lâmina (Fig. 6G). A formação desses canais se dá pelo rompimento das células da hipoderme, podendo atingir os canais de ar (Fig. 6F), e a secreção armazenada nesses canais reagiu positivamente ao PAS, indicando a presença de polissacarídeos (Fig. 6G).

As brácteas geralmente são vináceas, sendo observada a presença de idioblastos com antocianina nas células hipodérmicas da face abaxial (Fig. 6E, asterisco). Assim como nas folhas, idioblastos com ráfides e polissacarídeos podem ocorrer nas camadas da hipoderme ou entre as células braciformes do parênquima clorofiliano. O parênquima clorofiliano é formado por células braciformes de braços curtos, que delimitam canais de ar entre os feixes vasculares (Fig. 6E).

A margem das brácteas apresenta o formato truncado (Fig. 6H), afilado pelo prolongamento da epiderme (Fig. 6I), ou arredondado, e esta variação pode ocorrer em indivíduos de uma mesma população (Tabela 3).

Os feixes vasculares colaterais distribuem-se em fileira única (Fig. 6E, H). Também ocorrem feixes vasculares comissurais, como mostrado anteriormente para as folhas, interligando os feixes vasculares distribuídos longitudinalmente na lâmina (Fig. 6G).

Análise de similaridade – Através da análise de similaridade (WPGMA) foi gerado um dendograma em que as populações aparecem formando quatro grupos (*G1*, *G2*, *G3* e *G4*) (Fig. 1B). O agrupamento *G1*, incluindo as Populações 1, 2 e 4 (Bahia), com distância de 0,453, apresenta-se mais distinto que os demais, que por sua vez formam um grande grupo com distância de 0,036. O agrupamento *G2*, incluindo a maioria das populações de Minas

Gerais (Populações 8-13), com distância de 0,417, distingue-se dos agrupamentos *G3* (Populações 14-15, Minas Gerais) e *G4* (Populações 3, 5-7, Bahia), esses últimos apresentando distância de 0,333. Os agrupamentos *G3* e *G4* apresentam maior similaridade entre si, formando um agrupamento com distância de 0,083. O índice de correlação cofenética foi de 0,966.

Discussão

Caracterização morfológica e anatômica de populações do complexo Vriesea oligantha como subsídio para a taxonomia

Considerando os resultados apresentados para os indivíduos do complexo *Vriesea oligantha*, suas populações podem ser diferenciadas principalmente pelas características morfológicas da folha, como o formato da lâmina e do ápice foliar e pelo diâmetro do tanque armazenador de água. Já as características anatômicas mostram-se homogêneas, exceto pela presença de feixes de fibras subepidérmicos na lâmina foliar, que diferencia as populações de Minas Gerais daquelas da Bahia.

A análise de similaridade indicou quatro agrupamentos. O agrupamento *G1* (Populações 1, 2 e 4) diferencia-se pelas folhas oblongas a levemente triangulares com ápice foliar acuminado e revoluta e pelo maior diâmetro do tanque (3,0-4,0 cm). Este agrupamento se mostra como o mais distinto e, a nível específico, seus indivíduos estão de acordo com as descrições morfológicas feitas para *Vriesea lancifolia* (Smith e Downs 1977; Martinelli e Leme 1983).

Já o agrupamento *G2* (Populações 8-13) caracteriza-se pelas folhas suberetas e estreito-lanceoladas com ápice acuminado, enquanto que nos agrupamentos *G3* (Populações 14-15) e *G4* (Populações 3, 5-7) as folhas são eretas, lanceoladas, com base muito alargada e ápice agudo. O agrupamento *G4* distingue-se do *G3* pelo menor diâmetro do tanque ($\leq 1,0$ cm) e pela ausência dos feixes de fibras subepidérmicos na região central da lâmina. Considerando as áreas de ocorrência e características morfológicas (Smith e Downs 1977; Philcox 1992; Ribeiro e Paula 2009), os agrupamentos *G3* e *G4* correspondem às espécies *V. oligantha* e *V. pseudoligantha*, respectivamente. O agrupamento *G2*, por sua vez, pode corresponder a outra espécie ou variedade. Ressalta-se que os agrupamentos não são diferenciados entre si apenas pela morfologia das folhas e da roseta, mas também por características reprodutivas como a morfologia das flores e brácteas do eixo da inflorescência,

que serão analisadas em detalhe em trabalho futuro sobre os órgãos reprodutivos dos representantes desse complexo.

Em um contexto mais geral, as características anatômicas das raízes mostraram-se úteis para a caracterização de Tillandsioideae. O epivelame com células não diferenciadas em pelos radiculares já foi observado em outras espécies de Tillandsioideae, como em algumas *Tillandsia* L. (Segecin e Scatena 2004a) e *Vriesea* (Proença e Sajo 2008a; Silva e Scatena 2011a), e parece ser uma característica importante para o reconhecimento desta subfamília. Também a endoderme com espessamento em “O” observada nos representantes estudados e em outras espécies de *Vriesea* e de *Tillandsia* (Segecin e Scatena 2004a; Proença e Sajo 2008a; Silva e Scatena 2011a) se mostra importante para a distinção desta subfamília.

Nas folhas, os estômatos tetracíticos na face abaxial é a característica mais comum em Bromeliaceae (Kraus 1949; Tomlinson 1969; Arruda e Costa 2003; Proença e Sajo 2004; Scatena e Segecin 2005; Sousa et al. 2005; Dettke e Milaneze-Gutierre 2008; Faria et al. 2012; Versieux et al. 2010, 2013). Nos representantes aqui estudados, estômatos com cinco células subsidiárias nas folhas, eixos da inflorescência e nas brácteas podem ser interpretados como uma variação do tipo tetracítico. As escamas com escudos formados por células centrais circundadas pelas células periféricas na proporção 4-8-16, além das células da ala, corroboram o padrão descrito para Tillandsioideae, enquanto nas outras subfamílias as escamas são menos especializadas, não apresentando esse arranjo concêntrico (Tomlinson 1969; Smith e Downs 1974; Smith e Till 1998; Benzing 2000).

Quanto à presença de feixes de fibras subepidérmicos na região central da lâmina foliar, esta característica em conjunto com outros dados morfológicos vegetativos e reprodutivos, foi utilizada para estabelecer relações filogenéticas no complexo *Vriesea corcovadensis*, mostrando-se importante para diferenciar *Vriesea* de *Tillandsia* (Gomes-da-Silva et al. 2012). Esta característica também já foi reportada anteriormente para outras espécies do gênero, como em *Vriesea friburgensis* Mez e *V. platynema* Gaudich. (Derwidueé e Gonzalez 2010). Entretanto, nossos resultados indicam que a mesma pode estar mais relacionada com o ambiente e com a maior área da lâmina das folhas, ocorrendo apenas nos representantes de Minas Gerais.

Com relação ao parênquima clorofiliano, nas Tillandsioideae é comum a presença do tipo paliádico, como observado na maioria das *Vriesea* já estudadas (Arruda e Costa 2003; Gomes-da-Silva et al. 2012) e em várias espécies de *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms (Versieux et al. 2010). Já o parênquima clorofiliano reduzido e constituído por células braciformes é menos frequente no gênero, contribuindo para a caracterização do complexo

estudado, além de ocorrer em outras espécies, como em *V. carinata* (Gomes-da-Silva et al. 2012).

A organização do eixo da inflorescência em epiderme uniestratificada, córtex parenquimático e cilindro vascular com feixes de distribuição aleatória formando atactostelo é o padrão mais comum para Bromeliaceae (Tomlinson 1969; Segecin e Scatena 2004b; Proença e Sajo 2008b; Silva e Scatena 2011b; Silva et al. 2018). O periciclo multiestratificado, com células de paredes espessadas e lignificadas, como observado no complexo *Vriesea oligantha* e na maioria das Tillandsioideae já estudadas (Segecin e Scatena 2004b; Proença e Sajo 2008b; Silva e Scatena 2011b), também caracteriza Tillandsioideae; em representantes de outras subfamílias, como *Acanthostachys* Klotzsch, *Ananas* Mill., *Billbergia* Thunb., (Proença e Sajo 2008b) e *Neoregelia* L. B. Sm. (Silva et al. 2018), não se observa um periciclo distinto, apesar destas também apresentarem atactostelo.

Quanto às brácteas, a caracterização anatômica destes órgãos é feita aqui pela primeira vez para a família. Apesar de serem muito semelhantes anatomicamente às folhas, com epiderme uniestratificada, hipoderme aquífera nas duas faces e parênquima clorofiliano reduzido entre os feixes vasculares, as brácteas se distinguem pela maior densidade de escamas na face abaxial, pelo formato e arranjo das células periféricas e da ala das escamas, pela presença de canais secretores e pela ausência de feixes de fibras subepidérmicos na região central da lâmina. Ressalta-se que os canais secretores se desenvolvem pelo rompimento das células hipodérmicas, caracterizando sua origem como lisígena, diferindo dos canais secretores observados nas folhas de *Bromelia antiacantha* Bertol., com origem esquizógena, a partir de células do parênquima clorofiliano (Dettke e Milaneze-Gutierrez 2008). Desta forma, canais secretores em Bromeliaceae, apesar de raros, podem ocorrer em diferentes órgãos e a partir de mecanismos distintos.

Apesar da homogeneidade anatômica observada para os indivíduos do complexo *V. oligantha*, o uso de dados morfológicos mostrou-se importante para a taxonomia deste complexo, indicando a existência de mais de uma espécie. Considerando que *Vriesea* não é um gênero monofilético (Terry e Brown 1997; Terry et al. 1997; Horres et al. 2000; Barfuss et al. 2005; Givnish et al. 2011; Gomes-da-Silva et al. 2012) e que sua revisão taxonômica e filogenia são dificultadas pelo elevado número de espécies, estudos que levantem características diagnósticas em pequenos grupos com espécies relacionadas, como aqui realizado, mostram-se necessários e úteis para a sistemática do gênero.

Aspectos morfológicos e anatômicos interpretados como adaptações ao ambiente

As populações estudadas podem ser caracterizadas como epífitas ou rupícolas facultativas, apresentando as mesmas adaptações, independente do substrato onde ocorrem. Assim, indivíduos do complexo *Vriesea oligantha* mostram grande versatilidade adaptativa, ilustrando a independência das Bromeliaceae em relação ao substrato, como consequência da evolução do hábito epifítico e sua capacidade de tolerar as condições de baixo suprimento hídrico, especialmente nas Tillandsioideae (Smith e Downs 1974; Benzing 2000; Crayn et al. 2004).

Destaca-se a facilidade de propagação vegetativa pela formação de novos indivíduos, que surgem como rametes a partir do desenvolvimento de gemas axilares dos caules e eixos da inflorescência. Essa estratégia permite o desenvolvimento de novas plantas em condições favoráveis, asseguradas inicialmente pelo suprimento hídrico e nutricional pela planta-mãe. A presença de grãos de amido na medula do eixo da inflorescência indica função de reserva, que pode estar envolvida no desenvolvimento das flores e dos frutos, bem como dos novos rametes.

Durante o crescimento da raiz, que fixa a planta aos diferentes substratos, ocorre a diferenciação dos tecidos e o velame se desenvolve. Este tecido, além de proteger o córtex e cilindro vascular, tem sido interpretado como uma adaptação ao hábito epifítico pela capacidade de reter umidade atmosférica e evitar a transpiração (Cutter 1980; Fahn 1987; Mauseth 1988; Pita e Menezes 2002; Segecin e Scatena 2004a; Proença e Sajo 2008a). Ainda, o epivelame com células não diferenciadas em pêlos radiculares já foi relatado anteriormente para espécies de *Tillandsia* (Segecin e Scatena 2004a; Proença e Sajo 2008a; Silva e Scatena 2011a) e agora para representantes de *Vriesea*. A ausência de pêlos radiculares nestes gêneros reduz a área de superfície exposta ao ambiente e, em conjunto com a disposição justaposta destas células, evita a perda de água dos tecidos internos. A função de absorção provavelmente é realizada pelas escamas foliares, presentes já no início do desenvolvimento das primeiras folhas (Mantovani e Iglesias 2005) e que podem absorver água e sais minerais, como demonstrado para outras Bromeliaceae (Benzing 1970; Benzing e Burt 1970; Benzing et al. 1976, 1978).

Nas raízes dos representantes estudados, o córtex externo constituído por células espessadas e lignificadas auxilia no suporte da planta nos afloramentos rochosos ou como epífitas, atuando na redução de perda de água (Tomlinson 1969). Pita e Menezes (2002) destacam, entretanto, que essas camadas de células espessadas e lignificadas podem

corresponder a mais de um tecido, envolvendo as camadas mais internas do velame e a exoderme, ou ainda outras camadas do córtex. No presente trabalho, porém, não foi realizado o estudo ontogenético para confirmar a origem destas camadas. Ainda na região cortical, espaços intercelulares amplos, assim como lacunas de ar, podem se desenvolver no córtex interno. Essas lacunas são formadas por atividade lisígena, com degradação das paredes de algumas células. Espaços lisígenos e/ou esquizógenos no córtex interno ocorrem nas raízes de representantes de diferentes subfamílias e gêneros (Pita e Menezes 2002; Segecin e Scatena 2004a; Dettke e Milaneze-Gutierrez 2008; Proença e Sajo 2008a; Silva e Scatena 2011a; Silva et al. 2018). Para os representantes do complexo *V. oligantha*, os espaços que se formam no córtex interno das raízes podem estar envolvidos com as funções de aeração dos tecidos internos e transporte de água por capilaridade, como já relatado para outras espécies de Bromeliaceae (Tomlinson 1969; Segecin e Scatena 2004a, b).

Nas folhas e brácteas, a presença de polissacarídeos nas escamas pode favorecer a absorção de água. Isso porque a presença de polissacarídeos pode indicar a formação de mucilagem no interior dessas células, que é hidrofílica, como relatado para outras espécies de *Tillandsia* (Souza e Neves 1996). A mucilagem nas escamas não só favorece a absorção de água, mas possivelmente atua na preservação das células quando as escamas se contraem durante os períodos de seca (Souza e Neves 1996). Tomlinson (1969) ressalta que as alas das escamas melhoram o isolamento e dispersão da luz e recobrem os estômatos, promovendo adaptação contra a perda de água para o ambiente. Como descrito nos resultados, a densidade de escamas nas brácteas é visualmente maior na face abaxial e isso pode ser atribuído à disposição ascendente das brácteas no eixo da inflorescência, deixando a face abaxial mais exposta. Por outro lado, na face adaxial, variações no tamanho das escamas e arranjo das células do escudo são provavelmente respostas a uma menor incidência de luz direta.

A presença de canais de ar nas folhas também tem relação com o ambiente e a forma de vida. Os canais de ar, distribuídos longitudinalmente pela lâmina e conectados aos estômatos, podem ser apontados como uma estratégia eficiente para a fotossíntese e assimilação de carbono, como relatado para a bromélia *Guzmania lingulata* (L.) Mez (North et al. 2013), uma vez que o CO₂ se difunde mais rápido através do ar do que pelas células (Pickard 1982). Assim, os canais de ar atuam como reservatórios de CO₂ quando os estômatos estão fechados (North et al. 2013), melhorando a capacidade fotossintética.

Plantas ocorrentes em ambientes áridos ou com pouca água disponível no ambiente apresentam adaptações contra a perda de água ou ainda órgãos suculentos capazes de armazenar água (Lüttge 2004, 2010), como a hipoderme aquífera bastante desenvolvida nos

indivíduos estudados. A água absorvida pelas folhas e armazenada na hipoderme aquífera pode ser mobilizada durante os períodos de seca para outros tecidos da planta, como o clorênquima, contribuindo para a manutenção e funcionamento do tecido fotossintetizante. No estudo de Males (2018), que relaciona a estrutura anatômica foliar com os mecanismos fotossintéticos em Bromeliaceae, foi indicado que as bromélias C_3 , em geral, apresentam hipoderme aquífera e canais de ar mais desenvolvidos. Desta forma, provavelmente os representantes do complexo *V. oligantha* apresentam mecanismo fotossintético C_3 – mecanismo comum em várias espécies de *Vriesea* (Males e Griffiths 2017; Males 2018) – sendo as características estruturais do mesófilo (espessura da hipoderme aquífera, estrutura do clorênquima e dos canais de ar) interpretadas como estratégias para evitar o estresse hídrico. Nas Tillandsioideae, a fotossíntese C_3 é característica plesiomórfica, predominando na subfamília bromélias epífitas com tanque armazenador de água e fotossíntese C_3 (C_3 tank-epiphytes), embora várias espécies desta subfamília, como as *Tillandsia* atmosféricas, sejam plantas CAM (Crayn et al. 2004; Males e Griffiths 2017). Males e Griffiths (2017), que investigaram estratégias quanto ao uso de água em diferentes tipos funcionais de Bromeliaceae, apontam que as espécies C_3 epífitas com tanque (C_3 tank-epiphytes) e as espécies CAM atmosféricas (CAM atmospheric epiphytes) são tipos funcionais que aparecem em uma mesma linhagem evolutiva, explicados pelas pressões contínuas de limitação de recursos e pela intensificação de estratégias de evasão à seca.

Os idioblastos com ráfides entre as células braciiformes e nas camadas da hipoderme próximas ao parênquima clorofiliano, observados em todos os indivíduos estudados, podem contribuir para uma melhor distribuição da luminosidade no tecido clorofiliano reduzido. Além disso, os cristais de oxalato de cálcio também podem estar associados com outras funções, como a defesa contra herbívoros e à regulação de cálcio na célula (Franceschi e Nakata 2005), justificando a ocorrência desses metabólitos nos órgãos estudados.

Variações na coloração das folhas, brácteas e eixos das inflorescências possivelmente estão relacionadas a fatores ambientais como luminosidade e suprimento hídrico. Isto porque a coloração vinácea está relacionada com a presença de pigmentos, como antocianinas, que conferem proteção contra alta luminosidade e dessecação (Steyn et al. 2002). Em estudo recente com a bromélia *Pitcairnia burchellii* Mez, a presença de antocianinas e o teor de compostos fenólicos em geral foram maiores em folhas submetidas à dessecação (Vieira et al. 2017), indicando que a produção desses pigmentos pode ser desencadeada por variações no suprimento hídrico.

Outra característica com variação intrapopulacional e provavelmente relacionada ao ambiente refere-se ao formato da margem da lâmina das folhas e brácteas. Tal característica já foi utilizada para fins filogenéticos (Gomes-da-Silva et al. 2012), porém observamos aqui que variações nas condições ambientais alteram o formato, uma vez que indivíduos cultivados em casa de vegetação com folhas de margem afilada passaram a apresentar folhas de margem truncada a arredondada. Acreditamos, assim, que os diferentes formatos podem variar ao longo do ano, durante a morfogênese das folhas, dependendo dos fatores ambientais como luminosidade, umidade e vento, em escalas microclimáticas, explicando as variações intrapopulacionais. Daí a importância deste estudo com diferentes populações de diferentes localidades e condições ambientais, mostrando que algumas características variáveis de aparente valor taxonômico são na verdade respostas a fatores ambientais.

Referências

- Almeida VR, Costa AF, Mantovani A, Gonçalves-Esteves V, Arruda RCO, Forzza RC. 2009. Morphological phylogenetics of *Quesnelia* (Bromeliaceae, Bromelioideae). *Systematic Botany*, 34: 660-672.
- Arruda RCO, Costa AF. 2003. Foliar anatomy of five *Vriesea* sect. *Xiphion* (Bromeliaceae) species. *Selbyana*, 24: 180-189.
- Barfuss MHJ, Samuel R, Till W, Stuessy TF. 2005. Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *American Journal of Botany*, 92: 337-351.
- Benzing DH. 1970. Foliar permeability and the absorption of minerals and organic nitrogen by certain tank bromeliads. *Botanical Gazette*, 131: 23-31.
- Benzing DH. 2000. *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*. USA, Cambridge University Press.
- Benzing DH, Burt KM. 1970. Foliar permeability among twenty species of the Bromeliaceae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 97: 269-279.
- Benzing DH, Henderson K, Kessel B, Sulak J. 1976. The absorptive capacities of bromeliad trichomes. *American Journal of Botany*, 63: 1009-1014.
- Benzing DH, Seemann J, Renfrow A. 1978. The foliar epidermis in Tillandsioideae (Bromeliaceae) and its role in habitat selection. *American Journal of Botany*, 65: 359-365.
- BFG – The Brazil Flora Group. 2015. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, 66: 1085-1113.

- Braga MMN. 1977. Anatomia foliar de Bromeliaceae da Campina. *Acta Amazonica*, 7: 05-74.
- Bukatsch F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos*, 61: 255.
- Costa AF, Rodrigues PJFP, Wanderley MG. 2009. Morphometric analysis and taxonomic revision of the *Vriesea paraibica* complex (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 159: 163-181.
- Costa AF, Gomes-da-Silva J, Wanderley MGL. 2014. *Vriesea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae): taxonomic history, and morphology of the Brazilian lineage. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 141: 338-352.
- Crayn DM, Winter K, Smith JAC. 2004. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 3703-3708.
- Cutter EG. 1980. *Plant anatomy*. Part II: organs. London, Edward Arnold.
- Derwidueé FS, Gonzalez AM. 2010. Anatomía foliar en Bromeliaceae del nordeste argentino y Paraguay. *Bonplandia*, 19: 153-173.
- Dettke GA, Milaneze-Gutierrez MA. 2008. Anatomia vegetativa de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae, Bromelioideae). *Balduinia*, 13: 1-14.
- Fahn A. 1987. *Plant anatomy*. 3 ed. Oxford, Pergamon Press.
- Faria APG, Vieira ACM, Wendt T. 2012. Leaf anatomy and its contribution to the systematics of *Aechmea* subgenus *Macrochordion* (de Vriese) Baker (Bromeliaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84: 961-971.
- Feder N, O'Brien TP. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany*, 55: 123-142.
- Franceschi VR, Nakata PA. 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 41-71.
- Garcia-Vallve S, Palau J, Romeu A. 1999. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1125-1134.
- Gerrits PO, Smid L. 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy*, 132: 81-85.
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Ee BV, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical

- biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, 98: 872-895.
- Gomes-da-Silva J, Vargens FAC, Arruda RCO, Costa AF. 2012. A morphological cladistic analysis of the *Vriesea corcovadensis* group (Bromeliaceae: Tillandsioidae), with anatomical descriptions: new evidence of the non-monophyly of the genus. *Systematic Botany*, 37: 641-654.
- Horres R, Zizka G, Kahl G, Weising K. 2000. Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: evidence from *trnL*(UAA) intron sequences of the chloroplast genome. *Plant Biology*, 2: 306-315.
- Horres R, Schulte K, Weising K, Zizka G. 2007. Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) – Evidence from molecular and anatomical studies. *Aliso*, 23: 27-43.
- Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. New York, McGraw Hill Book.
- Krauss BH. 1949. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. (continued) II. The leaf. *Botanical Gazette*, 110: 303-404.
- Luther H. 2014. *An alphabetical list of bromeliad binomials*. 14th ed. The Bromeliad Society International. The Marie Selby Botanical Gardens, Sarasota & Bromeliad Society International.
- Lüttge U. 2004. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany*, 93: 629-652.
- Lüttge U. 2010. Ability of crassulacean acid metabolism plants to overcome interacting stresses in tropical environments. *AoB Plants*, 2010: plq005.
- Males J. 2018. Concerted anatomical change associated with crassulacean acid metabolism in the Bromeliaceae. *Functional Plant Biology*, 45: 681-695.
- Males J, Griffiths H. 2017. Functional types in the Bromeliaceae: relationships with drought-resistance traits and bioclimatic distributions. *Functional Ecology*, 31: 1868-1880.
- Mantovani A, Iglesias RR. 2005. Quando aparece a primeira escama? Estudo comparativo sobre o surgimento de escamas de absorção em três espécies de bromélias terrestres e de restinga. *Rodriguésia*, 56: 73-84.
- Mantovani A, Venda AKL, Almeida VR, Costa AF, Forzza RC. 2012. Leaf anatomy of *Quesnelia* (Bromeliaceae): implications for the systematics of core bromelioids. *Plant Systematics and Evolution*, 298: 787-800.
- Martinelli G, Leme EMC. 1983. Rare bromeliads from Brazil, Part. I: *Vriesea lancifolia*. *Journal of the Bromeliad Society*, 33: 195-198.

- Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, Costa AF, Forzza RC. 2008. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia*, 59: 209-258.
- Mauseth JD. 1988. *Plant anatomy*. San Francisco, The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc.
- Monteiro Rf, Forzza RC, Mantovani A. 2011. Leaf structure of *Bromelia* and its significance for the evolution of Bromelioideae (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 293: 53-64.
- North GB, Lynch FH, Maharaj FDR, Phillips CA, Woodside W. 2013. Leaf hydraulic conductance for a tank bromeliad: axial and radial pathways for moving and conserving water. *Frontiers in Plant Science*, 4: 78.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59: 368-373.
- Philcox D. 1992. Notes on South American Bromeliaceae. *Kew Bulletin*, 47: 261-276.
- Pickard WF. 1982. Why is the substomatal chamber as large as it is? *Plant Physiology*, 69: 971-974.
- Pita PB, Menezes NL. 2002. Anatomia da raiz de espécies de *Dyckia* Schult. f. e *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil), com especial referência ao velame. *Revista Brasileira de Botânica*, 25: 25-34.
- Proença SL, Sajo MG. 2004. Estrutura foliar de espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 18: 319-331.
- Proença SL, Sajo MG. 2007. Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 21: 657-673.
- Proença SL, Sajo MG. 2008a. Rhizome and root anatomy of 14 species of Bromeliaceae. *Rodriguésia*, 59: 113-128.
- Proença SL, Sajo MG. 2008b. Anatomy of the floral scape of Bromeliaceae. *Revista Brasileira de Botânica*, 31: 399-408.
- Reinert F, Meirelles ST. 1993. Water acquisition strategy shifts in the heterophyllous saxicolous bromeliad, *Vriesea geniculata* (Wawra) Wawra. *Selbyana*, 14: 80-88.
- Ribeiro OBC, Paula CC. 2009. Bromeliads in the extreme south of the Espinhaço Range, Minas Gerais, Brazil. *Selbyana*, 30: 107-113.

- Santos-Silva F, Venda AKL, Hallbritter HM, Leme EMC, Mantovani A, Forzza RC. 2017. Nested in chaos: insights on the relations of the “Nidularioid Complex” and the evolutionary history of *Neoregelia*. *Brittonia*, 69: 133-147.
- Sass JE. 1951. *Botanical microtechnique*. 2^a ed. Ames, The Iowa State College Press.
- Scatena VL, Segecin S. 2005. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 28: 635-649.
- Segecin S, Scatena VL. 2004a. Morfoanatomia de rizomas e raízes de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, PR, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 18: 253-260.
- Segecin S, Scatena VL. 2004b. Anatomia de escapos de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 27: 515-525.
- Silva IV, Scatena VL. 2011a. Anatomia de raízes de nove espécies de Bromeliaceae (Poales) da região amazônica do estado de Mato Grosso, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 25: 618-627.
- Silva IV, Scatena VL. 2011b. Anatomia de escapos de espécies de Bromeliaceae da Amazônia, Mato Grosso, Brasil. *Hoehnea*, 38: 51-59.
- Silva KR, Versieux LM, Oriani A. 2018. Anatomy of vegetative organs, inflorescence axis and pedicel in the *Neoregelia bahiana* complex (Bromeliaceae): taxonomic and ecological importance. *Nordic Journal of Botany*, 2018: e01800.
- Smith LB, Downs RJ. 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*, 14: 1-658.
- Smith LB, Downs RJ. 1977. Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*, 14: 663-1492.
- Smith LB, Till W. 1998. Bromeliaceae. In: Kubitzki (ed.). *The families and genera of vascular plants IV*. New York, Springer, pp. 74-99.
- Souza RCOS, Neves LJ. 1996. Anatomia foliar de quatro espécies de *Tillandsia*. *Bromélia*, 3: 29-39.
- Sousa GM, Estelita MEM, Wanderley MGL. 2005. Anatomia foliar de espécies brasileiras de *Aechmea* subg. *Chevaliera* (Gaudich. ex Beer) Baker, Bromelioideae – Bromeliaceae. *Revista Brasileira de Botânica*, 28: 603-613.
- Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM, Jacobs G. 2002. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*, 155: 349-361.
- Terry RG, Brown GK. 1997. Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) using *ndhF* sequences. *Systematic Botany*, 22: 333-345.

- Terry RG, Brown GK, Olmstead RG. 1997. Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. *American Journal of Botany*, 84: 664-670.
- Tomlinson PB. 1969. III Commelinales-Zingiberales. In: Metcalfe CR (ed.). *Anatomy of the monocotyledons*. Oxford, Clarendon Press, pp. 193-294.
- Versieux LM, Wendt T, Louzada RB, Wanderley MGL. 2008. Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade*, 4: 99-110.
- Versieux LM, Elbl PM, Wanderley MGL, Menezes NL. 2010. *Alcantarea* (Bromeliaceae) leaf anatomical characterization and its systematic implications. *Nordic Journal of Botany*, 28: 385-397.
- Versieux LM, Vasconcellos N, Martinelli G. 2013. *Tillandsia bonita* (Bromeliaceae), a new species from Mato Grosso do sul, Brazil, with notes on leaf anatomy. *Systematic Botany*, 38: 75-81.
- Vieira EA, Silva KR, Oriani A, Moro CF, Braga MR. 2017. Mechanisms of desiccation tolerance in the bromeliad *Pitcairnia burchellii* Mez: biochemical adjustments and structural changes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 121: 21-30.

Ilustrações

Figura 1. Distribuição (A), dendograma gerado pela análise de similaridade (WPGMA) (B) e morfologia foliar (C-E) das populações estudadas do complexo *Vriesea oligantha*. C. Variações morfológicas das folhas. D. Detalhe mostrando ápice foliar acuminado. E. Detalhe mostrando ápice foliar agudo. (BA, Bahia; MG, Minas Gerais; G1, Agrupamento 1; G2, Agrupamento 2; G3, Agrupamento 3; G4, Agrupamento 4; 1-15, populações estudadas, conforme Tabela 1). Barras: 5 cm (C); 1 cm (D-E).

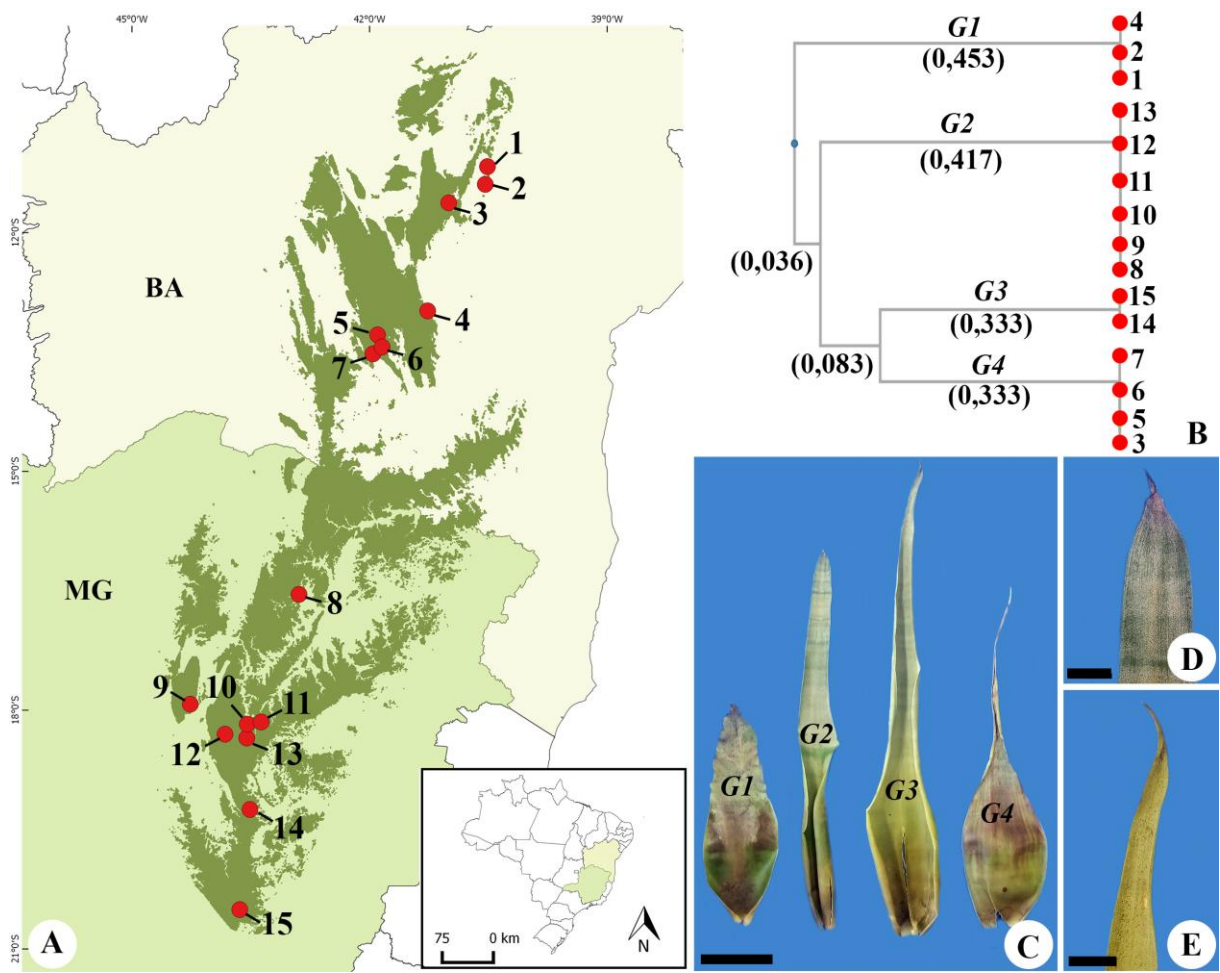


Figura 2. Hábito e morfologia no complexo *Vriesea oligantha*. **A-B.** Hábito epifítico. **C-D.** Hábito rupícola. **E-G.** Detalhe da roseta de folhas, mostrando variações no diâmetro do tanque. **H.** Detalhe de uma roseta, mostrando folhas eretas, lanceoladas. **I.** Formação de raízes adventícias na base do caule. **J.** Propagação vegetativa com formação de novos rametes a partir do caule. **K.** Propagação vegetativa com formação de novo ramete no nó do eixo da inflorescência. **A, F.** População 14. **B, G.** População 4. **C, I.** População 13. **D.** População 1. **E.** População 6. **H.** População 3. **J.** População 2. **K.** População 7. Barras: 5 cm.



Figura 3. Anatomia da raiz no complexo *Vriesea oligantha*, em secções transversais (**A-E, G, H**) e longitudinal (**F**). **A.** Aspecto geral. **B-D.** Detalhes mostrando a formação do velame e a organização do córtex externo e mediano. **E.** Detalhe mostrando velame, córtex e cilindro vascular. **F.** Detalhe do córtex mediano mostrando idioblasto com ráfides. **G.** Detalhe do cilindro vascular. **H.** Detalhe mostrando célula de passagem na endoderme. (C, córtex; CE, córtex externo; CI, córtex interno; CM, córtex mediano; CV, cilindro vascular; En, endoderme; Ev, epivelame; F, floema; M, medula; P, periciclo; Ve, velame; X, xilema; *, idioblasto; Seta, célula de passagem; Cabeça de seta, ráfides). Barras: 500 µm (A); 50 µm (B, F); 100 µm (C-D, G); 200 µm (E); 25 µm (H).

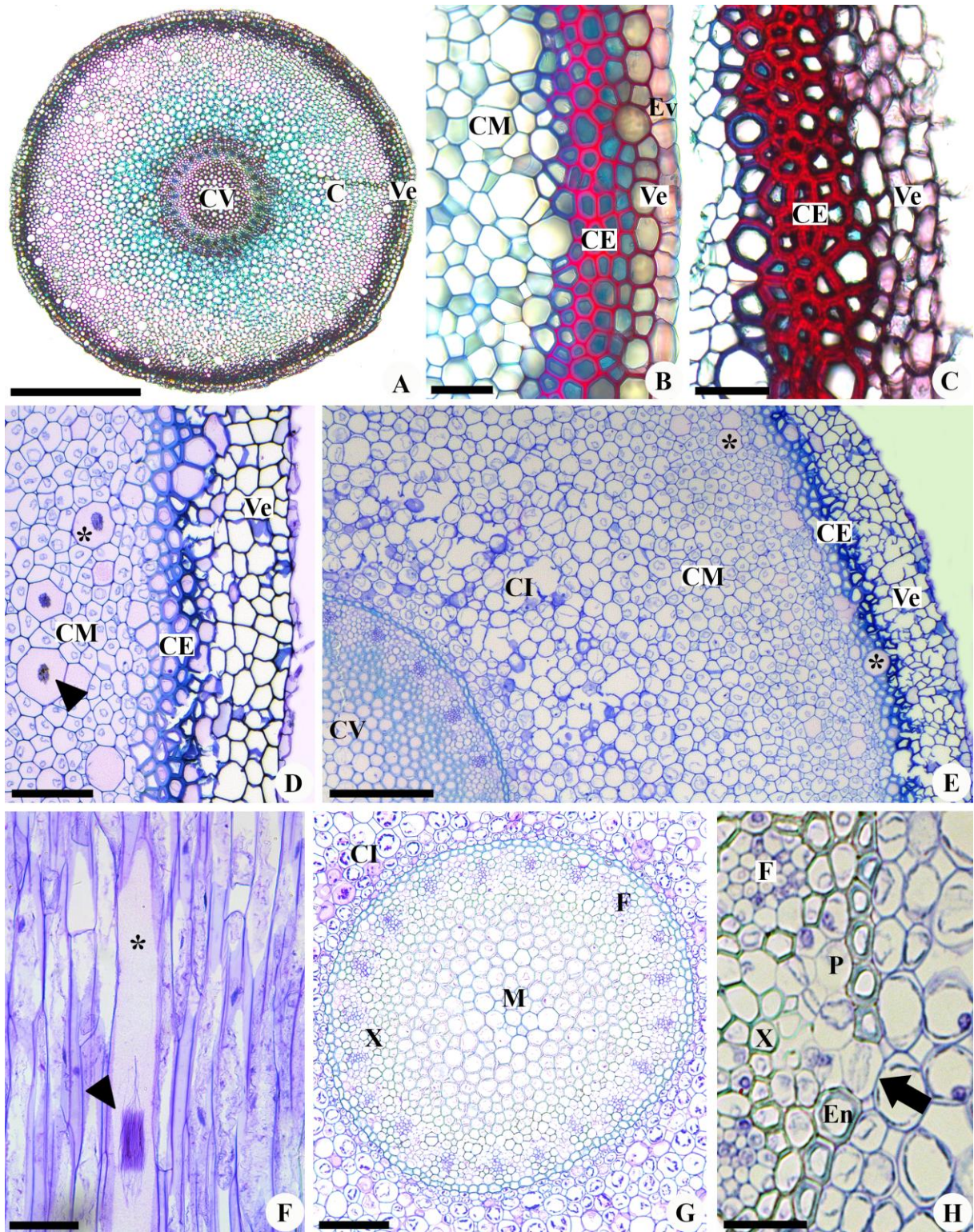


Figura 4. Epiderme das folhas (**A-B, E-H, K-M, Q**) e brácteas (**C-D, I-J, N-P, R**) no complexo *Vriesea oligantha*, em vista frontal (**A-D, D, F, L, P**), em secções transversais (**E, Q-R**) e sob MEV (**C, G-K, M-O**). **A.** Detalhe da epiderme na face adaxial. **B-C.** Detalhes de estômatos com cinco células subsidiárias na face abaxial. **D.** Detalhe de estômato teracítico na face abaxial. **E.** Detalhe da epiderme mostrando estômato com câmara subestomática face abaxial. **F.** Aspecto geral mostrando a distribuição das escamas, predominantemente enfileiradas, na face adaxial. **G, I.** Detalhes mostrando densidade das escamas na face adaxial. **H, J.** Detalhes mostrando densidade das escamas na face adaxial. **K.** Detalhe mostrando a estrutura das escamas, com as alas sobrepostas, na face abaxial. **L-M.** Detalhes mostrando a organização do escudo das escamas nas faces adaxial e abaxial, respectivamente. **N.** Detalhe mostrando diferença de tamanho das escamas na face adaxial. **O-P.** Detalhes mostrando variações no formato e arranjo das células do escudo das escamas na face adaxial. **Q-R.** Detalhes mostrando a inserção das escamas na face adaxial. (A, células da ala; CC; células centrais; CP, células periféricas; Cabeças de setas, estômatos). Barras: 50 µm (**A, E, L**); 25 µm (**B-D, M, O-R**); 0,25 cm (**F**); 300 µm (**G-J**); 100 µm (**K, N**).

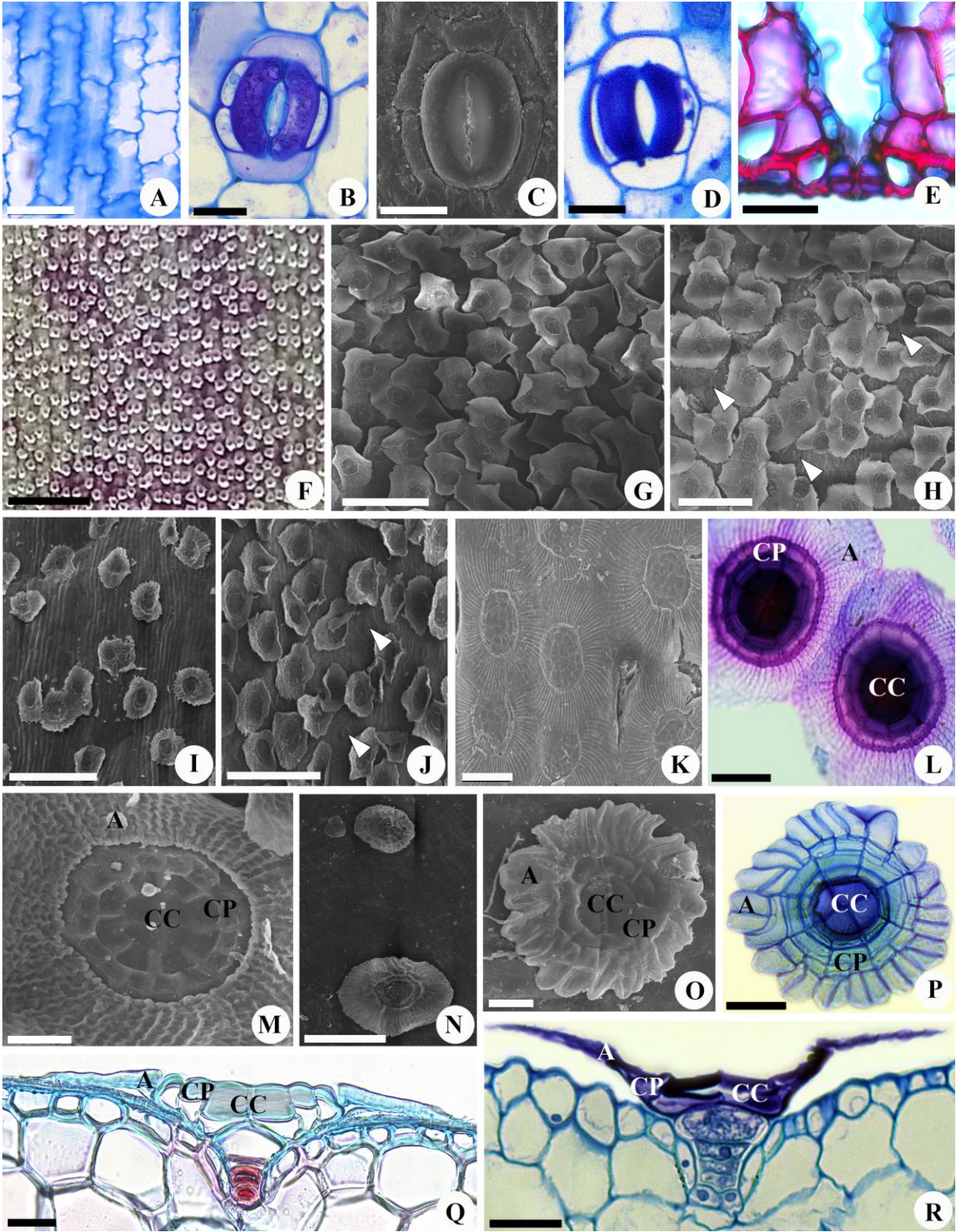


Figura 5. Anatomia da porção central da lâmina foliar no complexo *Vriesea oligantha*, em secções transversais (**A-E**, **G-K**) e longitudinais (**F**, **L**). **A.** Aspecto geral. **B.** Detalhe mostrando epiderme, mesofilo com feixes de fibras subepidérmicos e feixe vascular. **C.** Detalhe da epiderme e hipoderme aquífera na face adaxial. **D.** Detalhe do parênquima clorofiliano, hipoderme aquífera e estômato com câmara subestomática na face abaxial. **E.** Detalhe mostrando células da hipoderme aquífera com gotas lipídicas, que reagiram positivamente ao teste com Sudan III. **F.** Idioblastos entre as células da hipoderme. **G-H.** Detalhes mostrando idioblastos com ráfides e polissacarídeos entre as células do parênquima clorofiliano. **I-J.** Detalhes do parênquima clorofiliano, com células braciiformes. **K.** Detalhe do feixe vascular. **L.** Organização dos feixes vasculares e canais de ar. (FC, feixe vascular comissural; Fi, fibras; FV, feixe vascular; HA, hipoderme aquífera; PC, parênquima clorofiliano; *, idioblasto; Seta, células braciiformes; Cabeça de seta, ráfides). Barras: 500 µm (**A**); 100 µm (**C-E**); 200 µm (**B**, **F**, **L**); 50 µm (**G-K**).

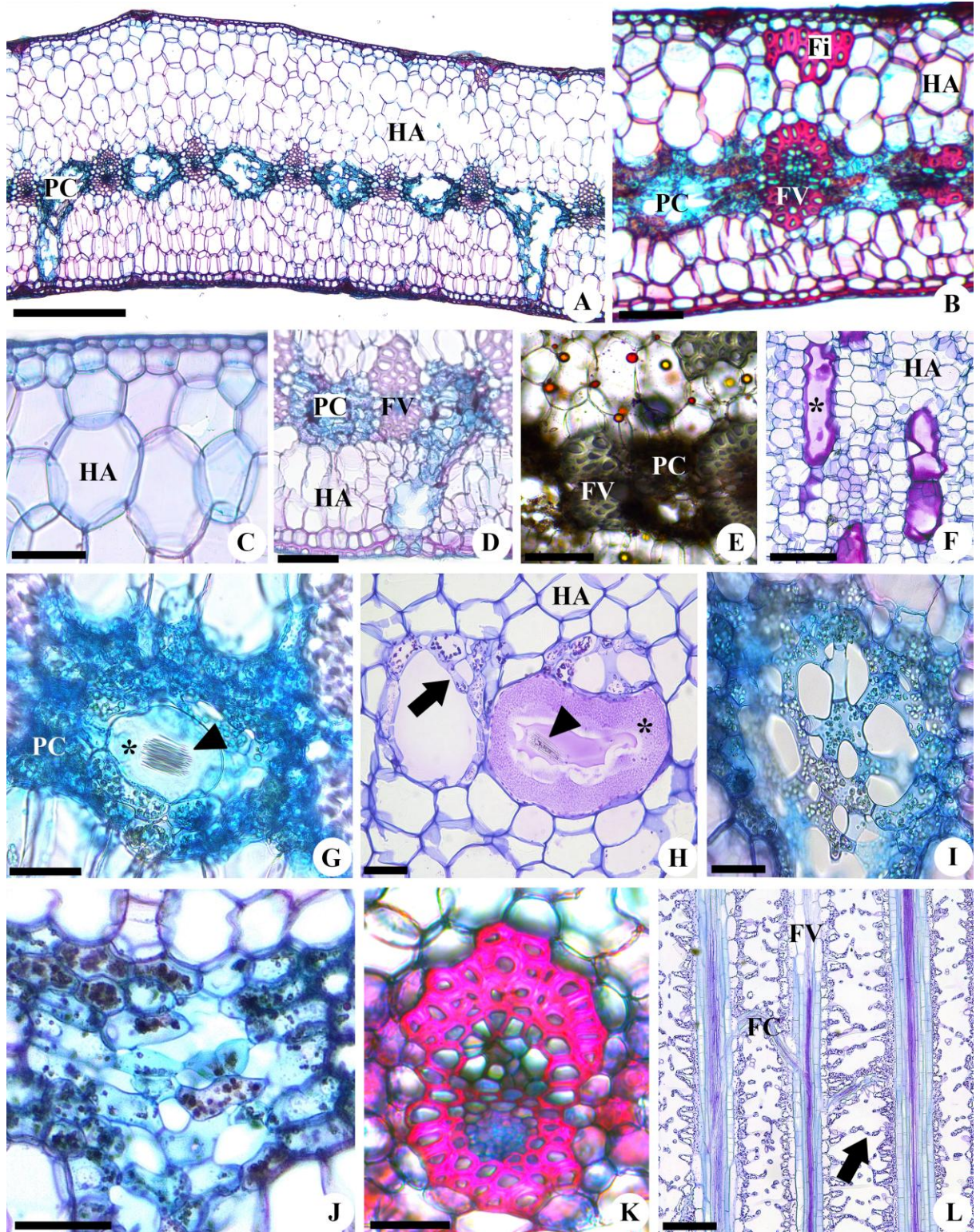


Figura 6. Anatomia da margem foliar (**A-D**) e anatomia das brácteas (**E-I**) no complexo *Vriesea oligantha*, em secções transversais (**A-F, H-I**) e longitudinal (**G**). **A-D**. Aspectos gerais, mostrando formato afilado, agudo, arredondado e truncado, respectivamente. **E**. Detalhe mostrando epiderme, mesofilo e feixe vascular. **F-G**. Detalhes mostrando a presença de canais secretores no mesofilo, entre os feixes vasculares. **H**. Detalhe de margem truncada. **I**. Detalhe de margem afilada, pelo prolongamento da epiderme. **A, C**. População 14. **B, G**. População 7. **D**. População 5. **E**. População 15. **F**. População 4. **H**. População 2. **I**. População 6. (Cs, canal secretor; Fi, fibras; FV, feixe vascular; HA, hipoderme aquífera; PC, parênquima clorofiliano; cabeças de setas, escamas). Barras: 200 µm (A-D, I); 100 µm (E-H).

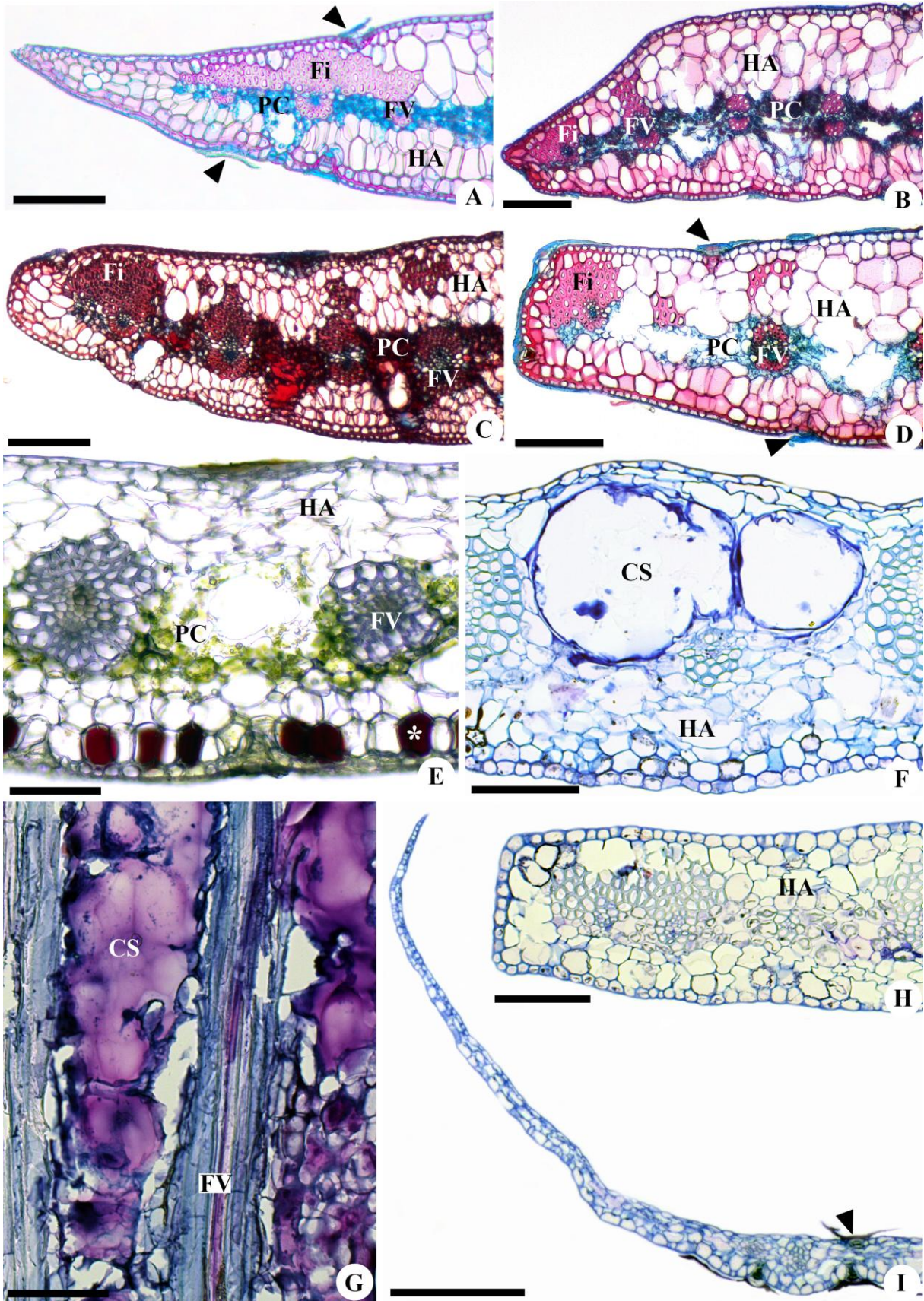


Figura 7. Anatomia do eixo da inflorescência no complexo *Vriesea oligantha*, em secções transversais (**A-D, G**), longitudinal (**E**) e paradérmica (**F**). **A.** Aspecto geral. **B.** Detalhe do córtex e cilindro vascular. **C.** Detalhe da epiderme e do córtex. **D.** Detalhe dos feixes vasculares na medula. **E.** Detalhe do córtex mostrando idioblasto com ráfides. **F.** Estômato tetracítico. **G.** Detalhe da epiderme, mostrando o estômato. (C, córtex; CV, cilindro vascular; F, floema; FV, feixe vascular; M, medula; P, periciclo; TV, traço vascular; X, xilema; *, idioblasto; Seta, grãos de amido; Cabeça de seta, ráfides). Barras: 500 µm (A-B); 100 µm (C-D); 50 µm (E); 25 µm (F-G).

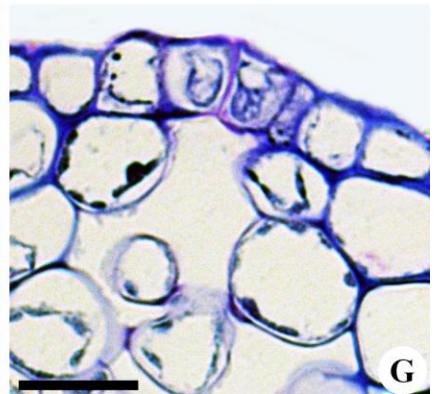
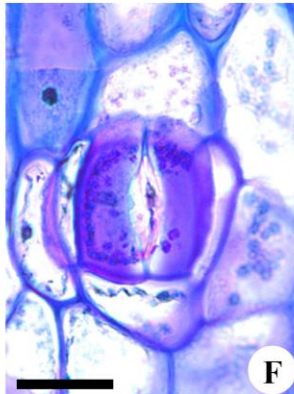
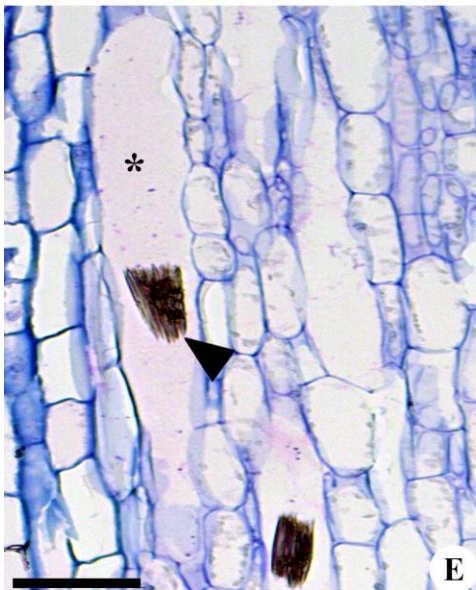
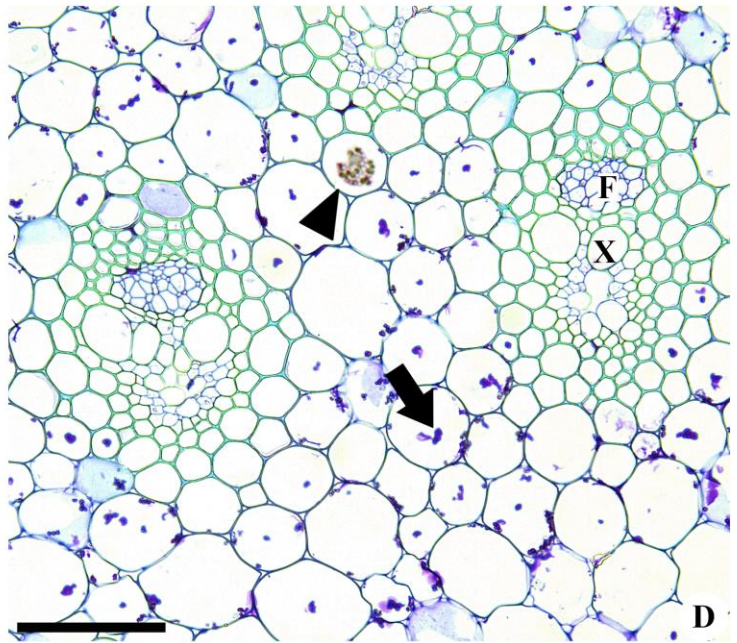
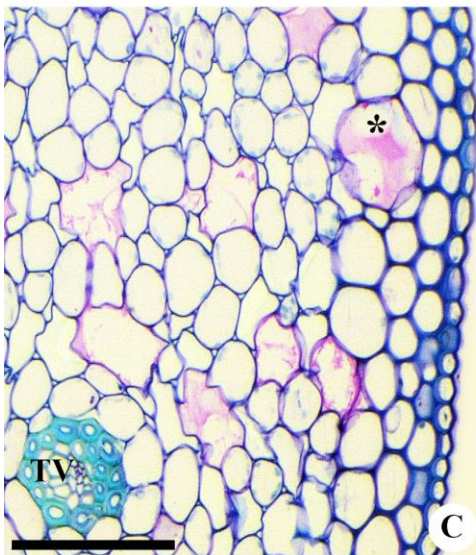
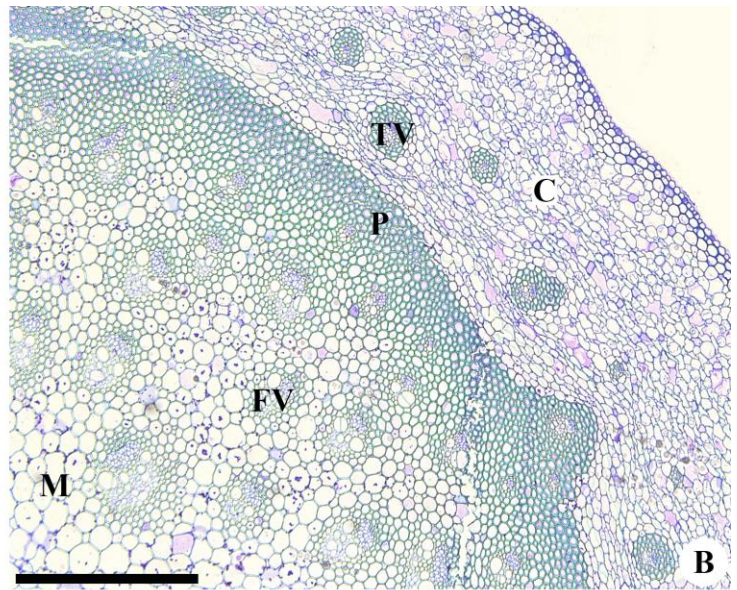
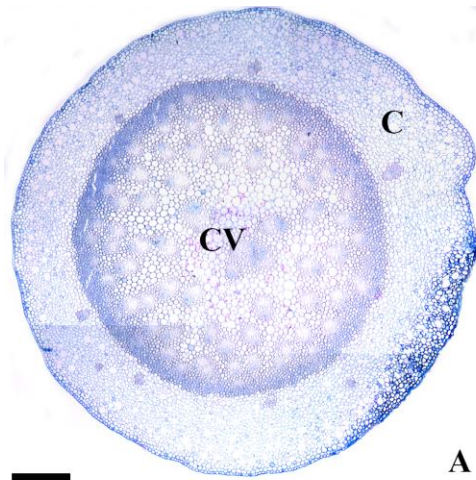


Tabela 1. Populações do complexo *Vriesea oligantha* estudadas.

Populações	Localidades	Formas de vida	Coordenadas geográficas	Dados do coletor
1	Jacobina, BA	Predominantemente rupícola	11°10'13,6'' S 40°30'41,1'' W	M.V. Dantas-Queiroz et al. 148
2	Miguel Calmon, BA	Predominantemente rupícola	11°23'35,8'' S 40°32'21,8'' W	M.V. Dantas-Queiroz et al. 149
3	Morro do Chapéu, BA	Epífita e rupícola	11°37'34,6'' S 41°00'01,8'' W	M.V. Dantas-Queiroz et al. 133
4	Mucugê, BA	Epífita e rupícola	12°58'60'' S 41°15'59'' W	M.V. Dantas-Queiroz et al. 131
5	Abaíra, BA	Epífita e rupícola	13°17'03,3'' S 41°53'56,8'' W	M.V. Dantas-Queiroz et al. 136
6	Rio de Contas, BA	Epífita e rupícola	13°31'22,3'' S 41°57'25'' W	M.V. Dantas-Queiroz et al. 124
7	Rio de Contas, BA	Predominantemente rupícola	13°26'12,6'' S 41°50'29,8'' W	M.V. Dantas-Queiroz et al. 125
8	Grão Mogol, MG	Epífita e rupícola	13°31'12,5'' S 42°53'54,7'' W	M.V. Dantas-Queiroz et al. 137
9	Serra do Cabral, MG	Epífita e rupícola	17°55'26,4'' S 44°15'48'' W	M.V. Dantas-Queiroz et al. 138
10	Planalto de Diamantina, MG	Epífita e rupícola	18°10'30,5'' S 43°32'38,4'' W	M.V. Dantas-Queiroz et al. 142
11	Planalto de Diamantina, MG	Epífita e rupícola	18°08'49,8'' S 43°22'08,8'' W	M.V. Dantas-Queiroz et al. 143
12	Planalto de Diamantina, MG	Epífita e rupícola	18°18'04,4'' S 43°49'30,6'' W	M.V. Dantas-Queiroz & K.R. Silva 139
13	Planalto de Diamantina, MG	Epífita e rupícola	18°20'56,4'' S 43°33'04,4'' W	M.V. Dantas-Queiroz & K.R. Silva 140; K.R. Silva et al. 83
14	Serra do Cipó, MG	Predominantemente epífita	19°14'48,75'' S 43°30'36,7'' W	K.R. Silva & K.O. Nardi 76
15	Serra de Ouro Branco, MG	Predominantemente epífita	20°30'17,3'' S 43°38'20,9'' W	M.V. Dantas-Queiroz & K.R. Silva 144

Tabela 2. Caracteres morfológicos e anatômicos de folhas úteis para o reconhecimento de diferentes populações do complexo *Vriesea oligantha*.

Características	Populações														
	Bahia							Minas Gerais							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Diâmetro do tanque $\leq 1,0$ cm			X		X	X	X								
Diâmetro do tanque de 1,5-2,5 cm								X	X	X	X	X	X	X	X
Diâmetro do tanque de 3,0-4,0 cm	X	X		X											
Folhas lanceoladas, com base muito alargada			X		X	X	X							X	X
Folhas estreito-lanceoladas								X	X	X	X	X	X		
Folhas largas e oblongas a levemente triangulares	X	X		X											
Ápice foliar revoluto	X	X		X											
Ápice foliar agudo			X		X	X	X							X	X
Ápice foliar acuminado	X	X		X				X	X	X	X	X	X		
Feixes de fibras subepidérmicos na região central da lâmina								X	X	X	X	X	X	X	X

Tabela 3. Variações no contorno da margem das folhas e brácteas, em secção transversal, nas diferentes populações do complexo *Vriesea oligantha*.

Órgãos	Margem	Populações														
		Bahia							Minas Gerais							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Folha	Afilada						X	X			X		X		X	X
	Aguda		X				X	X			X				X	
	Arredondada				X					X		X	X		X*	
	Truncada	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X*	
Bráctea	Afilada, com prolongamento da epiderme		X	X	X	X	X	X		X	X		X		X	X
	Arredondada								X							
	Truncada	X	X						X			X		X		

*Indivíduos mantidos em cultivo

Capítulo 3

Aspectos estruturais da semente, germinação e desenvolvimento pós-seminal em *Neoregelia bahiana* (Bromeliaceae): entendendo o desenvolvimento das plântulas

³ Manuscrito a ser submetido ao periódico *International Journal of Plant Sciences*

Resumo: Este estudo buscou descrever a estrutura da semente e o desenvolvimento pós-seminal, incluindo a anatomia das plântulas de *Neoregelia bahiana*, contribuindo com o entendimento de aspectos ecológicos e do desenvolvimento em Bromeliaceae. Para tanto, 100 sementes maduras de duas populações foram colocadas para germinar e analisadas a cada 24 horas. Análises sob microscopia de luz e eletrônica de varredura foram realizadas com as sementes, plântulas e plantas jovens. As amostras também foram analisadas sob microscopia de fluorescência para imunodeteção de componentes da parede celular. Nas sementes é observada a camada de aleurona sob o envoltório seminal circundando o endosperma amilífero e o embrião diferenciado em cotilédono e eixo hipocótilo-radicular. A germinação envolve a atividade do meristema apical radicular e alongamento do hipocótilo no interior da semente. O desenvolvimento da bainha cotiledonar ocorre posteriormente, afastando a plântula da semente. Na região micropilar as células da camada de aleurona possuem atividade meristemática no início da germinação. Raízes primária e adventícias, eixo caulinar e folhas de plântulas e plantas jovens diferem anatomicamente de como se apresentam na planta adulta, sendo esses dados inéditos para Bromeliaceae. Dados de imunocitoquímica indicam pectinas metil-esterificadas na testa mucilaginosa da semente, provavelmente evitando o seu dessecamento e contribuindo com sua embebição. Dentre os componentes da parede celular das plântulas as pectinas metil-esterificadas se destacam como os componentes mais frequentes, atuando como reguladores do crescimento vegetal.

Palavras-chave: anatomia; camada de aleurona; imunocitoquímica; plântula; Poales.

Introdução

Bromeliaceae inclui 58 gêneros e cerca de 3400 espécies (Luther 2014) que ocorrem, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais da América (Smith 1934). Seus representantes crescem em diferentes habitats, desde florestas úmidas a campos de altitude, apresentando diferentes formas de vida, o que demonstra a grande versatilidade morfológica e ecofisiológica da família (Smith 1934; Benzing 2000).

Neoregelia L.B.Sm. (Bromelioideae), com aproximadamente 120 espécies (Luther 2014; BFG 2015), inclui tanto indivíduos que crescem em campos rupestres, campos de altitude, restinga, como em ambientes méxicos como a floresta ombrófila densa (Mata Atlântica), seu centro de diversidade (Martinelli et al. 2008; BFG 2015). Devido às diferentes formas de vida de suas espécies (epífitas, rupícolas ou terrícolas) e sua distribuição em diferentes fitofisionomias é considerado um gênero-chave para estudos que relacionam características de sementes e plântulas ao ambiente. Neste gênero, *N. bahiana* (Ule) L.B.Sm. se destaca como uma das espécies mais variáveis morfológicamente quanto à arquitetura da planta e forma das folhas, constituindo um complexo de espécies com ampla distribuição nos campos rupestres ao longo da Cadeia do Espinhaço, entre os Estados de Minas Gerais e Bahia, Brasil (Leme 1998; Versieux et al. 2008; BFG 2015; Silva et al. 2018). Assim, estudos de germinação e de desenvolvimento pós-seminal são importantes para determinar as características envolvidas no estabelecimento de suas populações nos afloramentos rochosos.

Estudos de desenvolvimento pós-seminal abordando a morfologia das plântulas já foram realizados com espécies de Bromeliaceae, com enfoque taxonômico, e forneceram caracteres de valor diagnóstico para gêneros e subfamílias (Müller 1895; Pereira 1988; Scatena et al. 2006; Tillich 2000, 2007; Pereira et al. 2008, 2009; Silva e Scatena 2011a). A germinação dos representantes de Tillandsioideae parece ser marcada pela protusão do cotilédone (Müller 1885; Scatena et al. 2006; Pereira et al. 2008, 2009; Silva e Scatena 2011a), enquanto que em representantes de Bromelioideae e Pitcairnioideae s.l. ocorre primeiramente o desenvolvimento da raiz primária (Müller 1895; Benzing 2000; Mantovani e Iglesias 2005; Scatena et al. 2006; Tillich 2007; Pereira et al. 2008, 2009, 2010; Duarte et al. 2009, 2010; Silva e Scatena 2011a; Vizentin et al. 2016), o que é apontado como condição ancestral para as monocotiledôneas (Tillich 2000). Apesar da importância para a taxonomia, aspectos adaptativos do desenvolvimento pós-seminal ainda são pouco explorados na família, sendo que estudos anatômicos são necessários para um melhor entendimento sobre a estrutura e desenvolvimento das plântulas em Bromeliaceae. Tillich (2007) destaca que as plântulas das

monocotiledôneas, em geral, são muito diversas e com muitos estados de caráter derivados, tornando difíceis as análises morfológicas. Dessa forma, estudos de desenvolvimento pós-seminal, incluindo análises anatômicas, mostram-se essenciais para o entendimento da estrutura das plântulas.

Neste contexto, este estudo teve como objetivo analisar a germinação e anatomia de sementes, e descrever as etapas do desenvolvimento pós-seminal sob microscopia eletrônica de varredura e de luz em duas populações de *N. bahiana*, buscando entender aspectos ecológicos e do desenvolvimento. Este estudo traz descrições inéditas para a família em relação aos aspectos anatômicos de raiz, caule e folha nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta, além de análises imunocitoquímicas, importantes para entender os processos de diferenciação dos tecidos e órgãos.

Material e métodos

Material de estudo – As sementes foram coletadas de duas populações de *Neoregelia bahiana*, uma delas no Parque Nacional da Serra do Cipó, Minas Gerais (K. R. Silva & K. O. Nardi 75; 19°14'48,75"S, 43°30'36,7"W) e outra no município de Mucugê, Bahia (M. V. Dantas-Queiroz et al. 129; 12°58'60"S, 41°15'59"W). Material testemunho foi depositado no Herbarium Rioclarense (HRCB).

Germinação e desenvolvimento pós-seminal - O tamanho (média $\pm$ desvio padrão) das sementes (comprimento x largura) foi medido em 30 amostras de cada população, utilizando-se paquímetro digital (Zaas Precision).

Para análise da porcentagem de germinação e do desenvolvimento pós-seminal, 100 sementes maduras de cada população foram colocadas para germinar em quatro placas de Petri, com 25 sementes cada. As sementes tiveram a camada mucilaginosa removida, posteriormente foram desinfetadas com água sanitária comercial a 10% por 10 minutos e lavadas três vezes em água destilada. As placas de Petri foram forradas com papel filtro umedecido com água destilada e mantidas em câmara de germinação à temperatura de 25-30°C e luz constante. As sementes foram observadas a cada 24 horas e a germinação foi considerada a partir do rompimento do envoltório da semente e emergência do eixo embrionário.

O cálculo de porcentagem de germinação foi realizado de acordo com Labouriau e Valadares (1976). Foram adotados critérios para o estágio de plântula: desenvolvimento

radicular até a expansão total da primeira folha e aparecimento da segunda folha; e para o estágio de planta jovem: expansão total da segunda folha e o aparecimento da terceira folha (Pereira 1988; Pereira et al. 2008; Silva e Scatena 2011a). Os termos utilizados para a descrição das plântulas foram baseados em Pereira (1988) e Tillich (2007). Os diferentes estágios de desenvolvimento foram fotografados com câmera digital (Canon PowerShot S80) acoplada ao estereomicroscópio (Leica EZ4).

Foram registrados o tempo médio para germinação e para o início do desenvolvimento da raiz primária e das raízes adventícias, comprimento médio da raiz primária, tempo médio para o surgimento da bainha cotiledonar e tempo médio do estágio de plântula com a primeira folha totalmente expandida e de planta jovem. Para os cálculos de tempo médio seguiu-se Labouriau e Valadares (1976). O tempo médio de germinação foi calculado a partir da data inicial do experimento, enquanto que o tempo médio de desenvolvimento das estruturas e dos diferentes estágios de desenvolvimento foi calculado a partir da germinação de cada semente. Para as medidas do comprimento da raiz primária foram utilizadas 30 amostras de cada população, no estágio de planta jovem, utilizando-se paquímetro digital (Zaas Precision).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de luz (ML) - Sementes maduras, germinadas, plântulas e plantas jovens foram fixadas em FAA 50 (formaldeído 37%, ácido acético glacial, etanol 50%, 1:1:18 v/v; Johansen 1940) e armazenadas em etanol 70%. Para o estudo sob MEV, as amostras foram desidratadas em série etílica (80, 90 e 100%), submetidas ao ponto crítico (Balzers CPD 050) e metalizadas em ouro (Bal-Tec SCD 050). Imagens foram obtidas com capturador de imagens acoplado ao microscópio (Zeiss, LEO 435 VP).

Para o estudo sob ML, as amostras foram incluídas em (2-hidroxietil)-metacrilato (Leica Historesin Embedding Kit) (Gerrits e Smid 1983) e seccionadas em micrótomo rotativo (Leica RM2235), com 6-8 μ m de espessura. As secções anatômicas foram coradas com ácido periódico – reativo de Schiff (PAS) e azul de toluidina a 0,05% em borato de sódio (O'Brien et al. 1964; Feder e O'Brien 1968) e montadas em lâminas permanentes com Entellan (Merck). Cortes à mão livre foram realizados nas raízes e caules de plântulas e plantas jovens, clarificados em solução de hipoclorito de sódio a 20% e montados em lâminas com água. As imagens foram obtidas com capturador de imagens (Leica DFC 450) acoplado ao microscópio (Leica DM 4000B), utilizando-se o software LAS (Leica Application Suite V3.6.0).

Detecção de pectinas, proteínas e celulose – A detecção de pectinas não esterificadas foi realizada através do reagente vermelho de rutênio (Chamberlain 1932; Sterling 1970), com o qual secções foram coradas por 10 minutos, lavadas e montadas em lâminas com glicerina. As imagens foram obtidas com câmera digital (HC500) acoplada ao microscópio (Leica DM500).

Para as análises imunocitoquímicas de pectinas e proteínas, sementes e diferentes estágios do desenvolvimento pós-seminal (germinação à planta jovem), além de fragmentos de raiz, caule e folhas de plântulas e plantas jovens foram fixados em glutaraldeído 2,5% e formaldeído 4,5% em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) (Karnovsky 1965). A desidratação e inclusão do material seguiu a metodologia descrita anteriormente. O material foi seccionado em micrótomo rotativo, com 5 µm de espessura, e afixado em lâminas. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em solução de proteína de leite (3%) em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,1 durante 30 minutos, seguida de incubação por uma hora em diferentes anticorpos monoclonais primários (Tabela 1), sintetizados por Centre for Plant Sciences, University of Leeds, UK, diluídos na solução de leite em pó 3%/PBS (1:10). Para o controle negativo foi realizada incubação sem a adição dos anticorpos monoclonais primários. As lâminas foram lavadas por cinco vezes em PBS e incubadas em solução de anticorpo secundário FITC (Sigma, USA) diluído na solução de leite em pó 3%/PBS (1:100) e assim mantidas no escuro por uma hora. As lâminas foram novamente lavadas por cinco vezes em PBS e montadas com solução PBS e glicerina. Para análise da presença ou ausência dos epítomos citados na Tabela 1, o material foi levado ao microscópio de fluorescência (Leica DM4000B) sob filtro FITC com câmera monocromática (Leica DFC3000G) e sensor CCD.

Para a detecção de celulose, secções foram coradas com Calcofluor White (solução estoque, 0,5 g/l) diluído em PBS, por 30 segundos no escuro (Herth e Sghnepf 1980). As lâminas foram montadas com solução PBS e glicerina. As análises foram realizadas com o microscópio de fluorescência sob filtro DAPI.

Resultados

Morfologia e anatomia da semente - As sementes apresentam formato obovado, como se observa na Figura 1A e nos diferentes estágios do desenvolvimento pós-seminal (Fig. 2A-H). O tamanho das sementes é de $2,15 \pm 0,17$ mm x $0,93 \pm 0,08$ mm na população de Mucugê, Bahia, e $2,58 \pm 0,20$ mm x $1,08 \pm 0,08$ mm na população da Serra do Cipó, Minas Gerais.

As sementes apresentam envoltório mucilaginoso (Fig. 1A-C), que corresponde à testa constituída por duas camadas, exotesta e endotesta (Fig. 1E). Próximo ao funículo ocorre um

número maior de camadas (Fig. 1C). As células da testa são alongadas longitudinalmente e reagem positivamente ao PAS, que detecta polissacarídeos (Fig. 1F). As análises histoquímicas com Calcofluor indicaram leve espessamento celulósico nas paredes das células que formam o envoltório mucilaginoso, principalmente na exotesta. Internamente ao envoltório mucilaginoso, observa-se uma camada mecânica, o exotégmen (Fig. 1D-E), formada por células alongadas longitudinalmente (Fig. 1G), com expansões celulósicas nas paredes anticlinais (Fig. 1E) e com polissacarídeos detectados com PAS (Fig. 1G). A camada mais interna do envoltório seminal, o endotégmen, é formado por células isodiamétricas que, em secção transversal, apresentam lume maior em relação às demais células do envoltório seminal, e com paredes anticlinais e periclinal interna lignificadas (espessamento em U), além de armazenarem compostos fenólicos (Fig. 1D-E, H). Sob o envoltório seminal ocorre o endosperma diferenciado na camada de aleurona, adjacente ao envoltório seminal e, internamente, em parênquima amilífero (Fig. 1C-E). A camada de aleurona apresenta células de arranjo compacto e paredes levemente espessadas, com reação positiva ao PAS (Fig. 1E, I) e envolve o parênquima amilífero (Fig. 1C, E) e o embrião (Fig. 1B, D). Observa-se cutícula espessa entre a testa e o tégmen e entre o envoltório seminal e a camada de aleurona (Fig. 1E, setas).

O embrião é pequeno em relação à semente e localiza-se na porção micropilar (Fig. 1B), é diferenciado em cotilédone e eixo hipocótilo-radicular, apresentando meristema apical caulinar conspicuo envolto pela bainha cotiledonar e meristema apical radicular protegido por coifa (Fig. 1D). Na região do ápice radicular observa-se também algumas células formando um suspensor reduzido (Fig. 1D, cabeça de seta).

Germinação e aspectos morfológicos do desenvolvimento pós-seminal - Neoregelia bahiana apresentou germinação epígea, com alta porcentagem de sementes germinadas nas duas populações estudadas, sendo que aquelas provenientes de Mucugê, Bahia, apresentaram um tempo médio mais curto de germinação (Tabela 2).

Nas duas populações, a germinação e a morfologia das plântulas e plantas jovens são semelhantes (Fig. 2A-H). Após a embebição, a germinação inicia-se com o rompimento do envoltório da semente na região micropilar e emergência do eixo embrionário (Figs. 2A; 3A). O eixo embrionário continua a se alongar e se curva, enquanto se diferencia um anel de tricomas (colar de rizóides) em sua porção distal (Fig. 2B). Com o desenvolvimento do eixo embrionário, o hipocótilo e a raiz primária começam a se diferenciar (Fig. 2C), esta última apresentando muitos pelos absorventes (Fig. 3B). Posteriormente a bainha cotiledonar se

desenvolve, envolvendo o epicótilo bastante reduzido, com o meristema apical caulinar (Fig. 2D), do qual se origina a primeira folha (eófilo) (Fig. 2E). Durante a diferenciação da bainha cotiledonar e expansão e diferenciação das primeiras folhas, observa-se o desenvolvimento de raízes adventícias (Figs. 2F-G; 3C). A plântula com a primeira folha totalmente expandida e a segunda em desenvolvimento apresenta 1-3 raízes adventícias (Fig. 2F-G). Posteriormente, com a segunda folha totalmente expandida e a emergência da terceira folha, inicia-se o estágio de planta jovem (Fig. 2H). Comparando-se as duas populações estudadas, o tempo médio para desenvolvimento das raízes adventícias e dos estágios de plântula e de planta jovem foi menor para a população de Mucugê, Bahia (Tabela 2). Ainda, o comprimento médio da raiz primária é menor e o sistema radicular menos desenvolvido nas plantas jovens desta população, quando comparadas com aquelas da Serra do Cipó, Minas Gerais (Tabela 2).

Tanto no hipocótilo quanto na margem da bainha cotiledonar e das folhas em expansão ocorrem tricomas capitados e unisseriados (Fig. 3C-E, setas). Na bainha cotiledonar e nas folhas também ocorrem estômatos tetracíticos na face abaxial (Fig. 3F'G, cabeças de seta).

Aspectos anatômicos do desenvolvimento pós-seminal – Na região micropilar observa-se que o rompimento do envoltório seminal ocorre pela atividade das células do meristema apical radicular em conjunto com a diferenciação e alongamento inicial do hipocótilo (Fig. 4A). Posteriormente, a raiz primária e o hipocótilo começam a ser distinguidos entre si pela diferenciação do colar de rizóides, que delimita a região de transição entre a raiz primária e o hipocótilo (Fig. 4B-C). Com o alongamento do hipocótilo e diferenciação do cotilédone, principalmente pelo alongamento da bainha cotiledonar, ocorre a saída do sistema caulinar do interior da semente (Fig. 4C-D). O cotilédone diferenciado apresenta uma região apical haustorial em contato com o endosperma, uma região alongada entre a região haustorial e a bainha (fanerômero reduzido), e a bainha cotiledonar (Fig. 4D, F). O fanerômero se alonga após a germinação, posteriormente ao desenvolvimento da bainha cotiledonar (Fig. 4D). Tanto o meristema apical caulinar quanto os primeiros primórdios foliares ficam protegidos pela bainha cotiledonar (Fig. 4D). Tricomas multicelulares, unisseriados se desenvolvem na região do meristema apical caulinar, entre os primórdios foliares, apresentando células de citoplasma denso (Fig. 4D, H). Durante a expansão das primeiras folhas, a raiz primária continua a se desenvolver e formam-se raízes adventícias a partir do hipocótilo e do epicótilo (Fig. 4D-E).

O cotilédone permanece preso à semente com a região haustorial ligada ao endosperma (Fig. 4D, F), e apresenta um único feixe vascular conectando-o ao hipocótilo (Fig. 4D, F-G). O mesofilo do cotilédone é homogêneo, formado por células parenquimáticas que acumulam amido (Fig. 4F-G).

Anatomia das plântulas e plantas jovens - As raízes primária e adventícias, assim como a região do colar, apresentam os tecidos organizados em velame, córtex e cilindro vascular (Fig. 5A-C). Nas raízes, a epiderme com células diferenciadas em pêlos radiculares constitui o epivelame (Fig. 5B-C). Entretanto, a organização do sistema de preenchimento e vascular é variável entre os diferentes tipos de raízes. A raiz primária e a raiz adventícia que se origina do hipocótilo apresentam estrutura semelhante com células parenquimáticas de arranjo compacto (Fig. 5B), sendo o córtex homogêneo, e endoderme constituída de células com espessamento de parede em U; o cilindro vascular é delimitado por periciclo uniestratificado que circunda dois cordões de xilema, entremeados por floema (Fig. 5E). Já as raízes adventícias que se originam do epicótilo se distinguem por apresentar córtex composto por células parenquimáticas que delimitam espaços intercelulares conspícuos, sendo a camada mais externa (exoderme) diferenciada, com células de paredes lignificadas (Fig. 5C). A endoderme apresenta células com espessamento de parede em U e, no cilindro vascular, observa-se periciclo uniestratificado e três a cinco cordões de xilema alternados com cordões de floema (Fig. 5C, F).

A região do colar é dilatada (Fig. 4B-C), com córtex parenquimático apresentando maior número de camadas de células (Fig. 5A). Nessa região, os cordões de xilema estão deslocados para o mesmo lado no cilindro vascular (Fig. 5D, cabeças de seta), pois vão se unir para formar o feixe vascular único do hipocótilo.

O hipocótilo apresenta epiderme uniestratificada e córtex homogêneo parenquimático (Fig. 6A) assim como o epicótilo (Fig. 6B). Os tricomas presentes na epiderme do hipocótilo possuem uma célula basal, pedículo com duas a três células e cabeça glandular unicelular (Fig. 6F). Nas figuras 6A e D raízes adventícias são observadas atravessando o córtex do hipocótilo. No hipocótilo a endoderme é distinta, com células de paredes espessadas e lignificadas, que podem armazenar compostos fenólicos (Fig. 6C-D). O sistema vascular formado por um único feixe colateral é delimitado pelo periciclo uniestratificado (Fig. 6C), que pode se dividir para formar raízes adventícias (Fig. 6D, setas). Esse feixe vascular diverge para a bainha cotiledonar (Fig. 6B). Já no epicótilo, xilema e floema formam plexos

vasculares em uma medula parenquimática, com saída de traços vasculares para as folhas (Fig. 6B, E).

Nos estágios iniciais do desenvolvimento das plântulas, as células corticais do hipocótilo apresentam grande quantidade de grãos de amido e idioblastos com ráfides e polissacarídeos (Figs. 4C; 6G). Já nos estágios finais de plântula e no estágio de planta jovem as suas células são maiores e o acúmulo de grãos de amido predomina no córtex e na medula do epicótilo e na bainha cotiledonar (Fig. 6B, E).

As três primeiras folhas que se formam a partir do meristema apical caulinar apresentam as mesmas características anatômicas: epiderme uniestratificada, mesofilo heterogêneo e três feixes vasculares (Fig. 7A-C). A epiderme apresenta células maiores na face adaxial do que aquelas da face abaxial; suas células têm parede periclinal externa levemente espessada, celulósica e são recobertas por cutícula delgada (Fig. 7B-C). Em vista frontal as células epidérmicas são retangulares e apresentam paredes retas a levemente sinuosas (Fig. 7D) em ambas as faces. Estômatos ocorrem na face abaxial da folha, no mesmo nível das demais células epidérmicas (Fig. 7B) e são do tipo teracítico (Fig. 7D). Eventualmente estômatos podem ocorrer na face adaxial na região da margem (Fig. 7C). As câmaras subestomáticas são inconspícuas (Fig. 7B-C). Na margem foliar, em secção transversal, as células epidérmicas apresentam paredes espessadas em U e lignificadas (Fig. 7C-E) e ocorrem tricomas com uma célula basal, pedículo bi ou triclular e cabeça glandular unicelular (Fig. 7E), semelhantes aos tricomas do hipocótilo.

O mesofilo é composto por hipoderme aquífera voltada à face adaxial, com células grandes e arredondadas, e parênquima clorofiliano voltado à face abaxial, o qual é homogêneo, formado por células arredondadas (Fig. 7A-C). Os feixes vasculares são colaterais, e imersos no parênquima clorofiliano, próximos à epiderme abaxial (Fig. 7A-B). Idioblastos com ráfides e polissacarídeos ocorrem no córtex das raízes primária e adventícias, do hipocótilo e do epicótilo e também no mesofilo das folhas e se diferenciam já no início do desenvolvimento desses órgãos, como ilustrado pela Figura 6G.

Distribuição de compostos pécnicos e proteínas na parede celular – Na semente madura, pectinas ocorrem na parede das células do envoltório mucilaginoso, especialmente na exotesta, onde foram detectadas pectinas não esterificadas (Fig. 8A) e pectinas homogalacturonanas (HGs) metil-esterificadas, por JIM7 (Fig. 8B).

Durante a germinação, tanto as células do ápice radicular, como aquelas do hipocótilo em desenvolvimento e também do meristema apical caulinar apresentam núcleo conspícuo e

citoplasma denso, conforme indicado a partir da autofluorescência (Fig. 9A). O mesmo se observa para as células da camada de aleurona na região micropilar (Fig. 9A). Essas células podem se dividir e alongar durante o crescimento do eixo embrionário, tendo sido detectados em suas paredes (1→4) β -D-galactanos (Fig. 9B) e (1 → 5) α -L-arabinanos (Fig. 9C). Além das pectinas, foram detectadas nas células de aleurona na região micropilar, após a germinação, durante o alongamento do eixo embrionário, as proteínas: extensinas (Fig. 9D, F) e AGPs (Fig. 9E). Nos estágios finais de diferenciação das plântulas, as células da camada de aleurona nas regiões mediana e calazal da semente madura adquiriram reação positiva para HGs por JIM5 e JIM7, e (1→5) α -L-arabinanos (Fig. 8C-E, respectivamente).

Epítomos para HGs foram detectados por JIM7 nas células de todo o corpo da plântula durante o alongamento e curvatura do eixo embrionário (Fig. 9G) até a completa diferenciação do eixo caulinar e do cotilédone (Fig. 9H, J), atuando na diferenciação dos sistemas de revestimento, preenchimento e vascular. Também, durante a diferenciação do hipocótilo e da bainha cotiledonar, observa-se a marcação para epítomos (1→4) β -D-galactanos no parênquima de preenchimento e no floema desses órgãos (Fig. 9I). As células meristemáticas dos primórdios foliares e da bainha cotiledonar também apresentaram autofluorescência quando ainda no interior da semente (Fig. 9F, I).

No estágio de planta jovem, as raízes primária e adventícias apresentaram HGs detectadas por JIM7 no cilindro vascular, em camadas de células subsequentes ao meristema apical da raiz nas zonas de alongamento e de diferenciação (Fig. 10A), durante o início da diferenciação do xilema, e também do floema (Fig. 10B). Nessas raízes também foram detectados (1→4) β -D-galactanos no floema (Fig. 10C). No córtex parenquimático das raízes adventícias com origem do epicótilo detectaram-se HGs por JIM7 nas junções celulares (Fig. 10B, cabeça de seta). No eixo caulinar a detecção de (1→4) β -D-galactanos ocorreu apenas entre as células do floema dos plexos vasculares do epicótilo (Fig. 10D). Já nas folhas, ocorreu a detecção de HGs por JIM7 na epiderme, principalmente nas paredes periclinais externas e nas junções celulares e também nas paredes e junções celulares nas células da hipoderme aquífera e parênquima clorofiliano (Fig. 10E-F); e de (1→4) β -D-galactanos nas paredes das células do parênquima clorofiliano e nos tecidos vasculares, principalmente no floema (Fig. 10G).

Discussão

Estrutura da semente e sua relação com a germinação

A estrutura das sementes em Bromeliaceae é uma característica importante para o reconhecimento de suas subfamílias e está relacionada ao modo de dispersão (Müller 1895; Smith e Downs 1974, 1977, 1979; Smith e Till 1998; Benzing 2000). Na maioria das subfamílias os frutos são do tipo cápsula e suas sementes são aladas ou plumosas, associadas com a dispersão pelo vento (Smith e Downs 1974, 1977; Varadarajan e Gilmartin 1988; Smith e Till 1998; Benzing 2000). As Bromelioideae, entretanto, possuem frutos bacáceos e sementes com envoltório mucilaginoso, características associadas à dispersão zoocórica (Smith e Downs 1974, 1979; Varadarajan e Gilmartin 1988; Smith e Till 1998; Benzing 2000). Nossos resultados mostram que o envoltório mucilaginoso das sementes maduras representa a testa, que é comestível, como usualmente descrita na literatura (Benzing 2000), corroborando a denominação de sarcotesta (Smith e Till 1998). Em ambas as camadas as células são ricas em polissacarídeos como conteúdo celular e apresentam paredes com grande quantidade de compostos pécticos e celulose, o que propicia a retenção de água nesse tecido, facilitando os processos de embebição e germinação. Além disso, a testa mucilaginosa tem sido associada com a função de proteção das sementes, evitando a dessecação das mesmas no ambiente (Silva e Scatena 2011a). As HGs observadas no envoltório mucilaginoso atuam na adesão celular (Bouton et al. 2002, Willats et al. 2001), relacionada com outras funções desempenhadas pela testa, como proteção e revestimento da semente.

Já as duas camadas mais internas do envoltório seminal, que correspondem ao exotégmen e endotégmen, proporcionam suporte mecânico. Nas sementes maduras de Bromeliaceae a presença de exotégmen e endotégmen uniestratificados parece ser comum (Szidat 1922; Smith e Downs 1974; Palací et al. 2004; Magalhães e Mariath 2012; Prado et al. 2014). Estudos anatômicos têm mostrado que as sementes de Tillandsioideae possuem células do exotégmen menores, com paredes espessadas, enquanto as células do endotégmen são maiores e armazenam compostos fenólicos (Magalhães e Mariath 2012; Prado et al. 2014), como nas sementes de *N. bahiana*. Essas similaridades entre espécies de diferentes subfamílias de Bromeliaceae indicam que o tégmen apresenta estrutura mais uniforme na família, enquanto a testa pode se apresentar mucilaginosa, ou formar apêndices plumosos, como nas espécies de Tillandsioideae (Müller 1895; Smith e Downs 1974, 1977; Smith e Till 1998; Benzing 2000). Testes histoquímicos realizados com PAS detectaram polissacarídeos

no conteúdo e nas paredes das células do tégmen nas sementes de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* (L.B.Sm.) L.B.Sm. (Prado et al. 2014). No presente estudo, também se observa a presença de polissacarídeos nessas células, destacando-se as expansões de celulose na parede das células do exotégmen, provavelmente também relacionadas com a capacidade de embebição da semente.

Sementes albuminosas como as de *N. bahiana* com a camada mais externa do endosperma diferenciada nas células de aleurona já foram observadas anteriormente para Bromeliaceae (Szidat 1922; Smith e Downs 1974; Palací et al. 2004; Magalhães e Mariath 2012; Prado et al. 2014). Prado et al. (2014) relatam diferentes compostos nessas células, como proteínas no citoplasma e polissacarídeos (celulose e/ou pectinas) nas paredes. Nossos resultados mostram que após a germinação, durante o alongamento do eixo embrionário, as células da camada de aleurona na região micropilar apresentam atividade meristemática, ocorrendo divisões e alongamento celular, fazendo com que esse tecido acompanhe o desenvolvimento do eixo embrionário, com a função de proteger o ápice radicular e reduzir o atrito com o envoltório mecânico da semente e com o substrato. A deposição de pectinas (1 → 4) β -D-galactanos e (1 → 5) α -L-arabinanos, além de extensinas e AGPs nessas células, principalmente nas junções celulares, pode promover adesão celular, flexibilidade e pode alterar a porosidade da parede celular (Willats et al. 2001, Bouton et al. 2002, Albersheim et al. 2011, Oliveira et al. 2014). Em espécies de *Vriesea* também foi observada a presença de camada de aleurona circundando o endosperma amifífero e o embrião, sendo o conteúdo dessas células próximas ao embrião, na região micropilar, diferente daqueles das células que circundam o endosperma amilífero (Magalhães e Mariath 2012). Segundo Magalhães e Mariath (2012) a diferença de conteúdo nas células de aleurona na região micropilar está relacionada com a morte celular programada dessas células, uma vez que já teriam desempenhado sua função. De fato isso pode ocorrer em algumas espécies de Bromeliaceae, sabendo que a raiz primária, geralmente, não se desenvolve nas Tillandsioideae. Nas espécies de *Tillandsia* estudadas por Magalhães e Mariath (2012) também não se observou a camada de aleurona na região micropilar nas sementes maduras, reforçando essa hipótese. Desta forma, os resultados encontrados por Magalhães e Mariath (2012) e agora em *N. bahiana* indicam que as células de aleurona podem atuar de forma diferente durante o desenvolvimento do embrião e durante a germinação. Já após a germinação, a ocorrência de diferentes componentes pécticos na parede celular das células da camada de aleurona nas porções mediana e calazal da semente, que circundam o endosperma amilífero, mostram que a estrutura da parede dessas células é dinâmica e se altera durante o desenvolvimento da

plântula. Estas alterações no padrão de deposição de componentes da parede celular das células da camada de aleurona podem estar relacionadas com a manutenção da integridade deste tecido, provavelmente mantendo a estabilidade do endosperma remanescente, visto que as plântulas da espécie estudada e das Bromelioideae em geral (Smith e Downs 1974) dependem do endosperma para seu desenvolvimento, por maior período de tempo.

Com relação ao embrião nas Bromeliaceae, esse é geralmente pequeno em relação ao tamanho da semente e diferenciado em cotilédone e eixo hipocótilo-radicular (Müller 1895; Billings 1904; Szidat 1922; Smith e Downs 1974; Benzing 2000; Scatena et al. 2006; Mendes et al. 2010; Magalhães e Mariath 2012; Prado et al. 2014). Em espécies de *Tillandsia*, entretanto, que são plumosas, o embrião pode ocupar todo o interior da semente madura e o endosperma pode estar ausente, como relatado para *T. recurvata*, que apresenta cotilédone mais desenvolvido (Magalhães e Mariath 2012). Ressalta-se que em *N. bahiana* observa-se a formação de um suspensor reduzido, que persiste na semente madura. Essa característica também foi relatada durante o desenvolvimento do embrião de *T. usneoides* (L.) L. (Tillandsioideae) por Billings (1904). Tal característica difere Bromeliaceae de outras Poales, como Xyridaceae e Mayacaceae, cujo embrião é compacto e indiferenciado e o suspensor é considerado vestigial e efêmero, degenerando-se durante o desenvolvimento do embrião (Nardi 2018).

Estudos prévios com outras Bromeliaceae mostram que as sementes comumente apresentam altas taxas de germinação (ex. Smith e Downs 1974; Pinheiro e Borghetti 2003; Pompelli 2006; Vieira et al. 2007; Pereira et al. 2008, 2009; Duarte et al. 2010; Silva e Scatena 2011a). Para *N. bahiana*, a alta porcentagem de germinação das sementes pode ser um dos fatores que contribuem à sua ampla distribuição ao longo da Cadeia do Espinhaço (Leme 1998; Versieux et al. 2008; BFG 2015; Silva et al. 2018). Estudos prévios com essa espécie, ocorrente na Serra da Piedade, Minas Gerais, também revelou altas taxas de germinação, em especial nos tratamentos com maior umidade do substrato, luminosidade e temperatura (Marques et al. 2014), esses dois últimos fatores comuns nos campos rupestres, ambiente natural da espécie.

Desenvolvimento pós-seminal e morfologia das plântulas e plantas jovens

Quanto aos aspectos morfológicos do desenvolvimento pós-seminal, as etapas observadas nas duas populações estudadas são semelhantes às observadas em representantes de outros gêneros de Bromelioideae, como em *Acanthostachys* Klotzsch, *Aechmea* Ruiz &

Pav., *Ananas* Mill., *Araeococcus* Brongn., *Billbergia* Thunb., *Bromelia* L., *Canistrum* E. Morren, *Cryptanthus* Otto & A. Dietr., *Hohenbergia* Schult. & Schult. f., *Nidularium* Lem., *Orthophytum* Beer, *Portea* Brongn. & K. Kloch, *Pseudananas* (Hassl.) Harms, *Quesnelia* Gaudich. e *Wittrockia* Lindm., além de outras *Neoregelia* (Szidat 1922, Smith e Downs 1974; Pereira 1988; Pereira et al. 2008; Silva e Scatena 2011a). Em todos esses gêneros ocorre o desenvolvimento inicial da raiz primária. Como relatado para *N. bahiana*, a ruptura do envoltório seminal na região micropilar se dá pelo desenvolvimento do eixo embrionário, o qual inicia seu alongamento pela atividade das células do meristema apical radicular em conjunto com o desenvolvimento do hipocótilo. Szidat (1922) observou o funcionamento da radícula durante a germinação em Bromelioideae e Benzing (2000) descreve que o crescimento intercalar próximo à base do hipocótilo empurra parte desse órgão e também a radícula através do envoltório da semente. Smith e Downs (1974) relatam que a parte inferior do cotilédone (bainha) se alonga e empurra a extremidade radicular para fora da semente. De fato, a bainha cotiledonar como vista na plântula de *N. bahiana* já se estabelece no embrião de outras Bromeliaceae durante a formação da semente (Müller 1895; Billings 1904; Szidat 1922; Smith e Downs 1974; Tillich 2000, 2007; Mendes et al. 2010; Magalhães e Mariath 2012; Prado et al. 2014). Porém, ao menos para a espécie aqui estudada, a bainha cotiledonar parece não contribuir com a ruptura da semente, marcando o início da germinação, sendo que seu desenvolvimento ocorre posteriormente, quando a raiz primária já está se desenvolvendo. Conforme indicado pela autofluorescência, células em divisão e diferenciação na região da bainha cotiledonar no início do seu desenvolvimento demarcam o estabelecimento de um meristema intercalar que promove o alongamento dessa estrutura, com a função de afastar a plântula da semente e proteger o epicótilo, o meristema apical caulinar e os primórdios foliares.

A diferenciação do cotilédone em conjunto com o alongamento do eixo embrionário e diferenciação do hipocótilo se relacionam com a germinação do tipo epígea em *N. bahiana*, elevando a semente e o meristema apical caulinar acima do substrato. Nas Tillandsioideae é frequente que a raiz primária não se desenvolva (Müller 1895; Billings 1904; Smith e Downs 1974; Scatena et al. 2006; Tillich 2007; Pereira et al. 2008, 2009; Silva e Scatena 2011a; Magalhães e Mariath 2012) e, desta forma, a germinação deve ser precedida pelo alongamento do eixo embrionário em conjunto com o cotilédone, mas não ocorrendo atividade do meristema apical da raiz primária.

Nossos resultados mostram que o estabelecimento da raiz primária é evidente após a diferenciação dos rizóides na região do colar. Essa região se distingue pelo maior diâmetro e

pela presença de tricomas unicelulares, sendo uma região de transição entre o hipocótilo e a raiz primária. Assim, o colar de rizóides se mostra como uma estrutura importante para distinguir o eixo caulinar da raiz primária nas Bromelioideae durante os estágios iniciais de diferenciação da plântula. Segundo Tillich (2007), os rizóides são estruturas diferentes dos pelos radiculares já que são formados pela diferenciação da epiderme na região do colar, enquanto que os pelos radiculares se diferenciam da protoderme formada a partir do meristema apical radicular. De fato, os rizóides se formam a partir da diferenciação da epiderme durante o alongamento do eixo embrionário, sendo, portanto, as primeiras estruturas a estabelecer contato com o substrato (Tillich 2007), enquanto a raiz primária ainda não está desenvolvida. Nossos resultados mostram que a região do colar distingue-se anatomicamente do hipocótilo. Por ser uma região de transição, apresenta córtex com maior número de camadas e no cilindro vascular ocorre a convergência do xilema para formar o feixe vascular único do hipocótilo.

O cotilédone preso ao tecido nutritivo da semente evidencia sua função haustorial durante o estabelecimento das plântulas e plantas jovens de *N. bahiana*, assim como verificado em diversas espécies de Poales, de diferentes famílias (Tillich 2007). Nas Bromelioideae essa condição parece se manter por um período maior de tempo (Smith e Downs 1974), indicando uma maior necessidade nutricional fornecida pelo endosperma, em relação a outros representantes de outras subfamílias. O cotilédone preso no interior da semente durante todo o desenvolvimento da plântula caracteriza a germinação do tipo criptocotiledonar (Tillich 2007). Estudos anteriores descrevem que o cotilédone das Bromeliaceae, em sua maioria, apresenta o hipofilo curto, diferenciado em uma bainha, enquanto que o hiperfilo seria haustorial, o que caracteriza o cotilédone como compacto – condição ancestral em Poales (Tillich 2000, 2007). Apesar de reduzido à bainha, o hipofilo em *N. bahiana*, de coloração verde nos estágios intermediários e finais de plântula, com estômatos e parênquima de reserva no mesofilo, provavelmente tem função assimiladora.

O hipofilo corresponde à porção basal e bifacial do cotilédone e sua morfologia é variável em Poales, bem como em Bromeliaceae (Tillich 2007). Em Bromelioideae, pode ser reduzido à bainha (sheath-like), geralmente verde, enquanto nas Tillandsioideae é comum a formação de um lobo mediano na bainha (median sheath lobe), já nas Pitcairnioideae s.l. ocorre o hipofilo reduzido à bainha (sheath-like) ou hipofilo laminar (blade-like) (Szidat 1922; Smith e Downs 1974; Pereira 1988; Tillich 2000, 2007; Pereira et al. 2010; Silva e Scatena 2011a).

No hiperfilo, o qual corresponde à parte distal e unifacial do cotilédone também ocorrem variações morfológicas, podendo se apresentar de três formas: haustorial e completamente encoberto pela semente – o que seria a condição ancestral para Bromeliaceae; ou pode alongar consideravelmente, criando certa distância entre a semente e bainha cotiledonar, formando o apócole ou o fanerômero, como observado em *N. bahiana*. Considerando esse alongamento e sabendo que o apócole é restrito para plântulas hipógeas de palmeiras com germinação remota (que enterra a plúmula) (Tillich 2007), interpretamos aqui essa estrutura como um fanerômero reduzido. O fanerômero é uma estrutura especializada, que além do alongamento considerável entre a semente e a bainha cotiledonar, apresenta função assimiladora, ocorrendo em representantes de outras famílias de Poales, como Juncaceae, Typhaceae e Restionaceae, e também em representantes de outras ordens, como Alismatales (Tillich 2007). Em Bromeliaceae, essa estrutura levemente alongada também já foi chamada de pecíolo do cotilédone por Pereira (1988), enquanto que Mantovani e Iglesias (2005) usam o termo suspensor. Apesar desse eixo de alongamento do hiperfilo cotiledonar ser curto em *N. bahiana*, ele se difere tanto da bainha quanto do haustório e também contribui afastando a plântula da semente, embora a bainha cotiledonar, mais desenvolvida, seja a principal estrutura responsável por essa função.

Com relação à morfologia da plântula, Pereira (1988), ao classificar os morfotipos de plântulas de diferentes gêneros de Bromelioideae, caracteriza as de *Neoregelia* como pertencentes ao tipo I por apresentar a primeira folha lanceolada e plana (inserida horizontalmente no caule); bordos da bainha cotiledonar afastados; raiz primária curta; e pecíolo cotiledonar diferenciado (aqui interpretado como fanerômero reduzido). Contudo, observamos que em *N. bahiana* as primeiras folhas (eófilos) apresentam lâminas evidentemente inseridas no caule de forma inclinada e raiz primária com ampla variação no comprimento, sendo especialmente longas nas plântulas e plantas jovens da Serra do Cipó. Deve-se ressaltar, porém, que todas as espécies de *Neoregelia* analisadas por Pereira (1988): *N. ampullacea* (E. Morren) L.B.Sm., *N. carolinae* (Beer) L.B.Sm., *N. concentrica* (Vell.) L.B.Sm., *N. cruenta* (R. Graham) L.B.Sm., *N. johannis* (Carrière) L.B.Sm. e *N. zonata* L.B.Sm., estão distribuídas no domínio Mata Atlântica (BFG 2015) e, desta forma, as diferenças morfológicas observadas no desenvolvimento pós-seminal podem estar relacionadas ao ambiente. Estudos anatômicos e de desenvolvimento com outras espécies de *Neoregelia* ocorrentes na Mata Atlântica, assim como de outras Bromelioideae, são necessários para um melhor entendimento sobre as adaptações das plântulas desta subfamília aos diferentes ambientes onde ocorrem.

Considerando as duas populações estudadas, a população de Mucugê apresenta planta jovem com raiz primária mais curta, com desenvolvimento de raízes adventícias e das folhas em menor período de tempo. É interessante ressaltar, entretanto, que nas duas populações de *N. bahiana* a raiz primária tem capacidade de se desenvolver por certo período de tempo, inclusive desenvolvendo raízes laterais. As variações no comprimento da raiz primária e no tempo de desenvolvimento do sistema radicular e das primeiras folhas podem estar relacionadas com características genéticas que interferem no estabelecimento das plântulas que, em conjunto com as condições ambientais, proporcionam o aspecto morfológico dos indivíduos adultos. O tempo de desenvolvimento dos diferentes estágios, bem como suas variações, ainda fornece indícios de que a reprodução sexuada promove aspecto heterogêneo nas populações de *N. bahiana* quanto ao porte e estabelecimento da idade reprodutiva.

Anatomia de raízes, eixo caulinar e folhas: contribuições para o entendimento da estrutura vegetativa de plantas jovens de Bromeliaceae

Durante o desenvolvimento pós-seminal a diferenciação dos idioblastos contendo as ráfides ainda nos estágios iniciais dos órgãos em desenvolvimento pode desempenhar defesa contra herbívoros (Franceschi e Nakata 2005) e promover aumento de massa aos tecidos (Evert 2006), conferindo estabilidade à planta jovem. Assim, a presença dessas células indica que esses tipos de cristais estão relacionados com os tecidos em processo de diferenciação, apresentando metabolismo celular acentuado. Os polissacarídeos detectados nesses idioblastos estão associados com a cristalização das ráfides e modulam suas propriedades químicas e morfológicas (Kausch e Horner 1983; Webb et al. 1995; Prychid e Rudall 1999; Franceschi e Nakata 2005). Esses cristais são frequentes nos diferentes órgãos de Bromeliaceae (Tomlinson 1969) e das monocotiledôneas (Prychid e Rudall 1999; Prychid et al. 2008) e também foram relatados para indivíduos adultos de *N. bahiana*, tanto nos órgãos vegetativos, como também no eixo da inflorescência e no pedicelo de flores e frutos (Silva et al. 2018).

Os resultados apresentados para a caracterização anatômica dos órgãos vegetativos das plantas jovens são inéditos para Bromeliaceae. As raízes primária e adventícias com origem do hipocótilo apresentam estrutura semelhante, a qual se mostra relacionada à presença de um único feixe vascular no hipocótilo. Já as raízes adventícias com origem no epicótilo se distinguem pelo córtex heterogêneo e pelo cilindro vascular triarco ou pentarco. A presença de velame em todos os tipos de raízes é indicada como uma característica comum para a família (Tomlinson 1969). Já o epivelame apresentando pêlos radiculares e a endoderme com

células de paredes anticlinais mais espessadas são comuns para Bromelioideae (Tomlinson 1969; Pita e Menezes 2002; Proença e Sajo 2008; Silva e Scatena 2011b) e também estão presentes nas raízes adventícias dos indivíduos adultos (Silva et al. 2018). Entretanto, nos indivíduos adultos podem ser observadas raízes com maior diâmetro, com maior número de camadas corticais e o cilindro vascular poliarco, delimitando medula esclerenquimática nas porções mais velhas (Silva et al. 2018). Nas raízes, os inúmeros pelos radiculares, assim como o desenvolvimento da raiz primária, são importantes para a fixação das plântulas sobre as rochas e na absorção de água e nutrientes (Peterson e Farquhar 1996). Benzing (2000) cita que as raízes possuem grande importância para o estabelecimento de plântulas de Bromelioideae e que estas geralmente se estabelecem em substratos com certa umidade. Neste sentido, as plântulas e plantas jovens aqui observadas, mesmo com essas características, podem ser mais susceptíveis à mortalidade devido às poucas estratégias associadas ao aporte hídrico e nutricional em comparação com os indivíduos adultos, visto que suas folhas não possuem escamas absortivas, não formam tanque e as bainhas foliares não são amplas como nos indivíduos adultos. De fato, as maiores taxas de mortalidade durante o estabelecimento das bromélias ocorrem durante os estágios de plântula, devido, principalmente, à falta de água (Benzing 2000; Winkler et al. 2005), por serem na grande maioria, epífitas ou rupícolas.

Já no eixo caulinar, o hipocótilo se destaca como o órgão de alongamento durante o crescimento do eixo embrionário até a diferenciação da bainha cotiledonar e expansão da primeira folha. Seu único feixe vascular se conecta à raiz primária e ao cotilédone, possibilitando o suplemento nutricional fornecido pelo endosperma através do cotilédone que fica preso no interior da semente. O epicótilo, por sua vez, corresponde a uma estrutura reduzida devido aos entrenós curtos onde estão inseridas as folhas. Na base das folhas, assim como no meristema apical, os tricomas unisseriados podem estar associados com o desenvolvimento das folhas, evitando o atrito entre as mesmas e com o eixo caulinar, durante o processo de expansão da lâmina. Esses tricomas glandulares na base de folhas jovens e próximos às gemas axilares já haviam sido relatados para *Tillandsia tricholepsis* Baker (Tillandsioideae) (Oliveira 2017) e *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B.Sm. (Bromelioideae) (Ballego-Campos e Paiva 2018) e classificados como coléteres devido à natureza química mista da substância por eles secretada, contendo compostos lipofílicos, mucilagem e proteínas.

Na região do epicótilo a estrutura interna é complexa pela desorganização dos tecidos vasculares com saída de traços vasculares para as folhas e raízes adventícias. Com o desenvolvimento do caule e alongamento dos entrenós, os tecidos vasculares tendem a se

organizar formando um atactostelo, com córtex e cilindro vascular bem delimitados, como observado no estolho e eixo da inflorescência dos indivíduos adultos, podendo ocorrer ainda crescimento em espessura pela formação de súber estratificado e novos feixes vasculares, nas porções mais velhas (Silva et al. 2018).

As três folhas que se formam até o estágio de planta jovem são caracterizadas pela epiderme uniestratificada, mesofilo heterogêneo e três feixes vasculares. A epiderme com células maiores e com a parede periclinal espessada na face adaxial pode estar relacionada com a proteção contra a incidência luminosa e perda de água, função desempenhada pelas escamas nas folhas adultas. Durante o desenvolvimento pós-seminal de outras Bromelioideae, tricomas capitados também foram relatados na margem e/ou na lâmina das primeiras folhas em *Ananas comosus* (L.) Merril (Krauss 1949), *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. e *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B.Sm. (Mantovani e Iglesias 2005). Nas folhas de plântulas e plantas jovens de *N. bahiana*, estes tricomas predominam nas margens, circundados por células epidérmicas e subepidérmicas (hipoderme) lignificadas, e ocupam a posição das emergências espinescentes, constituídas por células epidérmicas e da hipoderme mecânica observadas nas folhas dos indivíduos adultos (Silva et al. 2018). Nas folhas dos indivíduos adultos observa-se também que as células epidérmicas apresentam paredes sinuosas em vista frontal e com espessamento em U em secção transversal, armazenam corpos de sílica e são recobertas por cutícula relativamente espessada. Nas folhas de estágios juvenis os estômatos esparsos na face abaxial e eventualmente na face adaxial na região da margem diferem nos indivíduos adultos, os quais apresentam estômatos em faixas apenas na face abaxial e, geralmente, recobertos por escamas especializadas (Silva et al. 2018). A presença de estômatos na face adaxial na margem de folhas jovens pode ser explicada pela menor espessura da hipoderme aquífera nessa região, permitindo contato do parênquima clorofiliano com a face adaxial. Todas estas características mostram a heteroblastia na espécie e são xeromorfismos associados ao estabelecimento dos indivíduos em ambientes limitantes por escassez de água e nutrientes e alta luminosidade.

Nas plantas jovens as folhas possuem hipoderme aquífera menos desenvolvida, presente apenas na face adaxial, e parênquima clorofiliano com células arredondadas, diferindo da hipoderme mecânica e aquífera, nas duas faces da lâmina, e do parênquima clorofiliano heterogêneo dos indivíduos adultos, apresentando células paliádicas voltadas à face adaxial, células arredondadas voltadas à face abaxial e células braciiformes que delimitam canais de ar entre os feixes vasculares (Silva et al. 2018). Estas alterações na estrutura do mesofilo quanto à organização da hipoderme e do parênquima clorofiliano indicam a

ocorrência de mecanismos fotossintéticos distintos durante as diferentes etapas do desenvolvimento.

Feixes vasculares colaterais também ocorrem nos indivíduos adultos (Silva et al. 2018). Porém, enquanto as folhas jovens recebem apenas três traços vasculares, nas folhas dos indivíduos adultos o número de traços vasculares que entram nas folhas é maior (Silva et al. 2018) e está relacionado ao maior diâmetro do caule e maior quantidade de feixes vasculares formando seu estelo. Todas estas variações estruturais observadas nos órgãos vegetativos ao longo do desenvolvimento ilustram o dimorfismo entre estágios juvenis e adultos, e as estratégias morfológicas relacionadas ao estabelecimento dos indivíduos no ambiente.

Imunodeteção de componentes da parede celular e suas implicações para a diferenciação dos tecidos e órgãos

Após a germinação, as pectinas HGs detectadas por JIM7 foram os primeiros epítomos a serem identificados no corpo das plântulas em desenvolvimento, atuando no alongamento celular e na diferenciação inicial do hipocótilo durante a curvatura do eixo embrionário até o estágio de plântula com a diferenciação da folha cotiledonar, promovendo estabilidade aos tecidos em diferenciação. As HGs são os componentes pécticos mais frequentes na parede celular primária (Ridley et al. 2001, Mohnen 2008, Caffall e Mohnen 2009, Wolf et al. 2009, Albersheim et al. 2011), justificando a detecção dos mesmos em estágios distintos de desenvolvimento das plântulas, corroborando sua função como regulador do crescimento vegetal (Wolf e Greiner 2012).

Já os epítomos de $(1 \rightarrow 4)$ β -D-galactanos marcados com LM5 se mostram relacionados com a diferenciação do córtex do hipocótilo e do mesofilo da bainha cotiledonar em estágios posteriores à germinação, quando se observa a bainha cotiledonar distinta protegendo a primeira folha em expansão. Ainda, estes componentes podem estar envolvidos com os processos de divisão e expansão celular, atuando na citocinese (Sala et al. 2013), indicando que a diferenciação ou maturação do córtex do hipocótilo e da bainha do cotilédone ocorrem de forma simultânea. A diferenciação dos tecidos de preenchimento destes órgãos, neste estágio de desenvolvimento, em conjunto com as análises anatômicas que indicaram a presença de amido evidenciam sua função de reserva, importante para o desenvolvimento e expansão das primeiras folhas e raízes adventícias. Ressalta-se ainda que essas pectinas presentes nas células do parênquima clorofiliano de folhas completamente expandidas são importantes na delimitação desse tecido, em comparação com a hipoderme aquífera. Isso

porque, a presença de (1→4) β -D-galactanos em tecidos de preenchimento em órgãos aéreos (hipocótilo, bainha cotiledonar e eófilos) indica função fotossintética nessas estruturas. Assim, a presença de órgãos de reserva de carboidratos, de água (como a presença de hipoderme aquífera nas folhas), e que realizam fotossíntese, em conjunto com o estabelecimento de um sistema radicular bem desenvolvido, constituído pela raiz primária e adventícias, são adaptações das plântulas de Bromelioideae que permitem seu estabelecimento no ambiente em estágios iniciais de desenvolvimento.

Nas plântulas mais desenvolvidas e plantas jovens os epítomos de HGs marcados com JIM7 se mostram relacionados com a diferenciação inicial dos tecidos vasculares das raízes, principalmente nas células do floema, demarcando a zona de alongamento e início da zona pilífera. No córtex parenquimático das raízes adventícias estas HGs nas junções celulares contribuem com a estabilidade do tecido (Bouton et al. 2002, Willats et al. 2001), especialmente nos locais onde predominam mais espaços intercelulares e lacunas de ar. Estas lacunas estão associadas com a aeração dos tecidos internos e com o transporte de solutos por capilaridade (Tomlinson 1969; Segecin e Scatena 2004), o que pode ser facilitado pelas propriedades hidrofílicas das pectinas (Albersheim et al. 2011). Os epítomos de RGs marcados com LM5 também são observados com maior intensidade no floema das raízes, caule e folhas, sendo estímulos importantes para a diferenciação do sistema vascular (Sala et al. 2013), indicando o transporte de solutos nas plântulas e plantas jovens. Neste sentido, é interessante destacar que as paredes primárias do floema, mais espessadas por celulose e com (1→4) β -D-galactanos, possuem função estrutural durante a diferenciação do sistema vascular. A fraca marcação de compostos pécticos no xilema se relaciona com a deposição de lignina durante a formação de parede secundária em suas células condutoras.

Nas folhas a detecção de HGs na epiderme se relaciona com a função de adesão celular, contribuindo à função de revestimento deste tecido (Evert 2006). Esse tipo de pectina também foi detectado nas paredes e nas junções das células da hipoderme aquífera e do parênquima clorofiliano, contribuindo com a adesão das células e estabilidade desses tecidos. A maior detecção de HGs nas junções celulares da epiderme e no mesofilo das folhas, assim como no córtex das raízes adventícias se deve à maior deposição de matriz extracelular nesses locais formando a lamela média. Outras funções atribuídas a essas pectinas são variações na elasticidade e modificações na porosidade da parede celular (Bouton et al. 2002, Willats et al. 2001). Assim, elas devem contribuir com a integridade dos tecidos da folha, especialmente a hipoderme aquífera, cujas células são passíveis de mudanças na pressão de turgor durante os processos de armazenamento e perda de água.

Considerando que o desenvolvimento e a adaptação das espécies envolvem processos de divisão e alongamento celular, diferenciação dos tecidos e órgãos, os quais são extremamente dependentes da dinâmica dos componentes da parede celular durante a ontogênese vegetal (Albersheim et al. 2011), os resultados aqui obtidos com as análises imunocitoquímicas complementam o conhecimento quanto aos processos de histogênese e desenvolvimento pós-seminal ainda pouco conhecidos em Bromeliaceae e nas monocotiledôneas, em geral.

Referências

- Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff A, Staehelin A. 2011. *Plant Cell Walls*. Garland Science, Taylor and Francis Group, New York.
- Ballego-Campos I, Paiva EAS. 2018. Colleters in the vegetative axis of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae): anatomical, ultrastructural and functional aspects. *Australian Journal of Botany*, 66: 379-387.
- Billings FH. 1904. A study of *Tillandsia usneoides*. *Botanical Gazette*, 38: 99-121.
- Benzing DH. 2000. *Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation*. USA, Cambridge University Press.
- BFG – The Brazil Flora Group. 2015. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, 66: 1085-1113.
- Bouton S, Leboeuf E, Mouille G, Leydecker MT, Talbotec J, Granier F, Lahaye M, Hofte H, Truong HN. 2002. QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14: 2577-2590.
- Caffall KH, Mohnen D. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344: 1879-1900.
- Chamberlain CJ. 1932. *Methods in plant histology*. 5^a ed. Chicago, The University of Chicago Press, 416p.
- Clausen MH, Willats WGT, Knox JP. 2003. Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of anti-homogalacturonan monoclonal antibodies LM7, JIM5 and JIM7. *Carbohydrate Research*, 338: 1797-1800.
- Duarte EF, Carneiro IF, Rezende MH. 2009. Morfologia de frutos e sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Dyckia goehringii* Gross & Rauh (Bromeliaceae). *Revista de Biologia Neotropical*, 6: 1-12.

- Duarte EF, Carneiro IF, Silva NF, Guimarães NNR. 2010. Características físicas e germinação de sementes de *Dyckia goehringii* Gross & Rauh (Bromeliaceae) sob diferentes temperaturas. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 40: 422-429.
- Evert RF. 2006. *Esau's plant anatomy. Meristems, cells and tissues of the plant body – their structure function and development*. 3^a Ed. New Jersey, Wiley-Interscience.
- Feder N, O'Brien TP. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany*, 55:123-142.
- Franceschi VR, Nakata PA. 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 41-71.
- Gerrits PO, Smid L. 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy*, 132: 81-85.
- Herth W, Sghnepf E. 1980. The fluorochrome, Calcofluor White, binds oriented to structural polysaccharide fibrils. *Protoplasma*, 105:129–133.
- Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw Hill Book.
- Jones L, Seymour GB, Knox JP. 1997. Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1-4)- β -D-galactan. *Plant Physiology*, 113: 1405-1412.
- Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 27: 137-138.
- Kausch AP, Horner HT. 1983. The development of mucilaginous raphide crystal idioblasts in young leaves of *Typha angustifolia* L. (Typhaceae). *American Journal of Botany*, 70: 691-705.
- Krauss BH. 1949. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. II – the leaf. *Botanical Gazette*, 110: 333-404.
- Labouriau LG, Valadares MEB. 1976. On the germination of seeds *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 48: 263-284.
- Leme EMC. 1998. *Canistropsis. Bromélias da Mata Atlântica*. GMT Editores Ltda, Rio de Janeiro.
- Luther H. 2014. *An alphabetical list of bromeliad binomials*. 14th ed. The Bromeliad Society International. The Marie Selby Botanical Gardens, Sarasota & Bromeliad Society International.
- Magalhães RI, Mariath JEA. 2012. Seed morphoanatomy and its systematic relevance to Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 298: 1881-1895.

- Mantovani A, Iglesias RR. 2005. Quando aparece a primeira escama? Estudo comparativo sobre o surgimento de escamas de absorção em três espécies de bromélias terrestres de restinga. *Rodrigésia*, 56: 73-84.
- Marques AR, Atman APF, Silveira FAO, Lemos-Filho JP. 2014. Are seed germination and ecological breadth associated? Testing the regeneration niche hypothesis with bromeliads in a heterogeneous neotropical montane vegetation. *Plant Ecology*, 517-529.
- Martinelli G, Vieira CM, Gonzales M, Leitman P, Piratininga A, Costa AF, Forzza RC. 2008. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia*, 59: 209-258.
- Mendes SP, Costa CG, Toni KLG. 2010. Embryo development of *Dyckia pseudococcinea* (Pitcairnioideae-Bromeliaceae), an endangered Brazilian species. *Australian Journal of Botany*, 58: 485-492.
- Mohnen D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 266-277.
- Müller F. 1895. Die Keimung einiger Bromeliaceen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 13:175–182.
- Nardi KO. 2018. Embriogênese e desenvolvimento pós-seminal de Xyridaceae e Mayacaceae e anatomia floral de *Xyris*, com ênfase na evolução de caracteres. Tese. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Botânica. São Paulo Brasil.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59: 368-373.
- Oliveira FMC. 2017. Contribuições aos estudos anatômicos de Bromeliaceae (Poales) sob uma perspectiva filogenética. Tese. Universidade de São Paulo (USP), Departamento de Botânica. São Paulo, Brasil.
- Oliveira DC, Magalhães TA, Ferreira BG, Teixeira CT, Formiga AT, Fernandes GW, Isaias RMS. 2014. Variation in the degree of pectin methylesterification during the development of *Baccharis dracunculifolia* kidney-shaped gall. *Plos One*, 9: e94588.
- Palací CA, Brown GK, Tuthill DE. 2004. The seeds of *Catopsis* (Bromeliaceae: Tillandsioideae). *Systematic Botany*, 29: 518-527.
- Pereira TS. 1988. Bromelioideae (Bromeliaceae): Morfologia do desenvolvimento pós-seminal de algumas espécies. *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro*, 29: 115-154.

- Pereira AR, Pereira TS, Rodrigues AS, Andrade ACS. 2008. Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. *Acta Botanica Brasilica*, 22: 1150-1162.
- Pereira AR, Andrade ACS, Pereira TS, Forzza RC, Rodrigues AS. 2009. Comportamento germinativo de espécies epífitas e rupícolas de Bromeliaceae do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 32: 827-838.
- Pereira AR, Andrade ASC, Pereira TS, Forzza RC, Rodrigues AS. 2010. Morphological aspects of seed, germination and storage of *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae). *Seed Science and Technology*, 38: 79-87.
- Peterson RL, Farquhar ML. 1996. Root hairs: specialized tubular cells extending root surfaces. *The Botanical Review*, 62: 1-40.
- Pinheiro F, Borghetti F. 2003. Light and temperature requirements for germination of seeds of *Aechmea nudicaulis* (L.) Griesbach and *Streptocalyx floribundus* (Martius ex Shultes f.) Mez (Bromeliaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 17: 27-35.
- Pita PB, Menezes NL. 2002. Anatomia da raiz de espécies de *Dyckia* Schult. f. e *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil), com especial referência ao velame. *Brazilian Journal of Botany*, 25: 25-34.
- Pompelli MF. 2006. Germinação de *Dyckia encholirioides* var *encholirioides* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). *Floresta e Ambiente*, 13: 01-09.
- Prado JPC, Schimidt EC, Steinmacher DA, Guerra MP, Bouzon ZL, Vesco LLD, Pescador R. 2014. Seed morphology of *Vriesea friburguensis* var. *paludosa* L. B. Sm. (Bromeliaceae). *Hoehnea*, 41: 553-562.
- Proença SL, Sajo MG. 2008. Rhizome and root anatomy of 14 species of Bromeliaceae. *Rodriguésia*, 59: 113-128.
- Prychid CJ, Rudall PJ. 1999. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematic. *Annals of Botany*, 84: 725-739.
- Prychid CJ, Jabaily RS, Rudall PJ. 2008. Cellular ultrastructure and crystal development in *Amorphophallus* (Araceae). *Annals of Botany*, 101: 983-995.
- Ridley BL, O'Neill MAO, Mohnen D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57: 929-967.
- Sala K, Potocka I, Kurczynska E. 2013. Spatio-temporal distribution and methyl-esterification of pectic epitopes provide evidence of developmental regulation of pectins during somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum*, 57: 410-416.

- Scatena VL, Segecin S, Coan AI. 2006. Seed morphology and post-seminal development of *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) from the “Campos Gerais”, Paraná, Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49: 945-951.
- Segecin S, Scatena VL. 2004. Morfoanatomia de rizomas e raízes de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, PR, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 18: 253-260.
- Silva IV, Scatena VL. 2011a. Morfologia de sementes e de estádios iniciais de plântulas de espécies de Bromeliaceae da Amazônia. *Rodriguésia*, 62: 263-272.
- Silva IV, Scatena VL. 2011b. Anatomia de raízes de nove espécies de Bromeliaceae (Poales) da região amazônica do estado de Mato Grosso, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 25: 618-627.
- Silva KR, Versieux LM, Oriani A. 2018. Anatomy of vegetative organs, inflorescence axis and pedicel in the *Neoregelia bahiana* complex (Bromeliaceae): taxonomic and ecological importance. *Nordic Journal of Botany*, 2018: e01800.
- Smallwood M, Martin H, Knox JP. 1995. An epitope of rice threonine- and hydroxyproline-rich glycoprotein is common to cell wall and hydrophobic plasma-membrane glycoproteins. *Planta*, 196: 510-522.
- Smallwood M, Yates EA, Willats WGT, Martin H, Knox JP. 1996. Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. *Planta*, 198: 452-459.
- Smith, LB. 1934. Geographical evidence on the lines of evolution in the Bromeliaceae. *Botanische Jahrbücher für Systematik , Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 66: 446-468.
- Smith LB, Downs RJ. 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*, 14: 1-658.
- Smith LB, Downs RJ. 1977. Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*, 14: 663-1492.
- Smith LB, Downs RJ. 1979. Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*, 14: 1493-2142.
- Smith LB, Till W. 1998. Bromeliaceae. In: Kubitzki (Ed) *The families and genera of vascular plants IV*. New York, Springer.
- Sterling C. 1970. Crystal-structure of ruthenium red and stereochemistry of its pectic stain. *American Journal of Botany*, 57: 172-175.
- Szidat L. 1922. Die Samen der Bromeliaceen in ihrer Anpassung an den Epiphytismus. *Botanisches Archiv*, 1: 29-46.

- Tillich HJ. 2000. Ancestral and derived character states in seedling of monocotyledons. In: Wilson KL, Morrison DA (Eds). *Monocots: systematics and evolution*. Melbourne: CSIRO, pp. 221-229.
- Tillich HJ. 2007. Seedling diversity and the homologies of seedling organs in the order Poales (Monocotyledons). *Annals of Botany*, 100: 1413-1429.
- Tomlinson PB. 1969. III Commelinales-Zingiberales. In: Metcalfe CR (Ed). *Anatomy of the monocotyledons*. Clarendon Press, pp. 193-294.
- Varadarajan GS, Gilmartin AJ. 1988. Seed morphology of the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae) and its systematic implications. *American Journal of Botany*, 75: 808-818.
- Verherbruggen Y, Marcus SE, Haeger A, Ordaz-Ortiz JJ, Knox JP. 2009. An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydrate Research*, 344: 1858-1862.
- Versieux LM, Wendt T, Louzada RB, Wanderley MGL. 2008. Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade*, 4: 99-110.
- Vieira DCM, Socolowski F, Takaki M. 2007. Germinação de sementes de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae) sob diferentes temperaturas em luz e escuro. *Revista Brasileira de Botânica*, 30: 183-188.
- Vizentin ETBS, Souza MDA, Silva IV. 2016. Morfologia do fruto, semente e desenvolvimento pós-seminal de *Aechmea angustifolia* Poepp. & Endl. (Bromeliaceae). *Magistra*, 28: 110-118.
- Webb MA, Cavaletto JM, Carpita NC, Lopez LE, Arnott HJ. 1995. The intravacuolar organic matrix associated with calcium oxalate crystals in leaves of *Vitis*. *The Plant Journal*, 7: 633-648.
- Willats WGT, Marcus SE, Knox JP. 1998. Generation of a monoclonal antibody specific to (1 → 5)- α -L-arabinan. *Carbohydrate Research*, 308: 149-152.
- Willats WGT, Orfila C, Limberg G, Buchholt HC, van Alebeek G-JWM, Voragen AGJ, Marcus SE, Christensen TMIE, Mikkelsen JD, Murray BS, Knox JP. 2001. Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectichomogalacturonan in plant cell walls. Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 19404-19413.
- Winkler M, Hülber K, Hietz P. 2005. Effect of canopy position on germination and seedling survival of epiphytic bromeliads in a Mexican humid montane forest. *Annals of Botany*, 95: 1039-1047.
- Wolf S, Greiner S. 2012. Growth control by cell wall pectins. *Protoplasma*, 249: S169-S175.

- Wolf S, Mouille G, Pelloux J. 2009. Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Molecular Plant*, 2: 851-860.
- Yates EA, Valdor JF, Haslam SM, Morris HR, Dell A, Mackie W, Knox JP. 1996. Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology*, 6: 131-139.

Ilustrações

Figura 1. Morfologia (A) e anatomia das sementes de *Neoregelia bahiana* em secções longitudinais (B, D, F-I) e transversais (C, E). A. Sementes maduras com envoltório mucilaginoso. B-C. Aspecto geral. D. Detalhe na região micropilar mostrando embrião diferenciado. E. Detalhe mostrando organização do envoltório seminal e nucelo externamente ao endosperma. F-I. Detalhes mostrando organização das células da exotesta, exotégmen, endotégmen e nucelo, respectivamente. (C, coifa; CA, camada de aleurona; Co, cotilédone; Eb, embrião; EM, envoltório mucilaginoso; En, endosperma; EnTeg, endotégmen; EnTes, endotesta; ES, envoltório seminal; ExTeg, exotégmen; ExTes, exotesta; Fu, funículo; HR, eixo hipocótilo-radícula; Seta preta, cutícula do tegumento interno; Seta branca, cutícula da camada de aleurona; Cabeça de seta, suspensor). Barras: 1,5 mm (A); 200 µm (B); 500 µm (C); 100 µm (D, F, H); 50 µm (E, G, I).

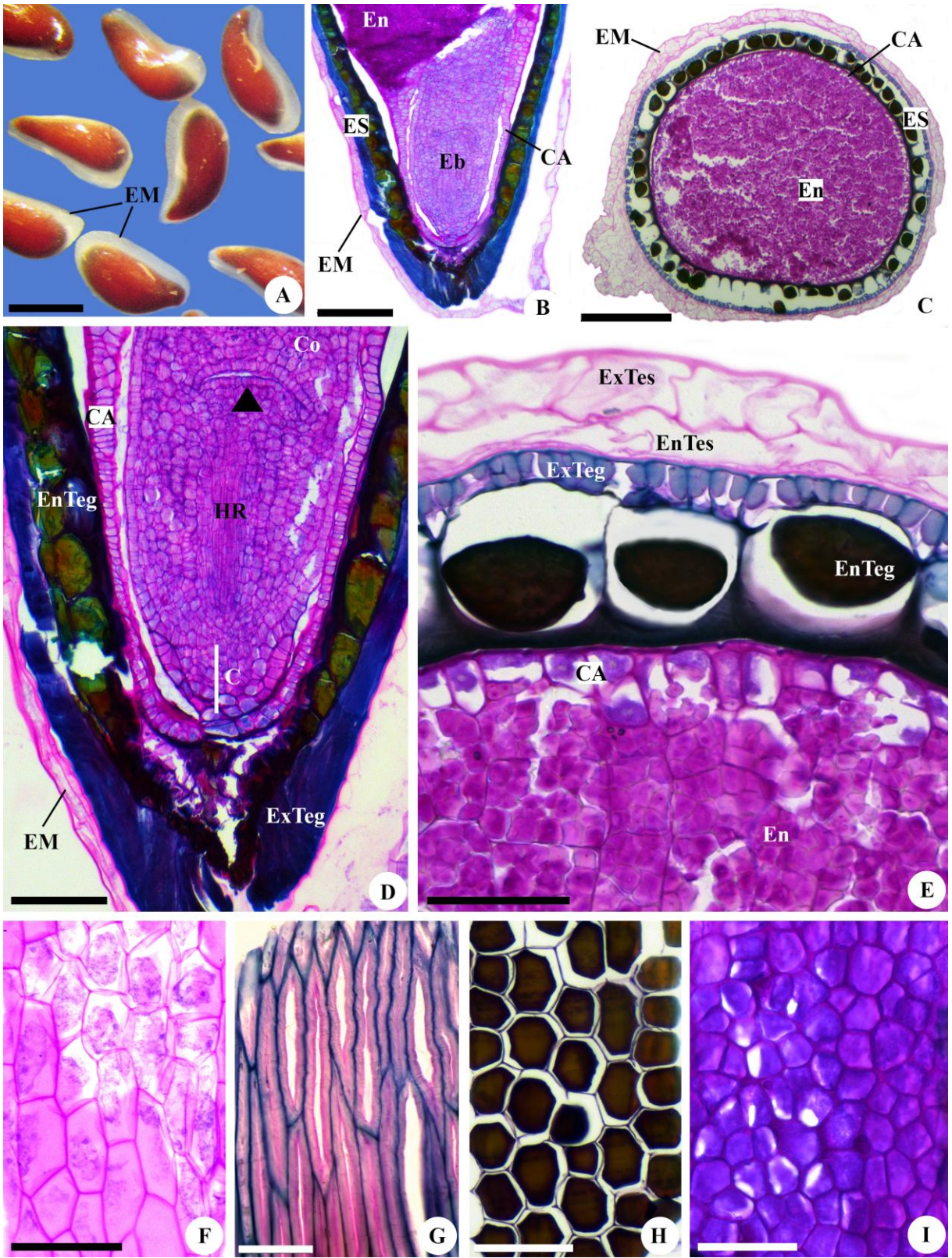


Figura 2. Germinação e morfologia de plântulas e plantas jovens durante o desenvolvimento pós-seminal em *Neoregelia bahiana* (A-E, G-H. Serra do Cipó, Minas Gerais. F. Mucugê, Bahia). **A.** Início da germinação. **B.** Alongamento do eixo embrionário. **C.** Raiz primária e hipocótilo em diferenciação. **D.** Desenvolvimento da bainha cotiledonar. **E.** Bainha cotiledonar desenvolvida com expansão da primeira folha. **F-G.** Aspecto geral da plântula com a primeira folha totalmente expandida. **H.** Detalhe da planta jovem. (BC, bainha cotiledonar; CR, colar de rizóides; F1, primeira folha; F2, segunda folha; F3, terceira folha; H, hipocótilo; RA, raiz adventícia; RP, raiz primária). Barras: 1,5 mm (A-E); 3 mm (F-H).

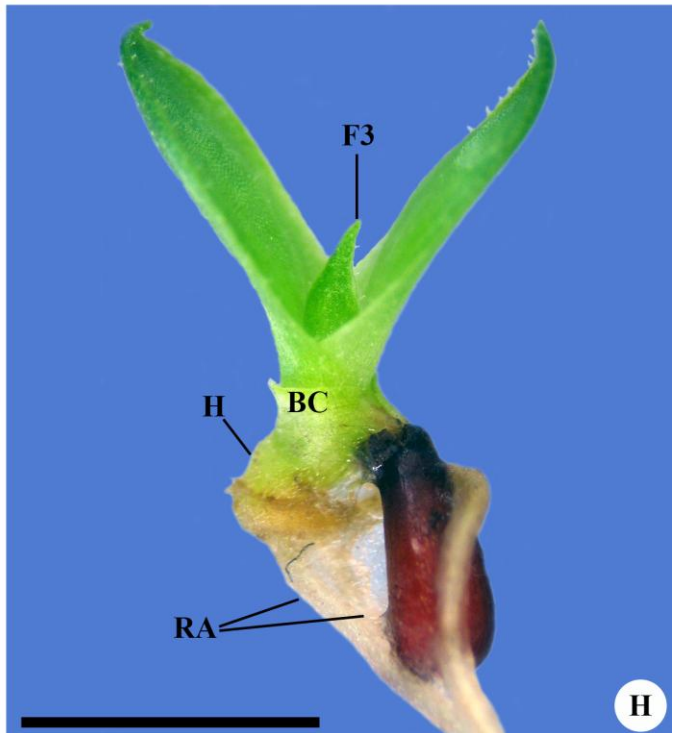
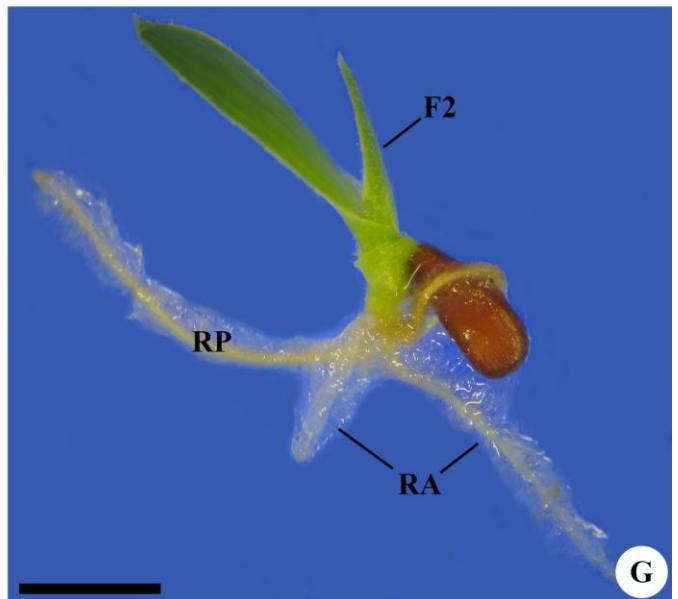
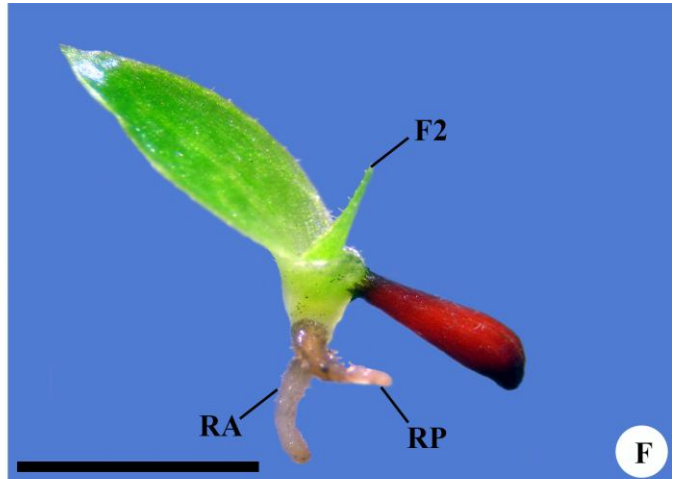
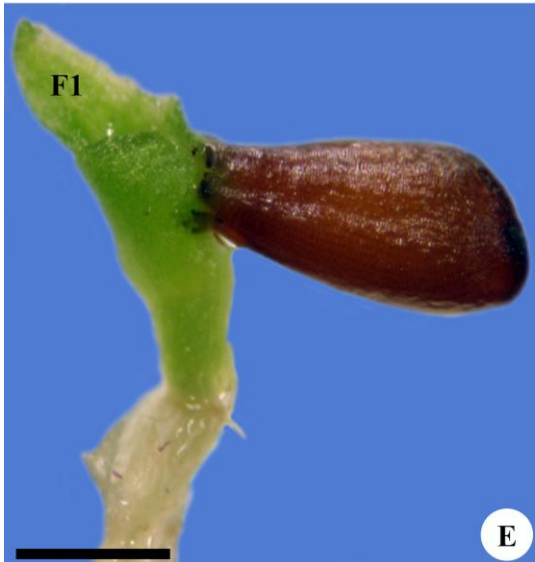
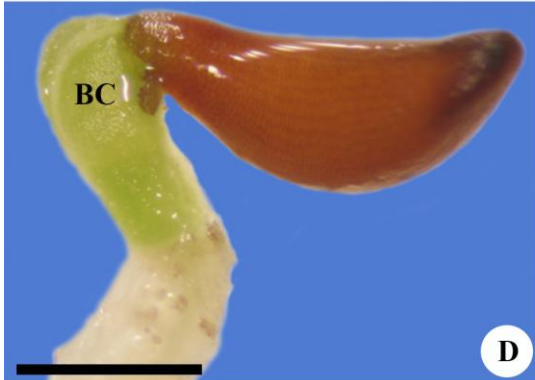
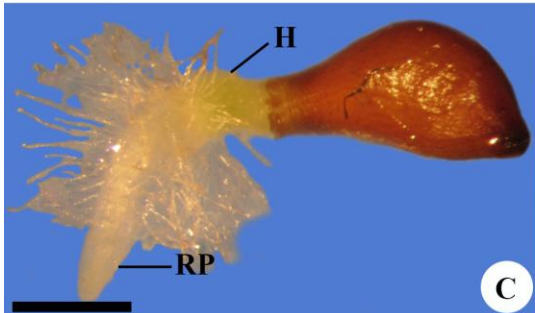
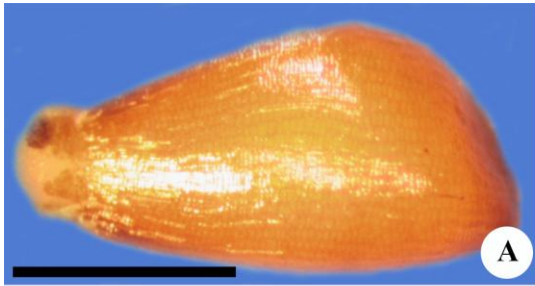


Figura 3. Morfologia do desenvolvimento pós-seminal de *Neoregelia bahiana* sob MEV. **A.** Detalhe mostrando rompimento do envoltório seminal e início da germinação. **B.** Detalhe mostrando alongamento do eixo embrionário e início do desenvolvimento da raiz primária. **C.** Plântula com primeira folha expandida apresentando hipocótilo e bainha cotiledonar desenvolvidos e segunda folha em expansão. **D.** Detalhe mostrando tricomas capitados no hipocótilo. **E.** Detalhe mostrando tricomas capitados na margem foliar. **F-G.** Detalhes na face abaxial da lâmina e da bainha cotiledonar, respectivamente, mostrando distribuição dos estômatos. (BC, bainha cotiledonar; C, coifa; ExTeg, exotégmen; F1, primeira folha; F2, segunda folha; H, hipocótilo; PR, pêlo radicular; RA, raiz adventícia; Se, semente; Setas, tricomas; Cabeças de setas, estômatos). Barras: 200 μm (A); 300 μm (B); 1,0 mm (C); 100 μm (D); 50 μm (E-G).

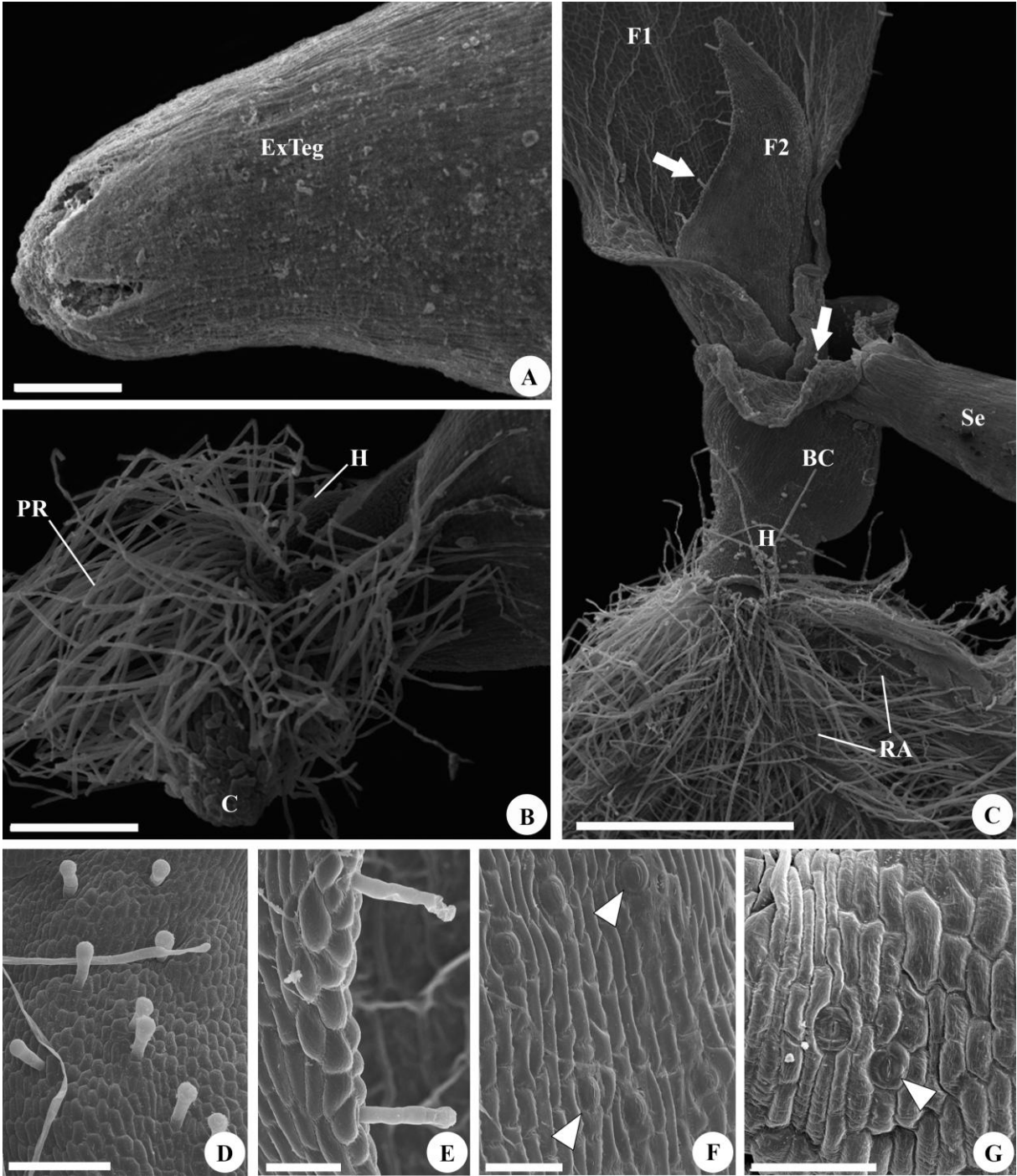


Figura 4. Anatomia de plântulas e plantas jovens durante o desenvolvimento pós-seminal de *Neoregelia bahiana* em secções longitudinais (**A-F, H**) e transversal (**G**). **A.** Detalhe mostrando rompimento do envoltório seminal e emergência do eixo embrionário. **B.** Detalhe mostrando alongamento do eixo embrionário e início do desenvolvimento da raiz primária. **C.** Detalhe mostrando folha cotiledonar em expansão e hipocótilo diferenciado. **D.** Plântula com folha cotiledonar totalmente diferenciada e primeira folha em expansão. **E.** Plântula com folhas inseridas no epicótilo curto. **F.** Detalhe mostrando porção da folha cotiledonar aderida à semente em estágio de planta jovem. **G.** Detalhe da bainha cotiledonar mostrando epiderme, mesofilo e seu único feixe vascular central. **H.** Detalhe mostrando os tricomas no ápice caulinar. (BC, bainha cotiledonar; CA, camada de aleurona; Co, cotilédone; CR, colar de rizóides; EE, eixo embrionário; En, endosperma; Ep, epicótilo; ES, envoltório seminal; F, floema; Fa, fanerômero; F1, primeira folha; F2, segunda folha; FV, feixe vascular; H, hipocótilo; Ha, haustório; MR, meristema apical radicular; Pa, parênquima; RA, raiz adventícia; RP, raiz primária; T, tricoma; X, xilema; Setas, meristema apical caulinar). Barras: 200 µm (A-B, F); 500 µm (C-E); 50 µm (G-H).

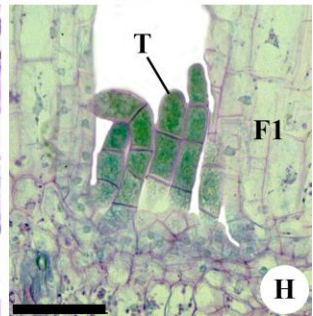
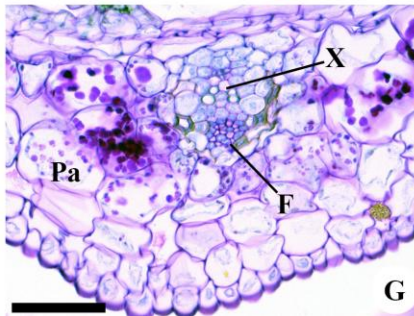
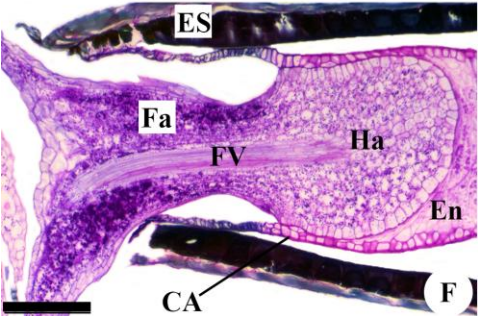
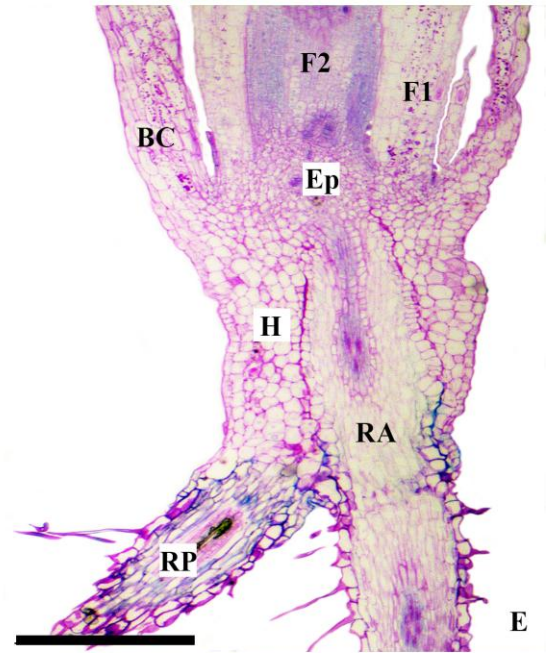
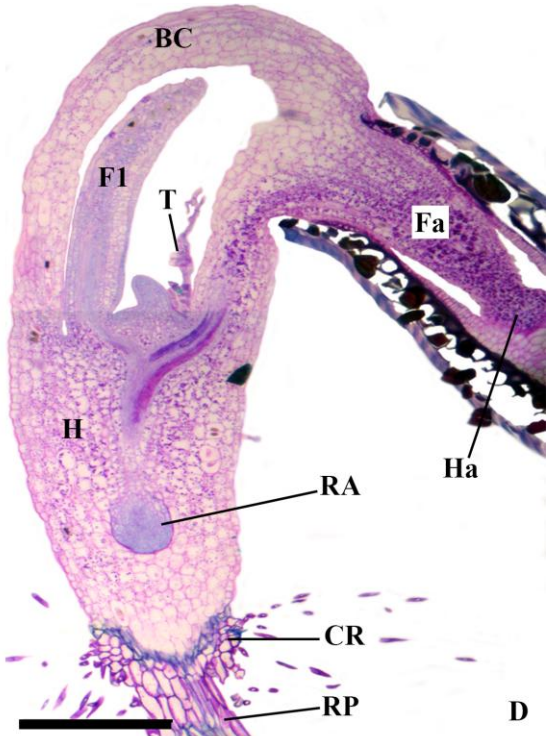
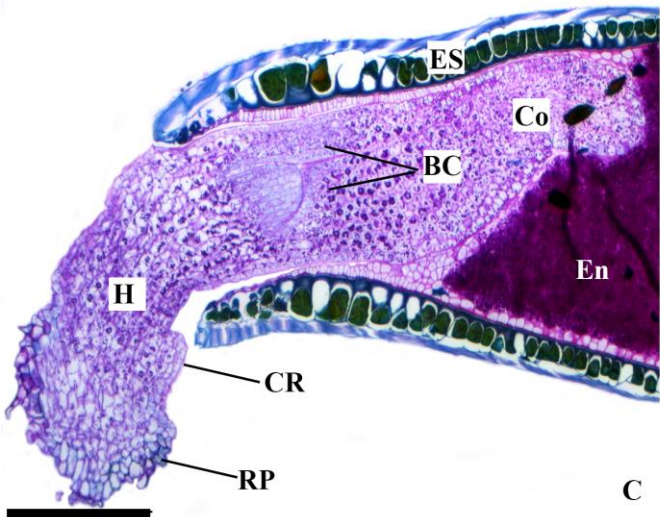
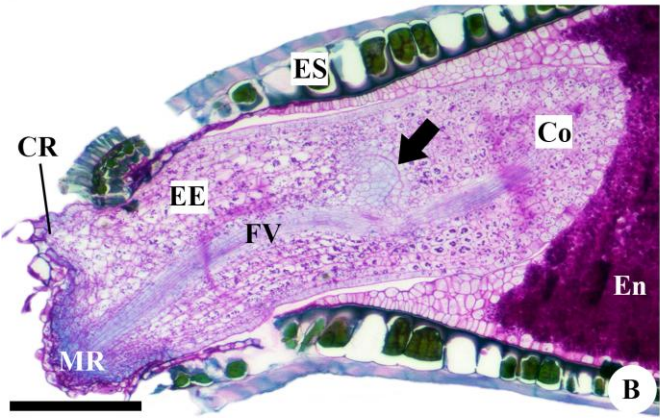
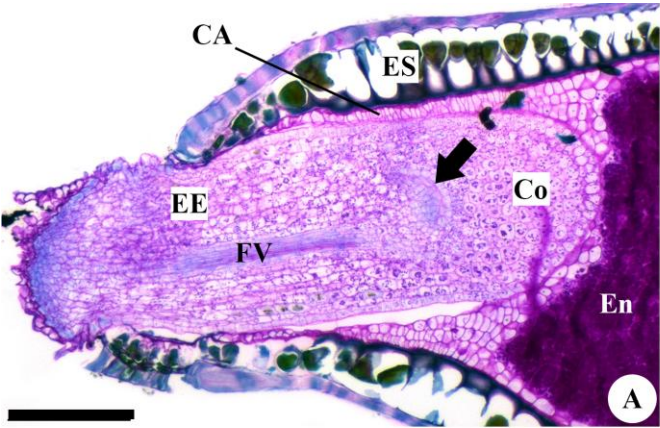


Figura 5. Anatomia do colar (**A, D**) e das raízes primária (**B, E**) e adventícia do epicótilo (**C, F**) em plântulas e plantas jovens de *Neoregelia bahiana* em secções transversais. **A-C.** Aspectos gerais mostrando o sistema de revestimento, córtex e cilindro vascular. **D-F.** Detalhes evidenciando endoderme e cilindro vascular. (C, córtex; CV, cilindro vascular; En, endoderme; Ex, exoderme; F, floema; Mx, elemento de metaxilema; P, periciclo; Px, elementos de protoxilema; V, velame; Cabeças de setas, cordões de xilema). Barras: 100 μm (A-B); 50 μm (C); 25 μm (D-F).

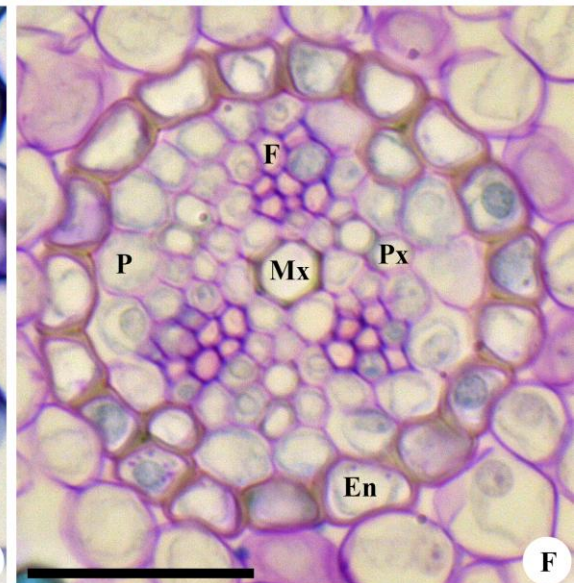
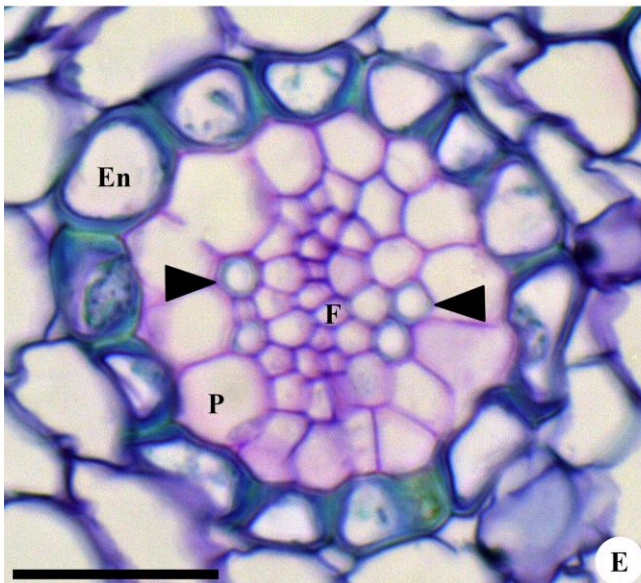
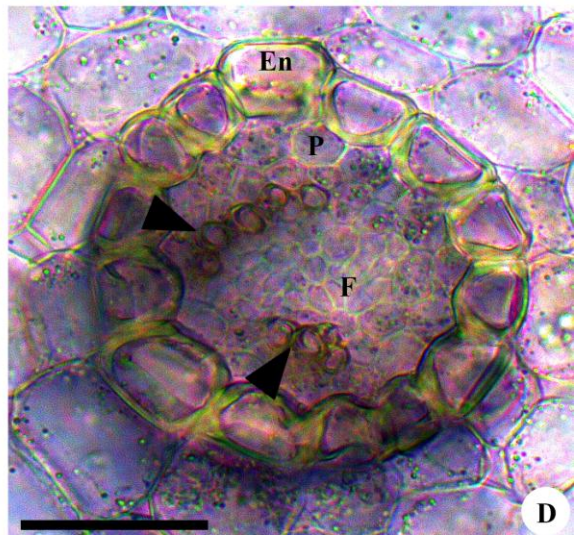
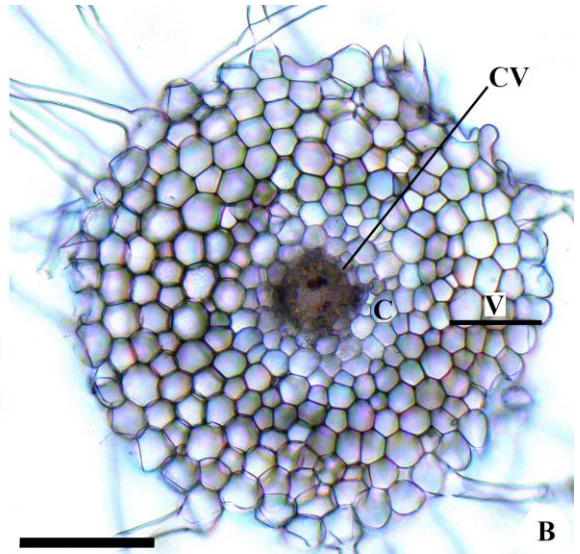
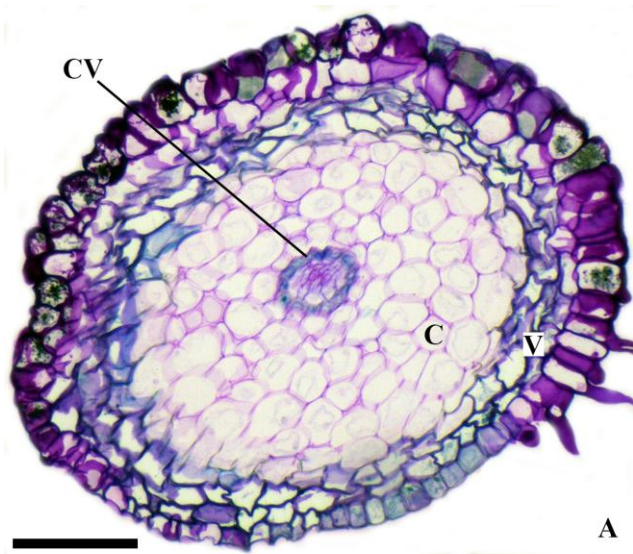


Figura 6. Anatomia do caule em plântulas e plantas jovens de *Neoregelia bahiana* em secções transversais (**A, C-F**) e longitudinais (**B, G**). **A.** Aspecto geral do hipocótilo de planta jovem na região mediana. **B.** Ápice caulinar em plântula com as primeiras folhas em expansão. **C.** Detalhe do cilindro vascular do hipocótilo de planta jovem na região mediana. **D.** Detalhe do cilindro vascular do hipocótilo de planta jovem na região distal. **E.** Detalhe mostrando organização dos elementos vasculares no epicótilo. **F.** Detalhe de tricoma no hipocótilo. **G.** Detalhe mostrando diferenciação dos idioblastos contendo ráfides e polissacarídeos no córtex do hipocótilo em estágios iniciais da plântula. (BC, bainha cotiledonar; C, córtex; CB, célula basal; CG, cabeça glandular; E, epiderme; En, endoderme; Ep, epicótilo; F, floema; F1, primeira folha; F2, segunda folha; M, medula; MC, meristema apical caulicar; P, periciclo; Pe, pedículo; R, ráfides; RA, raiz adventícia; TV, traço vascular; X, xilema; *, idioblasto). Barras: 100 µm (A-B); 50 µm (C-G).

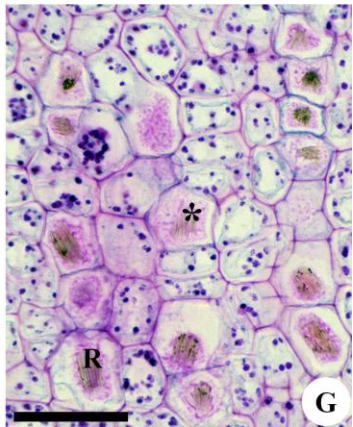
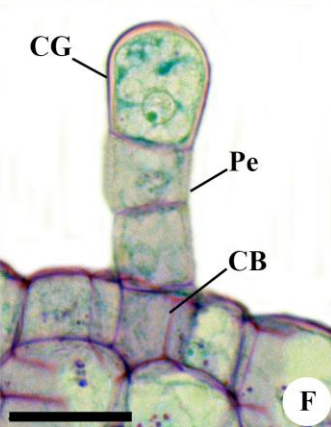
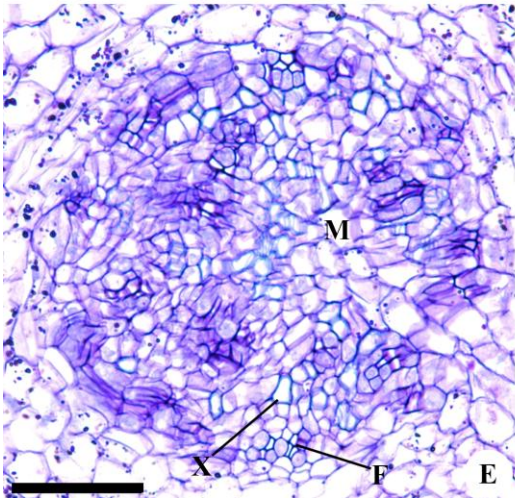
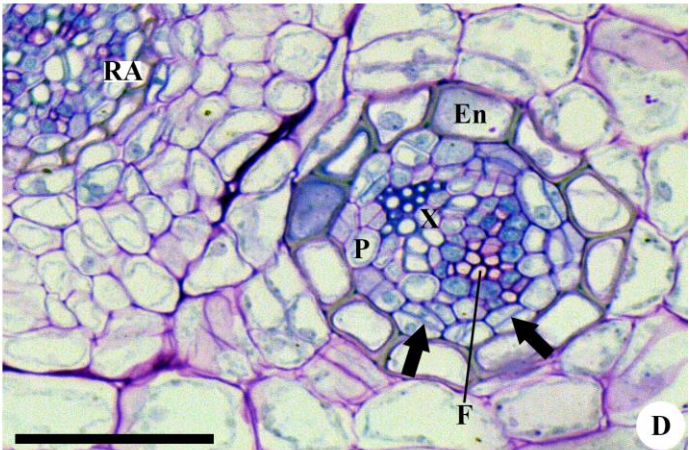
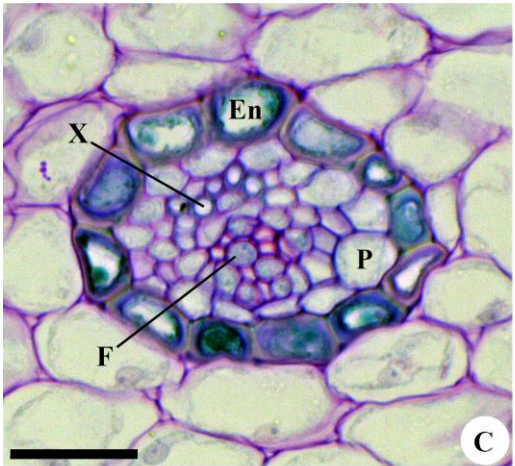
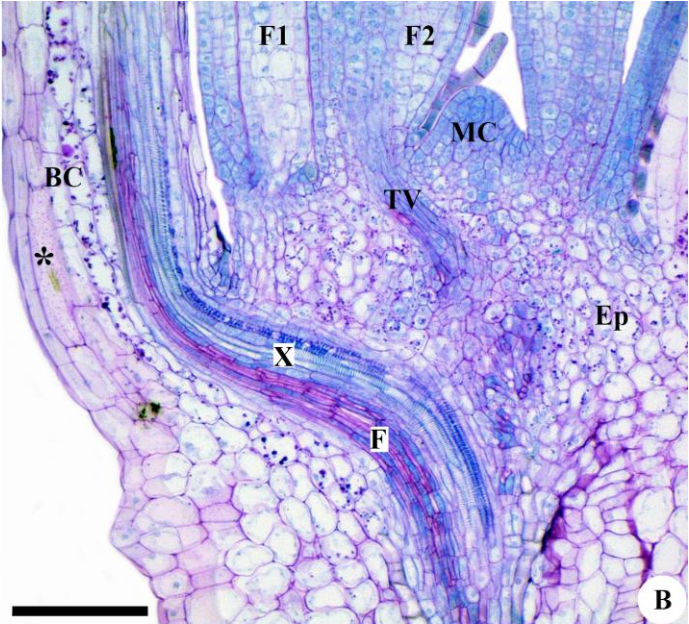
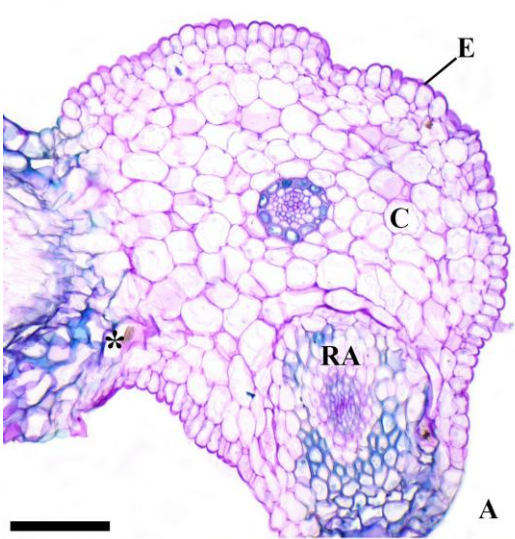


Figura 7. Anatomia foliar em plântulas e plantas jovens de *Neoregelia bahiana* em secções transversais (**A-C**), longitudinal (**D**) e paradérmica (**E**). **A.** Aspecto geral da lâmina foliar. **B.** Detalhe da lâmina foliar mostrando organização da epiderme, mesofilo e sistema vascular. **C.** Detalhe da margem foliar. **D.** Detalhe na região da margem foliar mostrando a inserção de tricoma. **E.** Detalhe da epiderme na face abaxial. (CB, célula basal; CG, cabeça glandular; Est, estômato; Fi, fibras; FV, feixe vascular; HA, hipoderme aquífera; PC, parênquima clorofiliano; Pe, pedículo; X, xilema; Setas, divisão das células do periciclo). Barras: 500 µm (A); 100 µm (B); 200 µm (C); 25 µm (D-E).

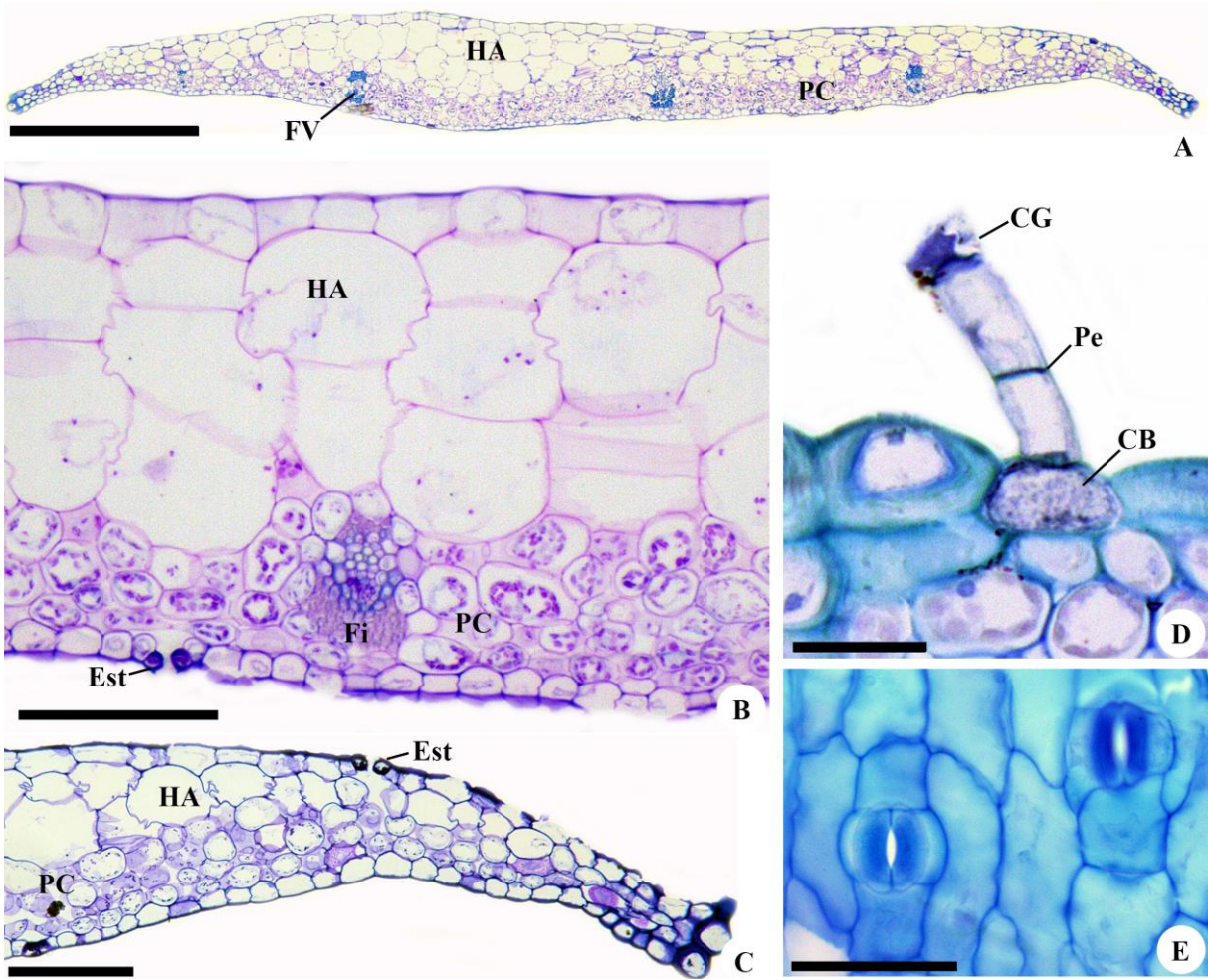


Figura 8. Distribuição de pectinas marcadas com vermelho de rutênio (**A**) e pela imunodeteção de HGs por anticorpos monoclonais JIM5 (**C**) e JIM7 (**B, D**), e RGs por anticorpos monoclonais LM6 (**E**) nas sementes de *Neoregelia bahiana* em secções transversais. **A.** Detalhe mostrando organização do envoltório seminal e endosperma. **B.** Detalhe do envoltório mucilaginoso próximo ao funículo. **C-E.** Detalhes mostrando arranjo das células de aleurona na região mediana da semente aderida à planta jovem. (CA, camada de aleurona; EM, envoltório mucilaginoso; En, endosperma; EnTeg, endotégmen; ExTeg, exotégmen; ExTes, exotesta; Setas, autofluorescência da cutícula da camada de aleurona). Barras: 50 μm (**A**); 25 μm (**B-D**); 75 μm (**E**).

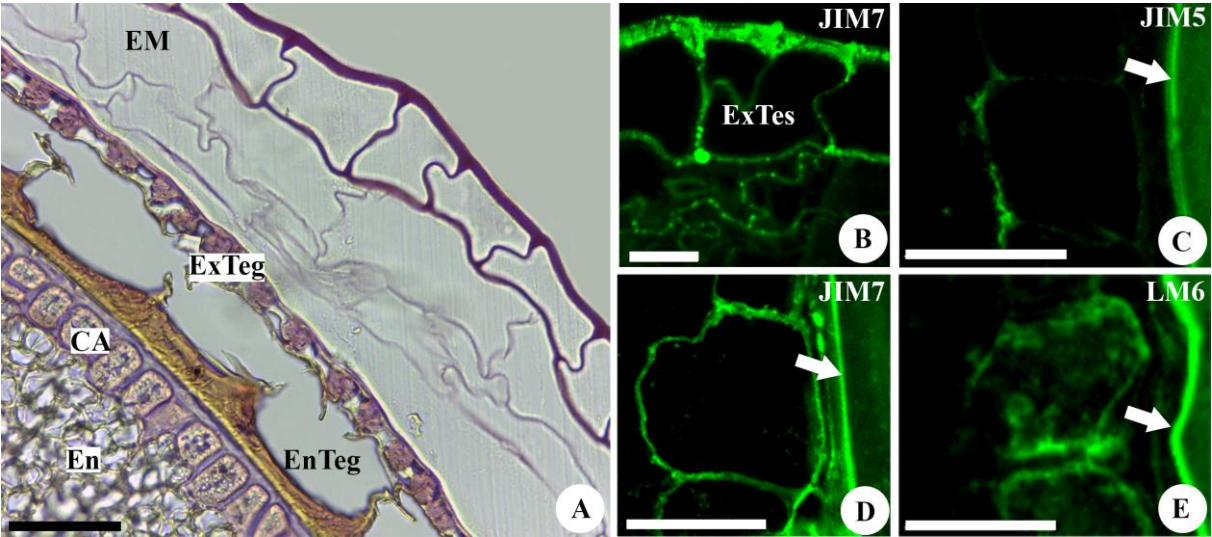


Figura 9. Autofluorescência (**A**) e distribuição de HGs detectadas por anticorpo monoclonal JIM7 (**G, H, J**), extensinas por anticorpo monoclonal LM1 (**D, F**), AGPs por anticorpo monoclonal LM2 (**E**) e RGs por anticorpos monoclonais LM5 (**B, I**) e LM6 (**C**) durante o desenvolvimento pós-seminal de *Neoregelia bahiana* em secções longitudinais. **A.** Detalhe mostrando a germinação. **B-E.** Detalhes mostrando arranjo das células de aleurona na região micropilar da semente. **F.** Detalhe mostrando região micropilar da semente com desenvolvimento da bainha cotiledonar e do primórdio foliar. **G.** Detalhe mostrando alongamento do eixo embrionário. **H.** Detalhe mostrando imunodeteção no cotilédone diferenciado. **I.** Detalhe da plântula mostrando bainha cotiledonar e hipocótilo diferenciados. **J.** Detalhe do meristema apical caulinar durante o alongamento do eixo embrionário. (BC, bainha cotiledonar; CA, camada de aleurona; Co, cotilédone; EE, eixo embrionário; En, endosperma; Ep, epicótilo; ES, envoltório seminal; F1, primeira folha; Fa, fanerômero; FV, feixe vascular; H, hipocótilo; Ha, haustório; MC, meristema apical caulinar; MR, meristema apical radicular; Ra, raiz adventícia; Cabeças de setas, locais de imunodeteção). Barras: 75 μm (A, F, J); 25 μm (B-E); 100 μm (G); 200 μm (H-I).

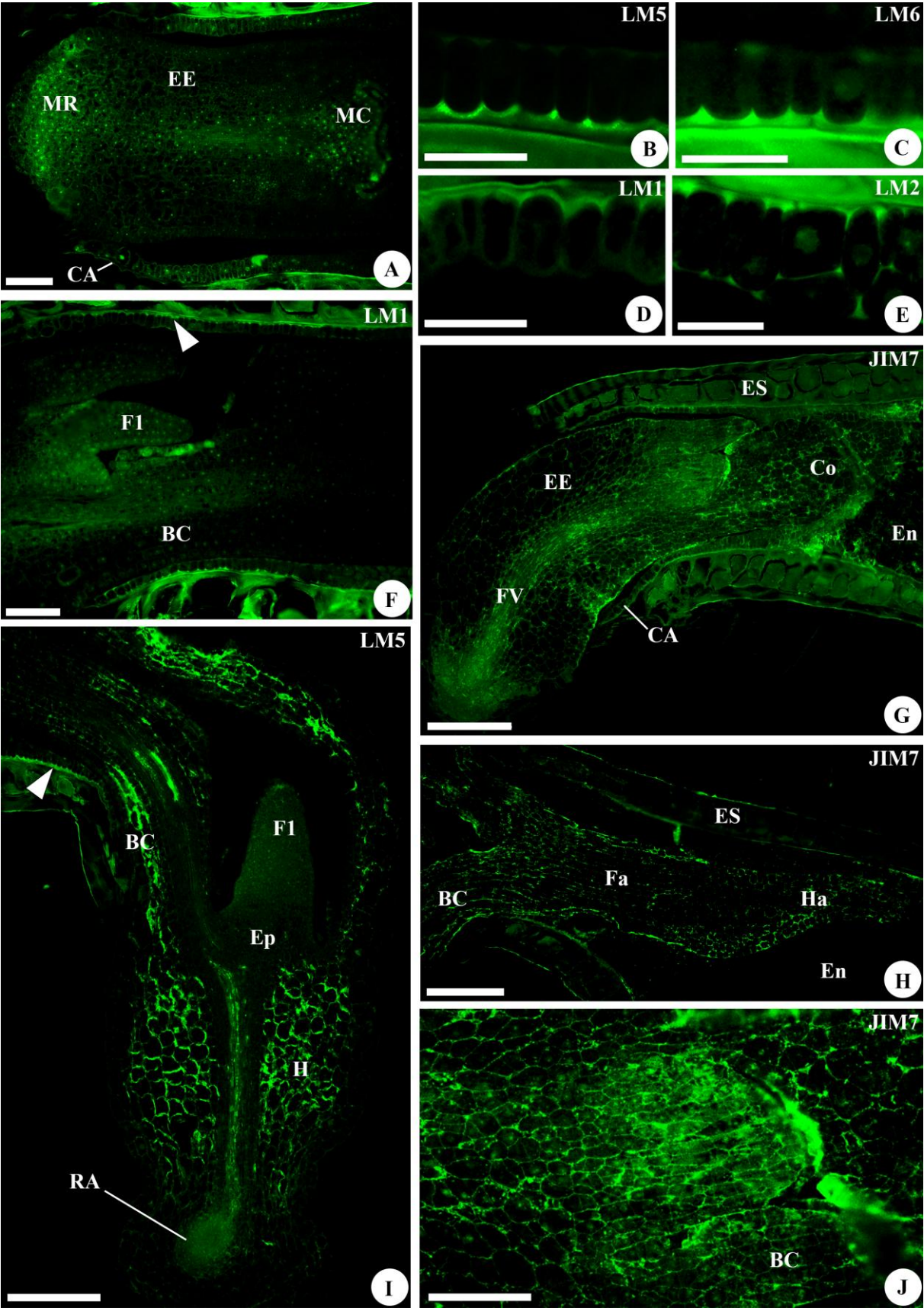


Figura 10. Distribuição de pectinas pela imunodeteção de HGs por anticorpos monoclonais JIM7 (**A-B, E-F**) e RGs por anticorpos monoclonais LM5 (**C, D, G**) nas raízes (**A-C**), epicótilo (**D**) e folhas (**E-G**) de *Neoregelia bahiana* em secções longitudinal (**A**) e transversais (**B-G**). **A.** Aspecto geral na região apical da raiz primária. **B.** Detalhe de raiz adventícia do epicótilo mostrando imunodeteção nas células do floema e no metaxilema, e nas junções celulares do córtex interno. **C.** Detalhe da raiz primária evidenciando autofluorescência da endoderme e imunodeteção nas células do floema. **D.** Detalhe mostrando autofluorescência em células do cilindro vascular e imunodeteção em células do floema. **E.** Detalhe evidenciando imunodeteção nas junções celulares da hipoderme aquífera. **F.** Aspecto geral mostrando imunodeteção nas células da epiderme e do mesofilo. **G.** Detalhe mostrando imunodeteção no parênquima clorofiliano e no sistema vascular. (C, córtex; CV, cilindro vascular; F, floema; HA, hipoderme aquífera; M, medula; MR, meristema apical radicular; Mx, metaxilema; PC, parênquima clorofiliano; X, xilema; Cabeças de setas, locais de imunodeteção). Barras: 75 μm (A, F); 25 μm (B-C, E); 50 μm (D, G).

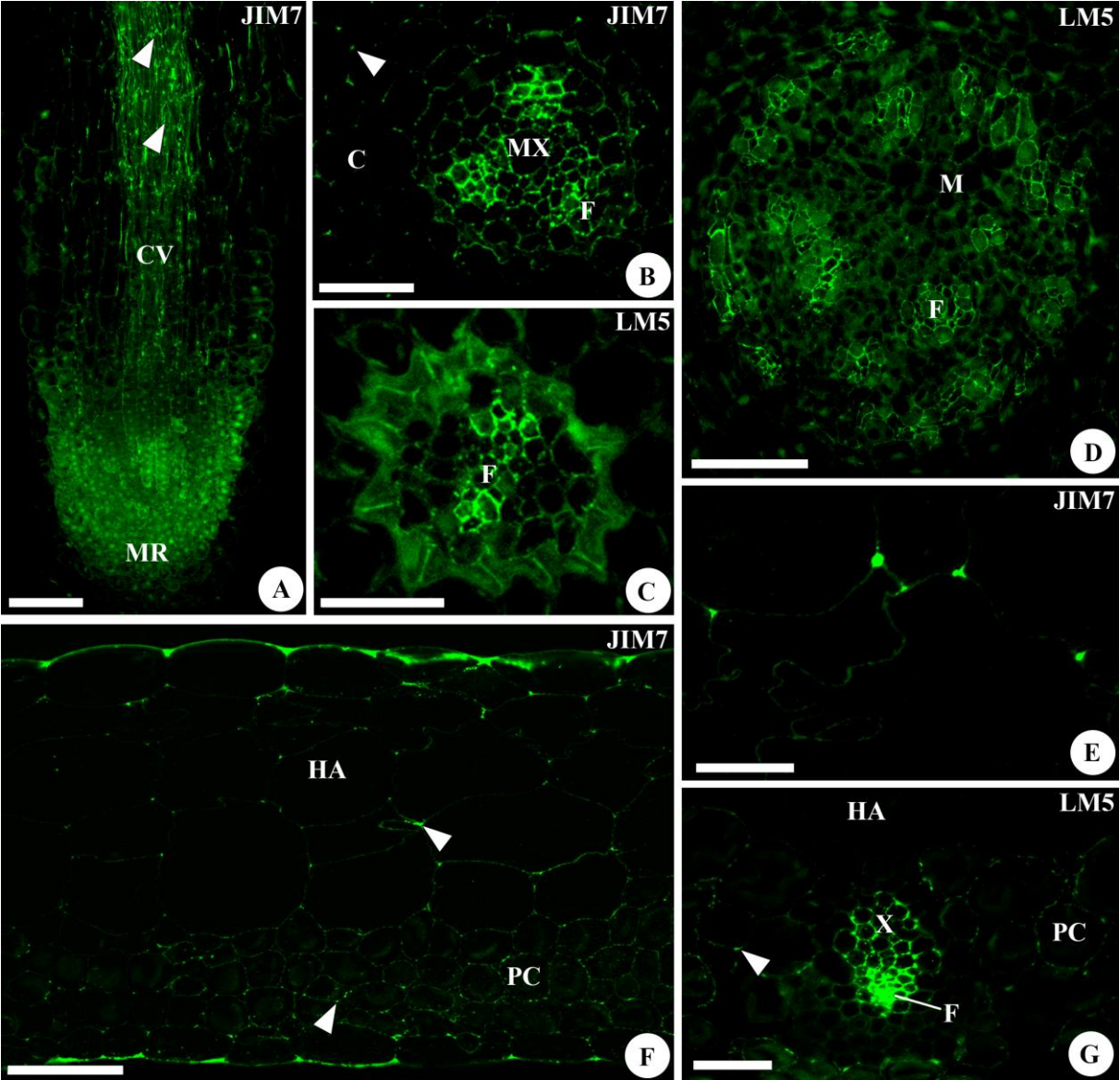


Tabela 1. Anticorpos monoclonais primários e epítomos usados nas sementes e plântulas de *Neoregelia bahiana*.

Anticorpos monoclonais	Epítomos	Referências
Pectinas homogalacturonanas (HGs)		
JIM5	Parcialmente metilesterificada (até 40%)	Willats et al (2001), Clausen et al. (2003)
JIM7	15%-80% metilesterificada	Clausen et al. (2003)
Glicoproteínas		
LM1	Extensinas	Smallwood et al. (1995)
Proteínas arabinogalactanas (AGPs)		
LM2	AGP glicanas	Yates et al. (1996), Smallwood et al. (1996)
Pectinas Ramnogalacturonanas (RGs)		
LM5	(1→4) β-D-galactanos	Jones et al. (1997)
LM6	(1→5) α-L-arabinanos	Willats et al. (1998), Verhertbruggen et al. (2009)

Tabela 2. Porcentagem de germinação, tempo médio de desenvolvimento das estruturas da plântula e comprimento médio da raiz primária em duas populações de *Neoregelia bahiana*.

Populações	G(%)	Tempo médio (dias) ± desvio padrão								Comprimento médio da RP (mm) ± desvio padrão
		G	Início RP	Início RA1	Início RA2	Início RA3	Início BC	Plântula (F1 expandida)	Planta jovem	
1	97	5,54±	1,74±	9,46±	14,43±	17,00±	4,01±	14,24±0,07	24,75±4,29	2,38 ± 1,62
		0,21	0,36	0,55	0,74	0,00	0,39			
2	100	8,77±	1,70±	11,47	18,63±	23,73±	6,40±	22,52±0,94	30,33±0,99	12,51 ± 3,70
		2,10	0,24	±1,03	0,88	2,50	0,54			

1. Mucugê, Bahia; 2. Serra do Cipó, Minas Gerais; F1= primeira folha; G= germinação; G(%)= porcentagem de germinação; RA1-RA3= primeira a terceira raiz adventícia; RP= Raiz primária

Capítulo 4

Seed development and its relation to fruit structure in species of Bromelioideae (Bromeliaceae) with fleshy fruits

⁴ Manuscrito a ser submetido ao periódico *Flora*

Abstract. In Bromeliaceae the fruit type and seed morphology have been used to distinguish the subfamilies. We studied the seed development of three species of Bromelioideae (*Aechmea bromeliifolia* var. *albobracteata*, *Billbergia* sp. and *Neoregelia bahiana*) relating the seed characters to the fruit structure. The species share an inferior ovary with a total fusion of carpellary and non-carpellary tissues and a uniform aspect of the pericarp, which allow the classification of fruits as true berries. These fruits are indehiscent and their juiciness is promoted by the combination of the enlargement of mesocarp cells and by secretion of substances inside the locules by the obturator in later stages of fruit development. In the same way the mucilaginous testa of seeds also appears in later developmental stages. The combination of fruit juiciness and the development of mucilaginous seeds are strategies for animal's dispersal. Regarding the seed development in relation to fruit structure, *A. bromeliifolia* exhibits about ten ovules per locule inserted at the apical portion of the ovary. The seeds are bigger, growing towards the fruit base. In *Billbergia* sp. and *N. bahiana* the ovules are numerous and subapically to centrally inserted in the ovary; the seeds are smaller and have a radial disposition. In addition, in the later species the chalazal appendage of the seeds are short (*Billbergia* sp.) or absent (*N. bahiana*). Since the chalazal appendages grow during the seed development by enlargement of the seed coat cells, the number of ovules/seeds may be related to the disposition of the ovules inside the locules and to the presence/length of the seed chalazal appendage. The fruit and seed development reveal distinct ontogenetic processes in Bromelioideae, which can be compared to that of other subfamilies indicating evolutionary trends.

Keywords: berry, chalazal appendage, fruit anatomy, ovule, seed anatomy

Introduction

Bromeliaceae are largely distributed in the Neotropical regions (Smith 1934; Smith & Downs 1974) and together with Thyphaceae form an early-diverging clade in Poales (Bouchenak-Khelladi et al. 2014; APG IV 2016). Bromeliaceae are divided into eight subfamilies, being Bromelioideae a recent evolutionary lineage (Givnish et al. 2007) characterized by flowers with inferior ovary and baccate fruits containing seeds with a mucilaginous coat (Smith & Downs 1974; Smith & Till 1998; Benzing 2000). In Bromeliaceae the ovary may be inferior, half-inferior, or superior and the fruits are usually dry, capsule type, with winged or plumose seeds (Smith & Downs 1974; Smith & Till 1998; Benzing 2000). In Bromelioideae the fruits are described as berries with a fleshy pericarp and the seeds are usually unappendaged, mucilaginous and with a sarcotesta (Smith & Downs 1974; Smith & Till 1998; Benzing 2000).

Although the morphological and anatomical characters of the fruits and seeds are relevant for the taxonomy of Bromelioideae and Bromeliaceae as a whole (Smith & Downs 1974; Fagundes & Mariath 2010; Magalhães & Mariath 2012; Santos-Silva et al. 2015), there are few studies on seed and fruit development of Bromelioideae and these studies involve a small sample size, considering the high species richness of the subfamily and its ecological and ornamental importance (Benzing 2000). Sajo et al. (2004a) studied the ovule development in twelve species currently circumscribed in the subfamilies Bromelioideae (*Aechmea alba*, *A. conglomerata*, *A. fosteriana*, *Orthophytum vagans*, and *Quesnelia edmundoi*), Brocchinioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae, and Tillandsioideae, and showed that most of them (including the Bromelioideae species) possess an appendage at the chalazal end, which is variable in shape and size. Fagundes & Mariath (2014) also analyzed the structure and ontogeny of the ovule of *Billbergia nutans* (Bromelioideae) and showed that the length of the chalazal appendage exhibits intraspecific variation and therefore this character is not useful for taxonomy. The chalazal appendages have a late development in the ovule (Fagundes & Mariath 2014; Kuhn et al. 2016), indicating that they are probably related to functional aspects of the seed.

In Rapateaceae, a family closely related to Bromeliaceae (Givnish et al. 1999, 2010; Davis et al. 2004; Linder & Rudall 2005), the seeds of some species also have multiple appendages in the chalazal end, which were described as having a dermal origin (Venturelli & Bouman 1988). A similar appendage was also observed in *Catopsis* (Tillandsioideae) with dermal and subdermal origin (Palací et al. 2004; Sajo et al. 2004a, Kuhn et al. 2016), and

were named as multiple chalazal appendages (Kuhn et al. 2016). In the remaining studied Bromeliaceae the seeds with appendage have a single appendage (Kuhn et al. 2016). The ovules in Bromeliaceae have a two-layered inner integument in most of the species studied, while the number of cell layers of the outer integument is variable among the genera (Fagundes & Mariath 2014; Nogueira et al. 2015), deserving special attention in future studies of seed ontogeny. Despite the uniform appearance of mature seeds in Bromelioideae, but considering the wide morphological variation in the ovules, we raised the hypothesis that the ontogenetic processes during the seed development may be distinct among their species. In addition, the ovules number and disposition and the available area inside the ovary locules may be related to the presence or absence and length of seed appendages, modulating the final shape of seeds.

Regarding the fruit development, we highlight the study of Fagundes & Mariath (2010) who analyzed *Aechmea calyculata*, *Billbergia nutans* (Bromelioideae), *Dyckia maritima*, *Pitcairnia flammea* (Pitcairnioideae), *Tillandsia aeranthos*, and *Vriesea carinata* (Tillandsioideae), relating the fruit structure to the dehiscence mode: capsule-type fruits in Pitcairnioideae and Tillandsioideae exhibit pre-determined dehiscence lines whereas in Bromelioideae such lines are absent and the fruits are indehiscent.

Recently, Thadeo et al. (2015) studied the ontogeny of fleshy fruits in the monocotyledons, including a species of Bromeliaceae (*Aechmea aquilega* – Bromelioideae) and identified three basic pathways for fleshiness by the anatomy and structure of pericarp: true berries with a uniform pericarp, typical drupes with an endocarp differentiated by the presence of stone pyrenes, and specialized drupes involving mesocarp and endocarp in the differentiation of the stone pyrenes. These different patterns do not follow a single pathway during the fruit evolution, indicating the fleshiness appeared multiple times during the evolution of the monocots, probably as a functional convergence (Thadeo et al. 2015).

The fleshy fruits of Bromelioideae are probably dispersed by animals (Benzing 2000), but there are few ecological studies evaluating the fruit and seed dispersion in the subfamily and how their structure is related to dispersers.

In this context, this study aimed to analyze comparatively the development of fleshy and indehiscent fruits in three species of Bromelioideae. The species were selected by presenting seeds with different morphology, including seeds with long appendages, seeds with short appendages, and seeds without appendages. The seed development was related to the fruit structure.

Material and methods

Botanical material – The species *Aechmea bromeliifolia* var. *albobracteata* Philcox, *Billbergia* sp. and *Neoregelia bahiana* (Ule) L. B. Sm. (Bromelioideae) were studied. Morphological characters of seeds and fruits, as well as the collection site, life form and herbarium records are presented in Table 1.

Flowers and fruits at different developmental stages (Fig. 1A-F) were collected from natural populations, fixed in FAA 50 (37% formaldehyde, acetic acid glacial, 50% ethanol, 1:1:18 v/v; Johansen 1940) and stored in 50-70% ethanol for the analyses using light and scanning electron microscope (SEM), and stereomicroscope. Voucher specimens were deposited at Herbarium Rioclarense (HRCB).

Methodology – Anatomical studies were performed using mature flowers and fruits at different developmental stages embedded in paraffin. Mature seeds were also embedded in (2-hydroxyethyl)-methacrylate (Leica Historesin Embedding Kit) (Gerrits & Smid 1983) due to their hardness. Cross and longitudinal sections at 6-10 µm thick were made using a rotary microtome (Leica, RM2065). The sections obtained from the samples embedded in paraffin were stained with astrablau-safranin (Bukatsch 1972), while the sections from the samples embedded in historesin were stained with periodic acid-Schiff's reagent (PAS) and toluidine blue (O'Brien et al. 1964; Feder & O'Brien 1968). All the sections were mounted on permanent slides using Entellan (Merck). Images were obtained with a microscope equipped with a camera, using the software LAS (Leica Application Suite 4.0.0)

To perform the studies with the scanning electron microscope (Zeiss, Sigma VP), seeds and fruits were dehydrated in 70% ethanol and immersed in formaldehyde-dimethylacetal for 24 hours (Gerstberger & Leins 1978). After critical-point drying (CPD 030 – Bal-Tec AG, Balzers), the samples were coated with gold (SCD 050 – Bal-Tec AG, Balzers) and the results were documented using the Zeiss SmartSEM Software. Images were also taken using a stereomicroscope (Axio, Zoom.V16) equipped with a camera (Axiocam 506) and ZEN 2.1 (blue edition) software.

Results

Morphology - Among the species studied, only *Neoregelia bahiana* shows a short inflorescence axis nested in the leaf rosette (Fig. 1A). In this species the ovaries and fruits are

white, but the individuals collected in Serra do Cipó, Minas Gerais, exhibited a greater number of fruits with persistent reddish sepals (Fig. 1B) while the individuals collected in Mucugê, Bahia, exhibited few fruits with persistent green sepals (Fig. 1A, C). In the remaining species the inflorescence axis (penduncle) is long, with congest flowers and fruits in *Aechmea bromeliifolia* (Fig. 1D) and sparse flowers and fruits in *Billbergia* sp. (Fig. 1E-F). In *A. bromeliifolia* the fruits, as well as the floral bracts and inflorescence axis are covered by a dense indument (Fig. 1D). *Billbergia* sp. has green fruits with nine conspicuous longitudinal ribs (Fig. 1F), exhibiting a sinuous shape in cross section (Fig. 3A).

Ovary structure – In the three studied species, the ovary is inferior (Figs. 1B; 2E-F), 3-carpellate and 3-locular (Figs. 2A; 3A-B), with septal nectaries and axile placentae (Figs. 3A-C; 4B-D). It is composed of an one-layered outer epidermis, a multi-layered mesophyll and an one-layered inner epidermis, and it is not possible to distinguish the carpellary and non-carpellary tissues (Fig. 5A-B, E).

The epidermal cells are smaller than the mesophyll cells (Fig. 5A-B) and contain silica bodies in the outer epidermis in *A. bromeliifolia* (Fig. 5A), which persist in the exocarp (Fig. 5C-D). In this species stomata and scales occur from the apex to middle third of the ovary (Fig. 4A); the scales have an asymmetrical shield with elongated wing, 1-2 cells in the stalk and two basal cells (Fig. 5F). The stomata are also present in *Billbergia* sp., throughout the ovary and fruit (Fig. 5G). In *N. bahiana* no stomata or scales were observed (Fig. 5B). In the three species studied the mesophyll is parenchymatous (Fig. 5A-B) and has idioblasts with calcium oxalate raphides and several vascular bundles (Fig. 4B, E-F). The mesophyll cells facing the inner epidermis have larger intercellular spaces than those facing the outer epidermis (Fig. 5A-B).

Septal nectaries - The structure of the septal nectaries is illustrated with images of both ovary (Figs. 3A-C; 4B-G; 7A) and fruit (Figs. 6A-E, 7A, C). At the ovary/fruit base, the septae are thin and the nectariferous tissue is composed of secretory epidermal cells in the three studied species (Fig. 6A-C). At the fertile zone, where we see the ovules attached to the placentae, the nectaries form wide channels inside the septa (Figs. 3A; 4B-D; 6D-E; 7A, C), which extends towards the ovary/fruit apex (Figs. 3B-C; 4F; 6A), releasing the nectar at the style base (Fig. 4G). In *Billbergia* sp. these channels are wider (Figs. 3A; 4F; 6E) when compared to the other studied species. The style is hollow at its base, with the pollen tube transmitting tissue forming three channels (Fig. 4G).

Fruit development – During the fruit development, structural changes occur in the ovary wall cells to form the pericarp, but there is no periclinal cell division, then the number of cell layers is maintained (Fig. 5B, E). The growth of pericarp is given by the elongation of its cells.

In *A. bromeliifolia* the cells of exocarp acquires U-thickenings (Fig. 5C-D) and, in the mature fruits, the cell walls of 3-4 subepidermal layers of the mesocarp are also thickened (Fig. 5D). In this later stage of development the cells of scales are obliterated and we can see only their insertion sites (Fig. 5D, arrowhead). In the mature fruits of *Billbergia* sp. and *N. bahiana* a slight thickening occurs in the cell walls of exocarp and in 1-2 subepidermal layers of the mesocarp (Fig. 5E). In addition, wall thickenings in the vascular bundles sheath cells also occur during the fruit development in the three species, but it is more pronounced in *A. bromeliifolia* (Fig. 5H). Idioblasts containing calcium oxalate raphides are present in the mesocarp (Fig. 5G).

During the fruit development the obturator cells undergo physiological changes, presenting a dense cytoplasm in the young and mature fruits (Figs. 6D; 7B). In later stages of fruit development, these obturator cells secrete substances inside the locules (Figs. 6F; 7B, E).

In the septal nectaries, the secretory epidermal cells and adjacent cells undergo wall thickening (Figs. 6A, D-F; 7B). This wall thickening increases in the mature fruits (Fig. 7C, E), especially in *A. bromeliifolia* (Fig. 7D). In *Neoregelia bahiana*, after the cell wall thickening, we also observed the formation of lenticels in the septal nectaries of mature fruits (Fig. 7F).

Ovule structure and seed development - Despite the same type of placentation, the ovules have an apical disposition in the ovary of *A. bromeliifolia* (Figs. 2A, C, E; 3D, G) and a subapical to central disposition in *Billbergia* sp. (Fig. 2B) and *N. bahiana* (Fig. 2D, F). In *A. bromeliifolia* there are about ten ovules per locule (Figs. 2A; 3D) while in the remaining species the number of ovules per locule is greater and the ovules are smaller (Figs. 2H, I; 3B-C).

In the three species studied the ovules are bitegmic and anatropous with their micropyles facing a placental obturator (Figs. 3D-F; 8A-E). The micropyle is delimited by only the inner integument in *A. bromeliifolia* (Figs. 3E; 8D) and *Billbergia* sp. (Figs. 3F; 8C) or by both inner and outer integuments in *N. bahiana* (Fig. 8B, E). The outer integument has four cell layers in *A. bromeliifolia* (Fig. 8F, H) and 2-3 cell layers in *Billbergia* sp. (Fig. 8G, I)

and *N. bahiana* (Fig. 8E). The outer integument is attached to the funicle (Fig. 8A-D). The inner integument is composed of two cells layers in the three species (Fig. 8B-I), except in the micropylar region where there are a greater number of cell layers and papillose cells (Fig. 8C, E). The mature ovule is crassinucellate, exhibiting a megagametophyte with eight nuclei and seven cells, corresponding to the egg cell, two synergids, one central cell with two polar nuclei and three antipodals (Fig. 9A-C).

The chalazal end of mature ovules of *N. bahiana* has rounded shape (Figs. 3C; 8B). In the other two species the ovules have chalazal appendages, which vary in size. In *Billbergia* sp. the appendages are rudimentary (Figs. 3F, H; 8A, C) while in *A. bromeliifolia* they are long-acuminate (Fig. 3D).

In the species studied the seeds elongate longitudinally during their development, allowing the growth of embryo and the formation of endosperm (Fig. 10A). The seed coat differentiates before the embryo development (Fig. 10A) and all cell layers of both outer and inner integuments are persistent, forming the seed coat, which is thus composed of exotesta, mesotesta, endotesta, exotegmen and endotegmen (Fig. 10G-H). The testa (exotesta, mesotesta and endotesta) becomes mucilaginous and the endotegmen cells store phenolic compounds (Fig. 10A-B, G-I). The cells of the mucilaginous testa enlarge and elongate periclinally while the cells of the tegmen elongate anticlinally (Fig. 10 G-H). The chalazal appendage present in *A. bromeliifolia* (Fig. 3G) and in *Billbergia* sp. (Fig. 3H) seeds is formed by the testa cells, thus it also increases by the enlargement of its cells and becomes mucilaginous (Fig. 10I). The cells of the testa have cellulosic, thin walls, and the cells of the tegmen exhibit lignified walls, with U-shaped thickenings in the endotegmen (Fig. 10H).

The endosperm formation is of nuclear-type, thus the primary endosperm nucleus undergoes divisions forming several nuclei during the early stages of embryo development (Fig. 10D) and the cell walls are formed later. The outermost layer of the endosperm is differentiated in the aleurone layer (Fig. 10E-H, asterisk). The nucellus is completely obliterated during the development of the endosperm and embryo (Fig. 10A-F). The embryo is differentiated into cotyledon and hypocotyl-radicular axis, which is protected by the root cap (Fig. 10B, E-F). The embryo also exhibits a reduced suspensor (Fig. 10E). The embryo size in the mature seeds is about 1/3 of the seed length in *N. bahiana*, 1/2 in *Billbergia* sp. and almost reaching the seed length in *A. bromeliifolia* (Fig. 10B).

Discussion

Fruit development in Bromeliaceae: fleshiness and dehiscence

The species studied belong to the eu-bromelioids clade, a strong supported group by molecular data (Schulte et al. 2009). The differences here observed in inflorescence and fruit morphology illustrate the variations found in Bromelioideae (Smith & Downs 1974; Smith & Till 1998; Benzing 2000).

In the three species studied the enlargement of the cells of the pericarp can be pointed as the major condition to the fruit juiciness. This condition is also reported for fleshy fruits of other Bromeliaceae (Okimoto 1948; Fagundes & Mariath 2010). There is also a mechanical hypodermis, resulted from the thickening of the cell walls of the subepidermal layers adjacent to the exocarp. This mechanical tissue is also a common feature of the fleshy fruits of Bromelioideae (Fagundes & Mariath 2010).

The indehiscent fruits of Bromelioideae, classified as berries, are a common feature of this subfamily (Smith & Downs 1974; Smith & Till 1998; Benzing 2000) and are related to the inferior ovaries. These fruit is formed by carpellary and non-carpellary tissues, as reported previously for *Aechmea calyculata* and *B. nutans* (Fagundes & Mariath 2010), and evidenced by the presence of a great number of vascular bundles in the ovary wall, which is fused to the hypanthium – most of these bundles diverge to sepals, petals and stamens. For Pitcairnioideae and Tillandsioideae, which have superior ovaries and capsule-type fruits, only three vascular bundles per carpel were reported – one dorsal and two ventral (Fagundes & Mariath 2010; Santos-Silva et al. 2015). The species studied here show three vascular bundles in the style, probably by the divergence of the dorsal vascular bundle of each carpel. Thus, a study describing the vasculature of the gynoecium is important to highlight patterns related to its evolution, in light of the current circumscription of Bromeliaceae into eight subfamilies (Givnish et al. 2007). In the study of Sajo et al. (2004b) some evidence regarding the gynoecium vasculature was discussed, but without this better-understood phylogenetic scenario.

Sajo et al. (2004b) pointed out that hypogyny could be resulted from one or more reversals during the evolution of the family. As Bromelioideae is the latest-diverging subfamily (Givnish et al. 2007), their epigynous flowers, that give raise to fleshy and indehiscent fruits, may have evolved from hypogynous flowers, as it occurs in the early-diverging families.

The fleshiness of fruits in monocots appeared multiple times during the evolution of the group (Thadeo et al. 2015), but in Bromelioideae this condition seems to be a synapomorphy of the subfamily in whose genera the pericarp has a similar anatomy, as shown for species of *Aechmea*, *Billbergia* and *Neoregelia* (Fagundes & Mariath 2010; Thadeo et al. 2015; and our data). Following the classification proposed by Thadeo et al. (2015), the fruits of these studied species of Bromelioideae are true berries with a uniform pericarp. In this context, studies with early-diverging genera in Bromelioideae are important to indicate evolutionary trends regarding the fruit fleshiness.

For the angiosperms as a whole, the indehiscent and fleshy fruits are considered as a derived condition from dry and dehiscent fruits – capsules (Roth 1977). Thus, considering the current circumscription of Bromeliaceae (Givnish et al. 2007) the presence of berries in Bromelioideae may have evolved from the capsule-type fruits, as it occurs in species of the remaining subfamilies (Smith & Downs 1974; 1977; Smith & Till 1998; Benzing 2000; Fagundes & Mariath 2010), which diverge earlier. This evolutionary trend was also discussed by Fagundes & Mariath (2010), who described structural differences in the fruit anatomy and dehiscence process among species of Tillandsioideae and Pitcairnioideae as well: Tillandsioideae (*Tillandsia aeranthos* and *Vriesea carinata*) show as the ancestral condition the septicidal capsules with three valves folded back, while in Pitcairnioideae the capsules are septicidal in *Pitcairnia* with three erect valves joined at their apexes, or biscidal in *Dyckia* by the combination of septicidal and loculicidal dehiscence forming six erect valves. In species of *Dyckia* the dehiscence also occurs by a combination of septal and loculicidal openings, but their fruits were classified as denticidal capsules resulting in six apical teeth – a homogenous morphological aspect of dehiscence in the genus (Santos-Silva et al. 2015). In all of these studied species, the capsule dehiscence occurs by the formation of dehiscence lines in the septa and/or locules (Fagundes & Mariath 2010; Santos-Silva et al. 2015).

The lines of cells forming the nectariferous tissue in the species studied here and also observed in other species of Bromelioideae (Sajo et al. 2004b; Fagundes & Mariath 2010) are homologous to the dehiscence lines in the septa of capsules, only differing by the greater fusion of the carpels in the berries. Thus, the lines forming the nectariferous tissue in Bromelioideae constitute relicts of the dehiscence apparatus (Fagundes & Mariath 2010).

In Bromeliaceae the reduction of sclerenchymatous strata was indicated as having relation to indehiscence (Fagundes & Mariath 2010) since it was observed in the fruits of Tillandsioideae conspicuous lignified cells in the exocarp, mesocarp and endocarp; in Pitcairnioideae in the exocarp or endocarp and mesocarp; and in Bromelioideae only in the

exocarp and hypodermis (Fagundes & Mariath 2010; Santos-Silva et al. 2015), as observed in the species studied here.

Functional aspects of the fleshy fruit traits

The juiciness of the fruits of Bromelioideae is related to dispersal by animals (Benzing 2000) and is given by the enlargement of mesocarp cells during the fruit development (Fagundes & Mariath 2010). In addition, the obturator seems to increase the juiciness. The presence of obturator is a common feature in Bromeliaceae, reported for species of different subfamilies (Sajo et al. 2004a; Fagundes & Mariath 2010). During the fruit development, structural changes as elongation or cell division were reported for the obturator cells (Fagundes & Mariath 2010), indicating they are functional in the fruits. In this context, our results add new information to this tissue functionality, showing that it secretes substances inside the locules of developing fruits, increasing the juiciness.

The septal nectaries are also a common feature in Bromeliaceae (Sajo et al. 2004b; Fagundes & Mariath 2010). Sajo et al. (2004b) classified the septal nectaries of Bromelioideae as interocular while in other subfamilies they are infralocular.

During the fruit development the secretory cells of the nectaries undergo structural and physiological changes. At the apical portion of the fruits the wall thickening of the nectariferous secretory cells promotes a mechanical barrier against the establishment of pathogens inside the fruits. In addition to the wall thickening in the nectariferous secretory cells, the development of stratified cells forming lenticels is a diagnostic feature for *N. bahiana* and reported here for the first time in the family. The presence of these structures should allow the gas exchange in the young and mature fruits under hypoxia conditions by the inflorescence axis nested in the leaves rosette inside the water-storage tank (Silva et al. 2018). The absence of stomata in the ovary wall only in this species reinforces this function of the lenticels in *N. bahiana*.

Regarding to *N. bahiana*, differences in the color of sepals, as well as in the number of fruits among its populations are evidences of genetic diversity or pollinators/dispersers selection among them. The color of sepals does not change under cultivation conditions (Silva et al. personal observations) being the reddish color only observed in individuals from Serra do Cipó. The white color of ovaries and fruits of this species can be related to the nidular inflorescence immersed in the water. The inflorescence axis and pedicel of flowers and fruits exhibit an achlorophyllous aspect and larger air spaces in the atactostele (Silva et al. 2018). A

greater number of fruits in individuals of the population from Serra do Cipó can be related to the bigger size of these individuals (Silva et al. 2018).

Comparing the three species studied here, the fruits of *A. bromeliifolia* are more distinct, especially for the greater thickness of the ovary wall cells, including the exocarp and the outermost layers of mesocarp. The same feature was observed in *Aechmea calyculata* (Fagundes & Mariath 2010) and may be associated to congest flowers and fruits in the inflorescence axis in species of *Aechmea* (Smith & Downs 1979; Smith & Till 1998; Benzing 2000). The wall thickness of the pericarp cells promotes a greater rigidity, protecting these grouped fruits. Other features that distinguish the fruits of *Aechmea* species are the presence of scales and silica bodies in the exocarp, which may give additional protection to the fruits.

Seed development and its relation to fruit structure and dispersal mode

In all Bromeliaceae the ovules are anatropous, bitegmic and crassinucellate and the megagametophyte development is of *Polygonum*-type (Billings 1904; Lakshmanan 1967; Palací et al. 2004; Sajo et al. 2004a,b; Fagundes & Mariath 2014; Nogueira et al. 2015; Santos-Silva et al. 2015; Kuhn et al. 2016). Regarding the integuments, the outer one shows greater variation in number of layers within the family, and was used for taxonomic purposes to distinguish among species of Tillandsioideae and genera of Bromelioideae (Fagundes & Mariath 2014; Kuhn et al. 2016).

The micropyle constituted by one or both integuments has also taxonomic value (Fagundes & Mariath 2014), with infrageneric variation. The papillose cells of the inner integument at the micropylar end probable have the function of direct the pollen tube to the embryo sac. Kuhn et al. (2016) considered that the micropyle is constituted only by the inner integument, even in the species that have an outer integument longer than the inner one. This is due to the fact that the cells of the outer integument do not have this distinct morphology at the micropyle, as observed in the inner integument (Kuhn et al. 2016).

In Bromelioideae the disposition of ovules in the middle or upper part of the ovary is common (Sajo et al. 2004b). A greater number of ovules as observed for *Billbergia* sp. and *N. bahiana* is related to their smaller size while in *A. bromeliifolia* there are fewer and bigger ovules. The combination of numerous ovules with smaller size is pointed as an ancestral condition in Bromeliaceae (Givnish et al. 2007; Fagundes & Mariath 2014), thus the presence of few and big ovules in the ovary of *A. bromeliifolia* may have resulted from a reversal or secondary reduction of ovule number.

The disposition of the ovules inside the ovary and presence/length of seed chalazal appendages may be also related to the number and size of seeds. In *Billbergia* sp. and *N. bahiana*, for examples, the numerous and small seeds are subapically to centrally inserted in the ovary wall and the seed chalazal appendages are short or absent, respectively, thus the available area inside the locules becomes smaller as the seeds grow. This relation was also observed in other species of Bromelioideae (Sajo et al. 2004a) and also among individuals of different populations of a same species, in which the number and size of seeds vary according to the length of the seed chalazal appendage that may be vestigial to very long, as described for *Billbergia nutans* (Fagundes & Mariath 2014).

In *A. bromeliifolia*, the few ovules are inserted in the apical portion of the ovary, then a bigger space is available for the development of the seeds, which have long-acuminate chalazal appendages that grow towards the fruit base. In other two studied species of *Aechmea* with long-acuminate chalazal appendages the same occurs (Sajo et al. 2004a). This relation does not apply only to species of Bromeliaceae with plumose or flattened seeds and capsule-type fruits.

In species of *Tillandsia* (Tillandsioideae), as well as species of Pitcairnioideae s.l., such as *Pitcairnia paniculata* and *Puya floccosa*, there are many ovules per locule with distinct chalazal appendages (Sajo et al. 2004a), but in Tillandsioideae the appendages are involved with the flight apparatus while in Pitcairnioideae s.l. the seeds can be flattened, with caudate or without appendages (Smith & Downs 1974; Varadarajan & Gilmartin 1988; Sajo et al 2004a). All these variations indicate distinct ontogenetic processes, and they are relevant to establish homologies for a better understand of the evolution of morphological traits of seeds in Bromeliaceae and their relation to dispersal and ability to colonize different substrates (Smith 1934; Benzing 2000).

Although there are published studies on seed morphology and anatomy of Bromeliaceae (Müller 1895; Szidat 1922; Smith & Downs 1974; Varadarajan & Gilmartin 1988; Smith & Till 1998; Benzing 2000; Palací et al. 2004; Magalhães & Mariath 2012; Prado et al. 2014; Silva KR, Capítulo 3), there are few information on its ontogeny and the few ontogenetic studies have been focused on the development of the seeds of Tillandsioideae species, describing the formation of the flight apparatus by the splintering of the testa cells (Szidat 1922; Palací et al. 2004). These seeds are formed in dehiscent capsules, whereas the mucilaginous-coated seeds are formed in fleshy and indehiscent fruits (Smith & Downs 1974; Smith & Till 1998; Benzing 2000).

The mucilaginous aspect of the seeds of Bromelioideae is observed in later stages of seed development and is probably related to fruit dispersal by animals (Benzing 2000). In the literature the mature seeds of Bromelioideae have been described as unappendaged, even known the chalazal appendages are present in the ovules (Smith & Downs 1974; 1979; Sajo et al. 2004a; Fagundes & Mariath 2014). This is because, in many species, the mucilaginous coat may degenerate inside the fruits, forming part of their juiciness (Szidat 1922; Smith & Downs 1974; Benzing 2000) in combination with the substances stored by mesocarp cells, as well as the substances secreted by the obturator. In this case the seed coat in mature seeds is constituted only by the tegmen.

We demonstrated here that the mucilaginous tissue of the seed coat corresponds to the testa. Thus, our results add new information about the development of seeds in Bromeliaceae, indicating distinct ontogenetic processes in Bromelioideae compared to Tillandsioideae. In the former, the number of layers in the outer integument does not increase during the seed development, but its cells enlarge by the accumulation of compounds, giving the mucilaginous aspect of the testa. The same occurs in the cells of the chalazal appendages, which also constitute the testa. For *N. bahiana* it was showed that the mucilaginous tissue of the seed coat is constituted by cells with primary walls rich in cellulosic and pectic compounds, and with polysaccharides in their content, making them highly hydrophilic (Silva KR, Capítulo 3). Because of this, the mucilaginous coat prevents the seed drying on the substrate (Silva & Scatena 2011) and may facilitate seed imbibitions and germination (Silva KR, Capítulo 3).

Therefore, our results on seed development in species of Bromelioideae full some gaps about how their morphology and anatomical traits are related to the fruit structure and to their dispersal, protection and germination.

References

- APG IV. 2016. Na update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181: 1-20.
- Benzing DH. 2000. *Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation*. USA, Cambridge University Press.
- Billings FH. 1904. A study of *Tillandsia usneoides*. *Botanical Gazette*, 38: 99-121.

- Bouchenak-Khelladi Y, Muasya AM, Linder HP. 2014. A revised evolutionary history of Poales: origins and diversification. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 175: 4-16.
- Bukatsch F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos*, 61: 255.
- Davis JI, Stevenson DW, Petersen G, Seberg O, Campbell LM, Freudenstein JV, Goldman DH, Hardy CR, Michelangeli FA, Simmons MP, Specht CD, Vergara-Silva F, Gandolfo M. 2004. A phylogeny of the monocots, as inferred from *rbcl* and *atpA* sequence variation, and a comparison of methods for calculating jackknife and bootstrap values. *Systematic Botany*, 29: 467-510.
- Fagundes NF, Mariath JEA. 2010. Morphoanatomy and ontogeny of fruit in Bromeliaceae species. *Acta Botanica Brasilica*, 24: 765-779.
- Fagundes NF, Mariath JEA. 2014. Ovule ontogeny in *Billbergia nutans* in the evolutionary context of Bromeliaceae (Poales). *Plant Systematics and Evolution*, 300: 1323-1336.
- Feder N, O'Brien TP. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany*, 55:123-142.
- Gerrits PO, Smid L. 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy*, 132: 81-85.
- Gerstberger P, Leins P. 1978. Rasterelektronenmikroskopische untersuchungen an Blütenknospen von *Physalis philadelphia* (Solanaceae). *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 91: 381-387.
- Givnish TJ, Evans TM, Pires JC, Sytsma KJ. 1999. Polyphyly and convergent morphological evolution in Commelinales and Commelinidae: evidence from *rbcl* sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12: 360-385.
- Givnish TJ, Millam KC, Berry PE, Sytsma KJ. 2007. Phylogeny, adaptive radiation and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso*, 23: 3-26.
- Givnish TJ, Ames M, McNeal JR, McKain MR, Steele PR, dePamphilis CW, Graham SW, Pires JC, Stevenson DW, Zomlefer WB, Briggs BG, Duvall MR, Moore MJ, Heaney JM, Soltis DE, Soltis PS, Thiele K, Leebens-Mack JH. 2010. Assembling the tree of the monocotyledons: plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 97: 584-616.
- Johansen DA. 1940. Plant microtechnique. New York: McGraw Hill Book.

- Kuhn SA, Nogueira FM, Fagundes NF, Mariath JEA. 2016. Morphoanatomy of the ovary and ovule in Bromeliaceae subfamily Tillandsioideae and its systematic relevance. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181: 343-361.
- Lakshmanan KK. 1967. Embryological studies in the Bromeliaceae. I. *Lindmania penduliflora* (C. H. Wright) Stapf. *Proceedings of the Indian Academy Science*, 65:49–55.
- Linder HP, Rudall PJ. 2005. Evolutionary history of Poales. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 36: 107-124.
- Magalhães RI, Mariath JEA. 2012. Seed morphoanatomy and its systematic relevance to Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 298: 1881-1895.
- Müller F. 1895. Die Keimung einiger Bromeliaceen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 13:175–182.
- Nogueira FM, Fagundes NF, Kuhn SA, Fregonezi JN, Mariath JEA. 2015. Ovary and ovule anatomy in the nidularioid complex and its taxonomic utility (Bromelioideae: Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177: 66-77.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59: 368-373.
- Okimoto MC. 1948. Anatomy and histology of the pineapple inflorescence and fruit. *Botanical Gazette*, 110: 217-231.
- Palací CA, Brown GK, Tuthill DE. 2004. The seeds of *Catopsis* (Bromeliaceae: Tillandsioideae). *Systematic Botany*, 29: 518-527.
- Prado JPC, Schimdt EC, Steinmacher DA, Guerra MP, Bouzon ZL, Vesco LLD, Pescador R. 2014. Seed morphology of *Vriesea friburguensis* var. *paludosa* L. B. Sm. (Bromeliaceae). *Hoehnea*, 41: 553-562.
- Roth I. 1977. *Fruits of Angiosperms*. Berlin, Gebrüder Borntraeger.
- Sajo MG, Prychid CJ, Rudall PJ. 2004a. Structure and development of the ovule in Bromeliaceae. *Kew Bulletin*, 59: 261-267.
- Sajo MG, Rudall PJ, Prychid CJ. 2004b. Floral anatomy of Bromeliaceae, with particular reference to the evolution of epigyny and septal nectaries in commelinid monocots. *Plant Systematics and Evolution*, 247: 215-231.
- Santos-Silva F, Mastroberti AA, Mariath JEA. 2015. Capsule structure in three species of *Dyckia* (Bromeliaceae): ontogenetic and taxonomic issues. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 142: 249-257.

- Schulte K, Barfuss MHJ, Zizka G. 2009. Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51: 327-339.
- Silva IV, Scatena VL. 2011. Morfologia de sementes e de estádios iniciais de plântulas de espécies de Bromeliaceae da Amazônia. *Rodriguésia*, 62: 263-272.
- Silva KR, Versieux LM, Oriani A. 2018. Anatomy of vegetative organs, inflorescence axis and pedicel in the *Neoregelia bahiana* complex (Bromeliaceae): taxonomic and ecological importance. *Nordic Journal of Botany*, 2018: e01800.
- Smith, L. B. 1934. Geographical evidence on the lines of evolution in the Bromeliaceae. *Botanische Jahrbücher für Systematik , Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 66: 446-468.
- Smith LB, Downs RJ. 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*, 14: 1-658.
- Smith LB, Downs RJ. 1977. Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*, 14: 663-1492.
- Smith LB, Downs RJ. 1979. Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*, 14: 1493-2142.
- Smith LB, Till W. 1998. Bromeliaceae. In Kubitzki K (ed.). The families and genera of vascular plants, vol 4, Springer, Berlin, Germany, p. 74-99.
- Szidat L. 1922. Die Samen der Bromeliaceen in ihrer Anpassung an den Epiphytismus. *Botanisches Archiv*, 1: 29-46.
- Thadeo M, Hampilos KE, Stevenson DW. 2015. Anatomy of fleshy fruits in the monocots. *American Journal of Botany*, 102: 1-23.
- Varadarajan GS, Gilmartin AJ. 1988. Seed morphology of the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae) and its systematic implications. *American Journal of Botany*, 75: 808-818.
- Venturelli M, Bouman F. 1988. Development of ovule and seed in Rapateaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 97: 267-294.

Ilustrações

Figure 1. Inflorescence structure of the species studied. **A-C.** *Neoregelia bahiana* (**A**, **C**. Mucugê, Bahia; **B**. Serra do Cipó, Minas Gerais) with flowers at pre-anthesis, anthesis and post-anthesis (**A**), young fruits at different developmental stages (**B**), and mature fruits (**C**). **D.** *Aechmea bromeliifolia* var. *albobracteata* with flowers and fruits at different developmental stages; the inflorescence maturation is acropetal. **E-F.** *Billbergia* sp. with flowers at anthesis and post-anthesis (**E**), and mature fruits (**F**). Scale bars: 1 cm.



Figure 2. Ovary and fruit structure in longitudinal (**A-F, H-I**) and cross (**G**) sections. **A, C, E.** *Aechmea bromeliifolia* var. *albobracteata*. **B, H.** *Billbergia* sp. **D, F-G, I.** *Neoregelia bahiana*. **A-B.** General aspects of the ovaries. **C-D.** General aspects of the immature fruits. **E-G.** General aspects of the mature fruits. **H-I.** Details of the ovules and developing seeds, respectively. Ov, ovules; P, petal; S, scale; Se, sepal; St, style; Pl, placenta. Scale bars: 2 mm (A-G); 0,5 mm (H-I).

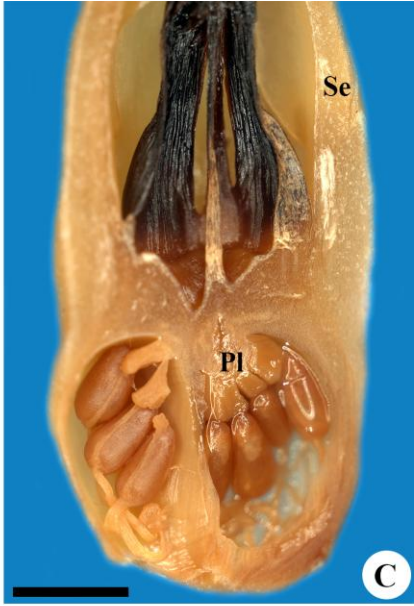
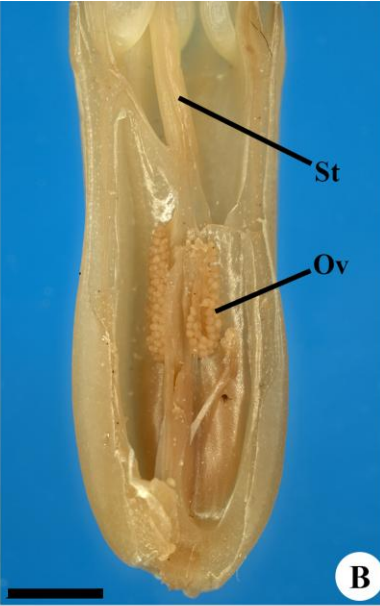
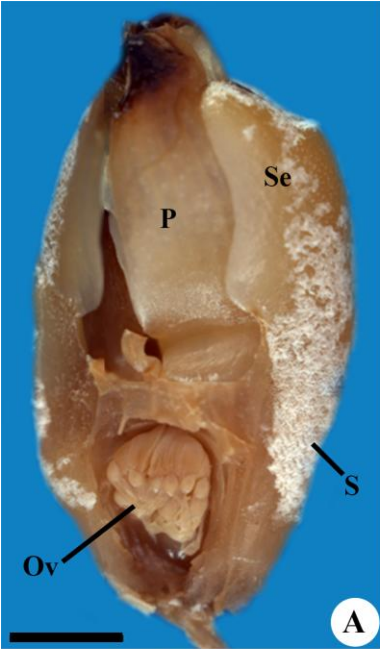


Figure 3. Ovaries in cross sections (**A-F**), fruits in longitudinal section (**G**) and seed morphology (**H-I**) under SEM. **A, F, H.** *Billbergia* sp. **B-C, I.** *Neoregelia bahiana*. **D-E, G.** *Aechmea bromeliifolia* var. *albobracteata*. **A-C.** General aspects and a detail showing the axile placentation and septal nectaries. **D-F.** Details of the anatropous and bitegmic ovules with chalazal appendages. **G-I.** Final shape of seeds. CA, chalazal appendage; Fu, funicle; II, inner integument; NC, nectariferous channels; OI, outer integument; Pl, placenta. Scale bars: 200 μm (A-D, F-I); 100 μm (E).

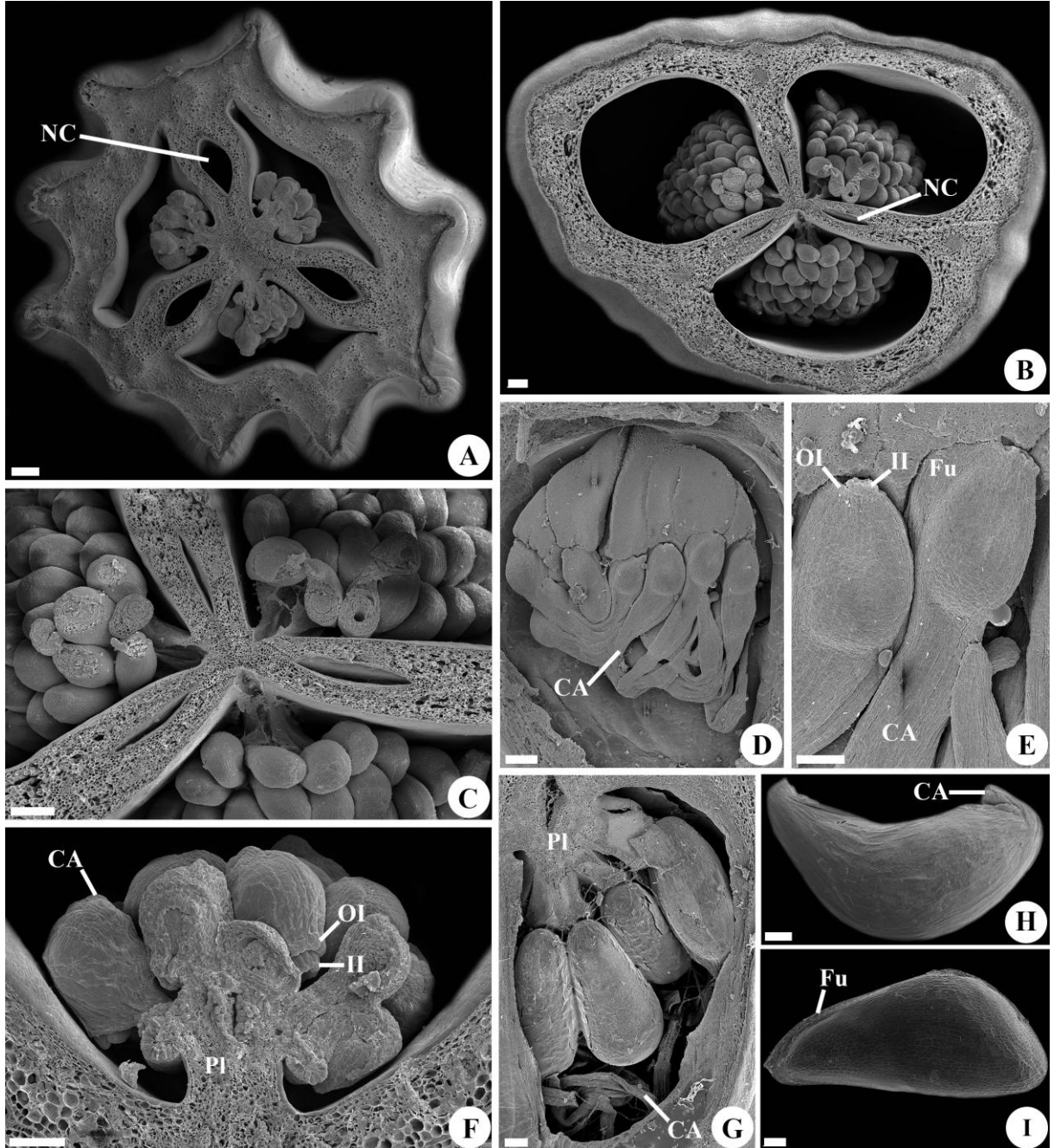


Figure 4. Ovaries showing the placentation and position of the nectariferous channels in longitudinal (A) and cross sections (B-G). **A-B, E, F.** *Aechmea bromeliifolia* var. *albobracteata*. **C, F.** *Billbergia* sp. **D.** *Neoregelia bahiana*. **A.** General aspect showing the apical position of the placentae. **B-D.** Fertile zone of the ovaries, with the ovules inserted on axile placentae and septal nectariferous channels. **E-G.** Sections at the ovary apex showing the divergence of nectariferous channels to the style base. *Arrowheads*, suture lines of adjacent carpels; Lo, locule; NC, nectariferous channels; Pl, placenta; S, scales; St, style; VB, vascular bundles; *, site where the nectar is released. Scale bars: 500 μ m (A-F); 200 μ m (G).

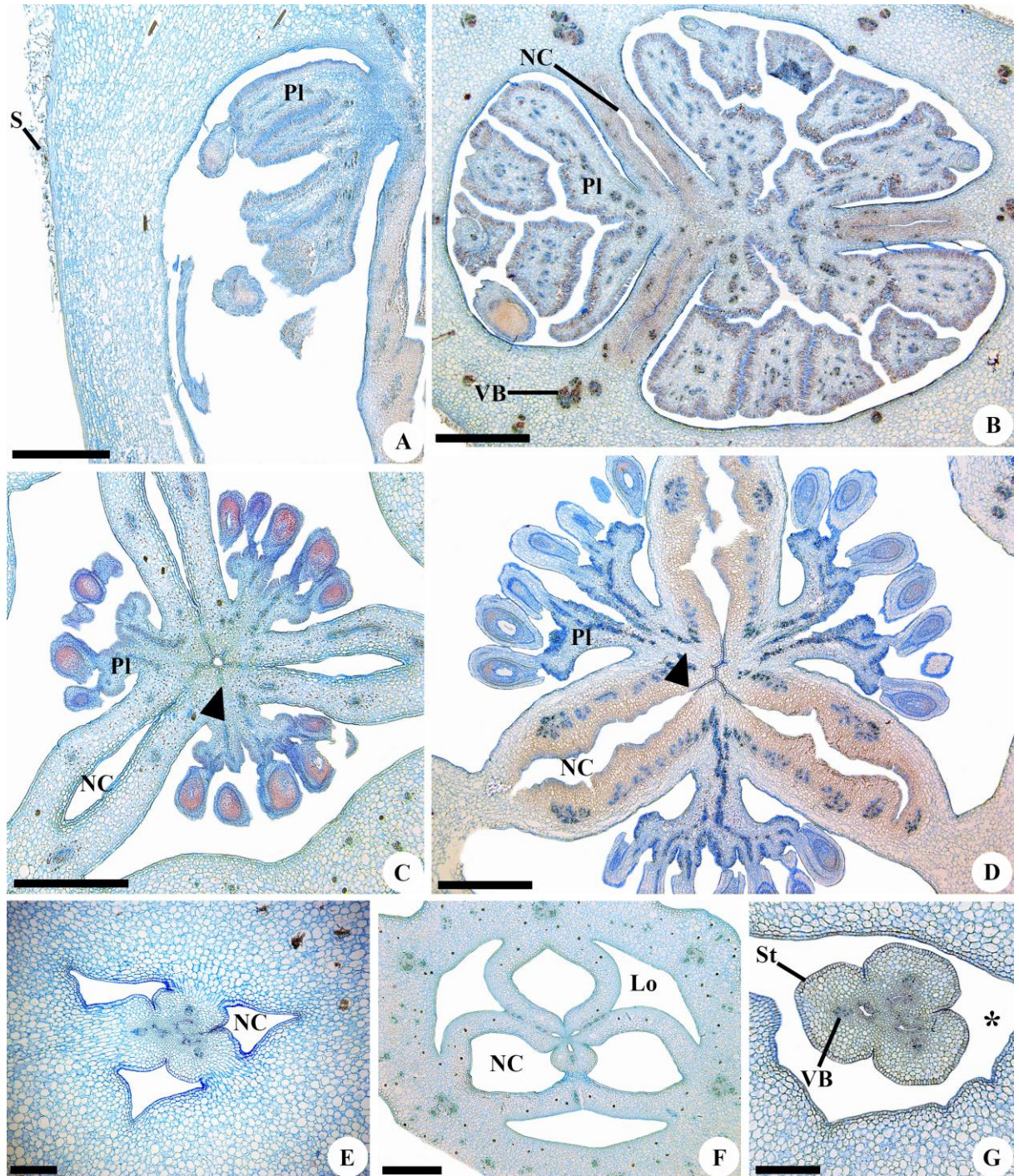


Figure 5. Details of ovaries and fruits in cross (A-B, D-E, G-H) and longitudinal sections (C, F). **A, C-D, F, H.** *Aechmea bromeliifolia* var. *albobracteata*. **B, E.** *Neoregelia bahiana*. **G.** *Billbergia* sp. **A-B.** General aspects of the ovary wall. **C-D.** Differentiation of the exocarp and mesocarp in immature and mature fruits, respectively. **E.** General aspect of the pericarp. **F.** Scale on the immature fruit wall. **G.** Detail of the pericarp showing a stoma and an idioblast with raphides. **H.** Collateral vascular bundle in the mature fruit. *Arrowhead*, site where a scale was inserted; En, endocarp; Ex, exocarp; Fi, fibers; IE, inner epidermis; Me, mesocarp; OE, outer epidermis; Ph, phloem; SB, silica body; Stm, stoma; VB, vascular bundle; X, xylem; *, idioblast with raphides. Scale bars: 100 μ m (A-B, D-E); 50 μ m (C, F-H).

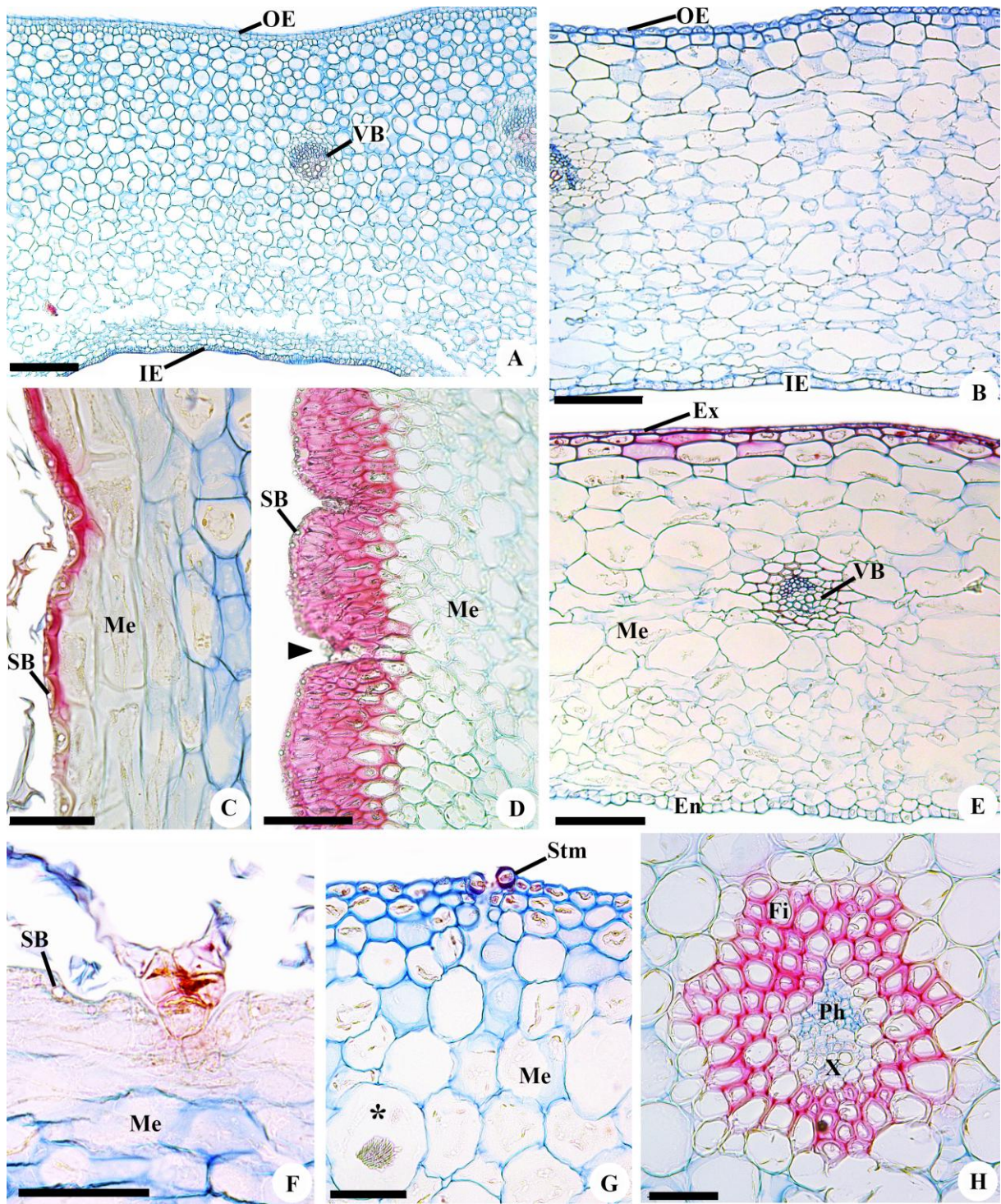


Figure 6. Fruits at different developmental stages in longitudinal (**A**) and cross sections (**B-F**), showing the placentation and septal nectaries. **A-D.** *Aechmea bromeliifolia* var. *albobracteata*. **E.** *Billbergia* sp. **F.** *Neoregelia bahiana*. **A.** General aspect of the immature fruit showing the apical position of the placenta and nectariferous channel. **B-C.** General aspect and a detail, respectively, showing the nectariferous tissue above the placentation in mature fruits. **D-E.** General aspects of immature fruits showing the axile placentation and position of the nectariferous channels. **F.** Detail of the central region of a mature fruit. *Arrowheads*, suture lines of the carpels; NC, nectariferous channels; NT, nectariferous tissue; Pl, placenta; Sc, secretion; YS, young seed. Scale bars: 500 μm (A-B, D-E); 50 μm (C); 200 μm (F).

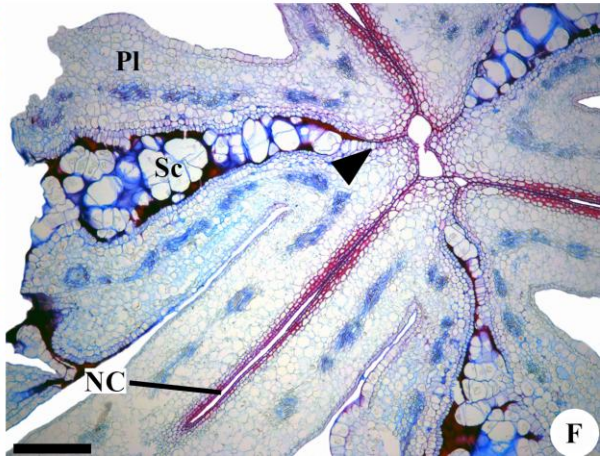
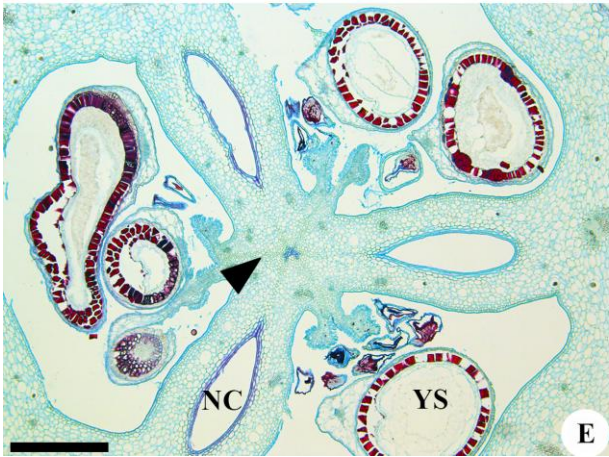
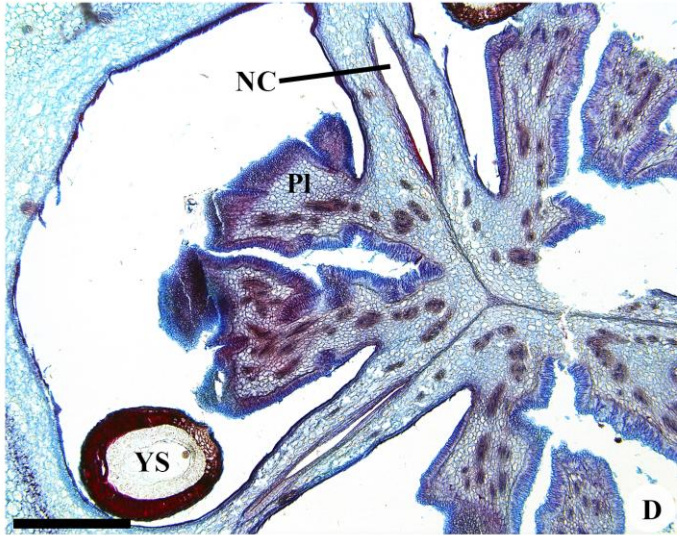
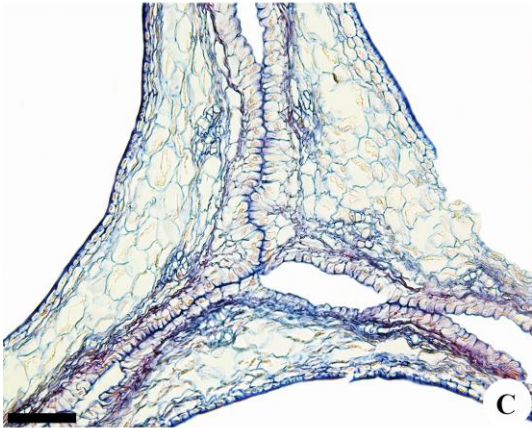
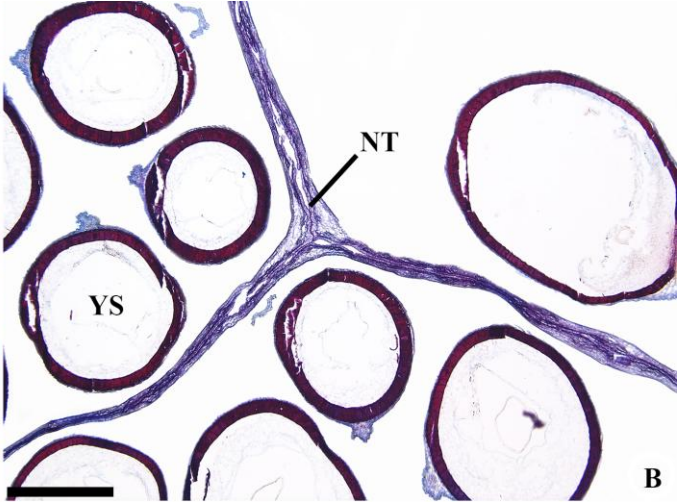
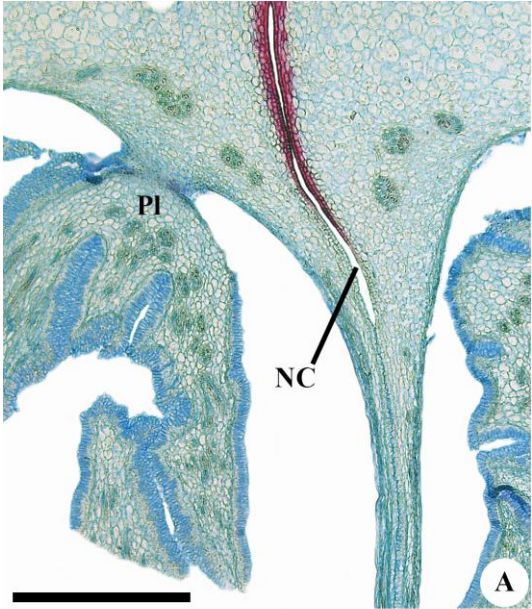


Figure 7. Structural changes in septal nectaries during fruit development, in cross sections. **A, C.** *Billbergia* sp. **B, D.** *Aechmea bromeliifolia* var. *albobracteata*. **E-F.** *Neoregelia bahiana*. **A-B.** Details of the septal nectary in an ovary and immature fruit, respectively. **C-D.** Details of the septal nectary in mature fruits. **E.** Detail of the central region of a mature fruit. **F.** Detail of a lenticel in the septal nectary of a mature fruit. *Arrowhead*, suture line of the carpels; NC, nectariferous channels; Sc, secretion. Scale bars: 100 μm (A-B, E); 200 μm (C); 50 μm (D, F).

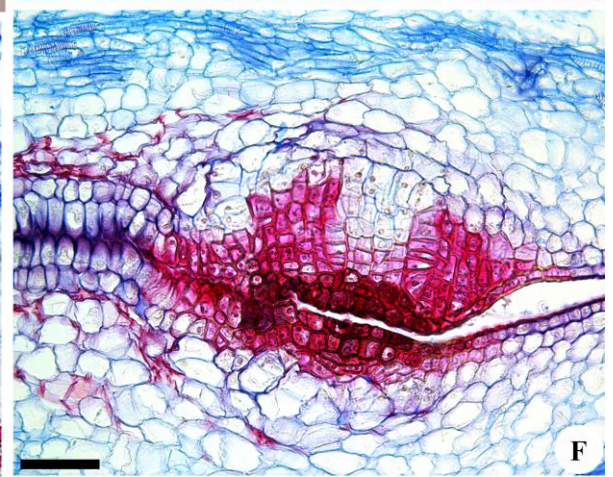
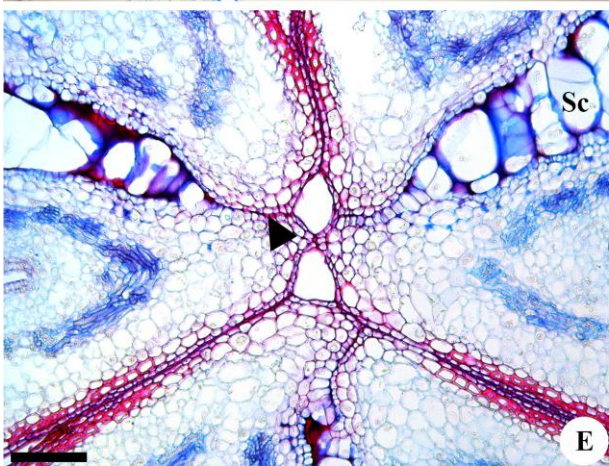
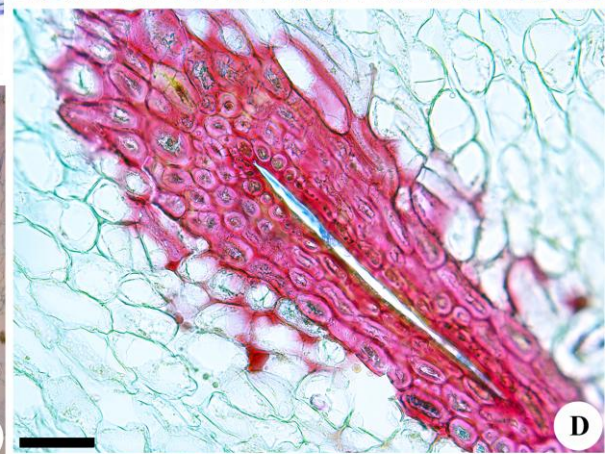
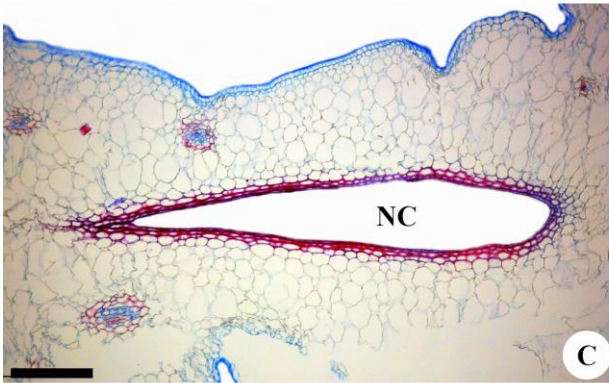
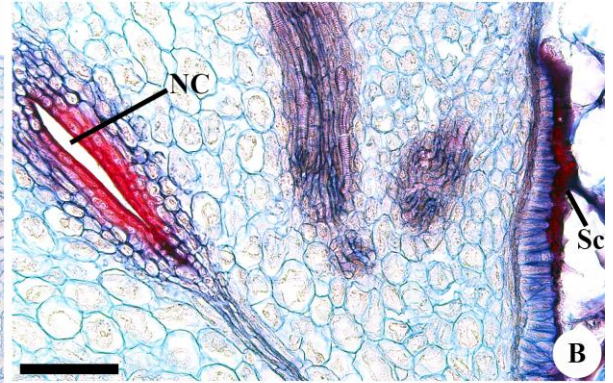
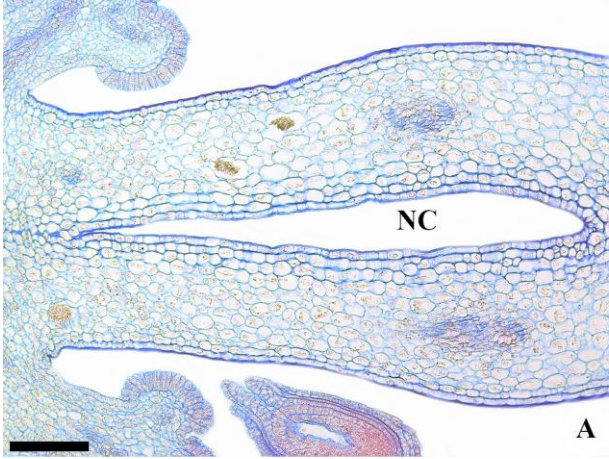


Figure 8. Ovules in longitudinal (**A-E**) and cross sections (**F-I**). **A, C, G, I.** *Billbergia* sp. **B, E.** *Neoregelia bahiana*. **D, F, H.** *Aechmea bromeliifolia* var. *albobracteata*. **A-D.** General aspects of the ovules showing the integuments, chalazal appendages and obturator. **E.** Detail of the ovule micropylar end. **F-I.** General aspects and details of mature ovules showing the number of layers in each integument. CA, chalazal appendage; Fu, funicle; II, inner integument; Nu, nucellus; Ob, obturator; OI, outer integument; Pl, placenta; VB, vascular bundle; *, outer integument attached to funicle. Scale bars: 100 μm (A-B, D); 50 μm (C, E-H); 25 μm (I).

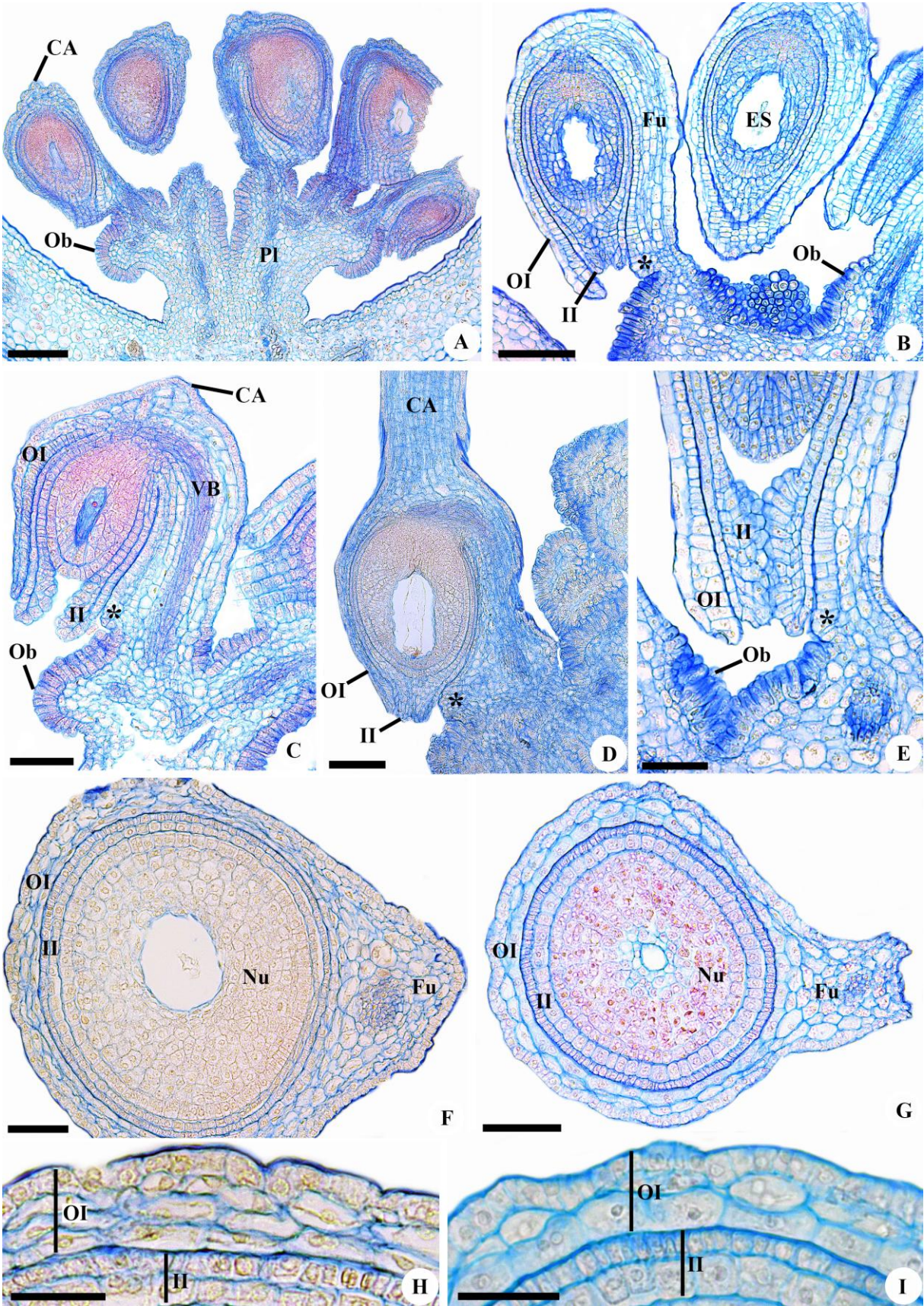


Figure 9. Details of mature ovules showing the embryo sac and nucellus in longitudinal sections. **A.** *Billbergia* sp. **B-C.** *Aechmea bromeliifolia* var. *albobracteata*. A, antipodals; EC, egg cell; FA, filiform apparatus; NE, nucellar epidermis; PN, polar nuclei; Sy, synergids. Scale bars: 25 μ m.

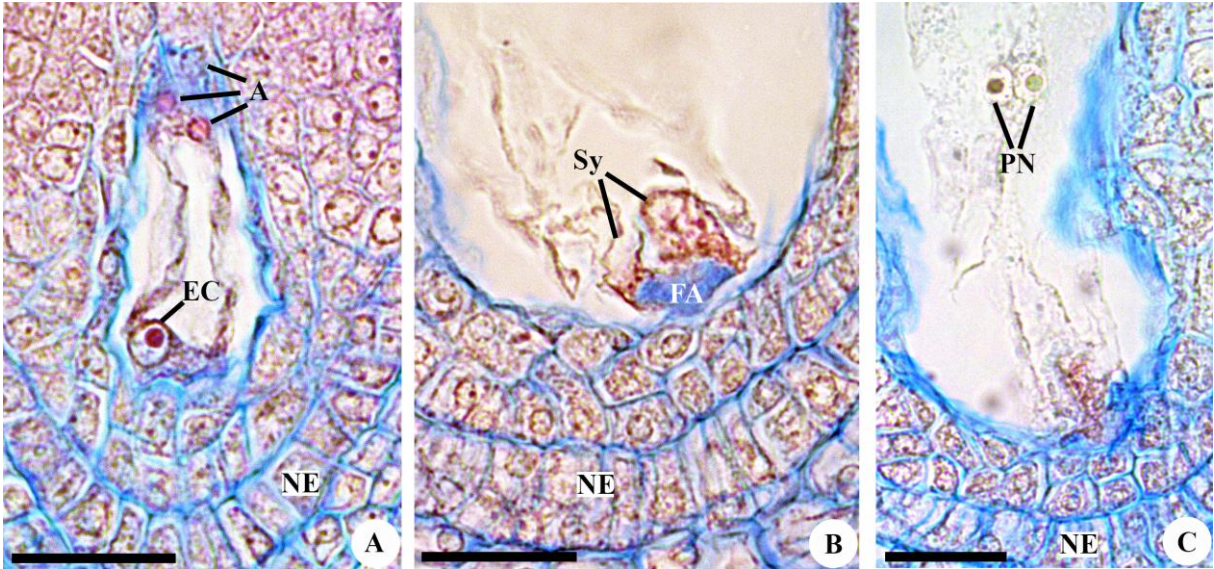


Figure 10. Seed development in longitudinal (A-F, I) and cross sections (G-H). A-D. *Aechmea bromeliifolia* var. *albobracteata*. E-I. *Billbergia* sp. A-B. General aspects of immature and mature seeds, respectively. C-D. Details at the micropylar end in immature seeds showing the embryo development and endosperm formation. E-F. Details at the micropylar end of immature and mature seeds, respectively, showing the differentiation of the embryo. G-H. Details of immature and mature seeds, respectively, showing the differentiation of the seed coat and endosperm. I. Detail at the chalazal end of a mature seed. Arrows, developing embryo; Arrowhead, shoot apical meristem; CA, chalazal appendage; CE, chalazal end of seed; Co, cotyledon; En, endosperm; EnT, Endotegmen; ExT, exotegmen; LP, leaf primordium; ME, micropylar end of seed; MT, mucilaginous testa; N, nucellus; NE, nucellar epidermis; PT, pollen tube; RC, root cap; S, suspensor; SC, seed coat; Te, testa; *, aleurone layer; 1-5 indicates the testa, exotegmen, endotegmen, nucellus and endosperm, respectively. Scale bars: 200 μ m (A-B, I); 50 μ m (C-E, G-H); 100 μ m (F)

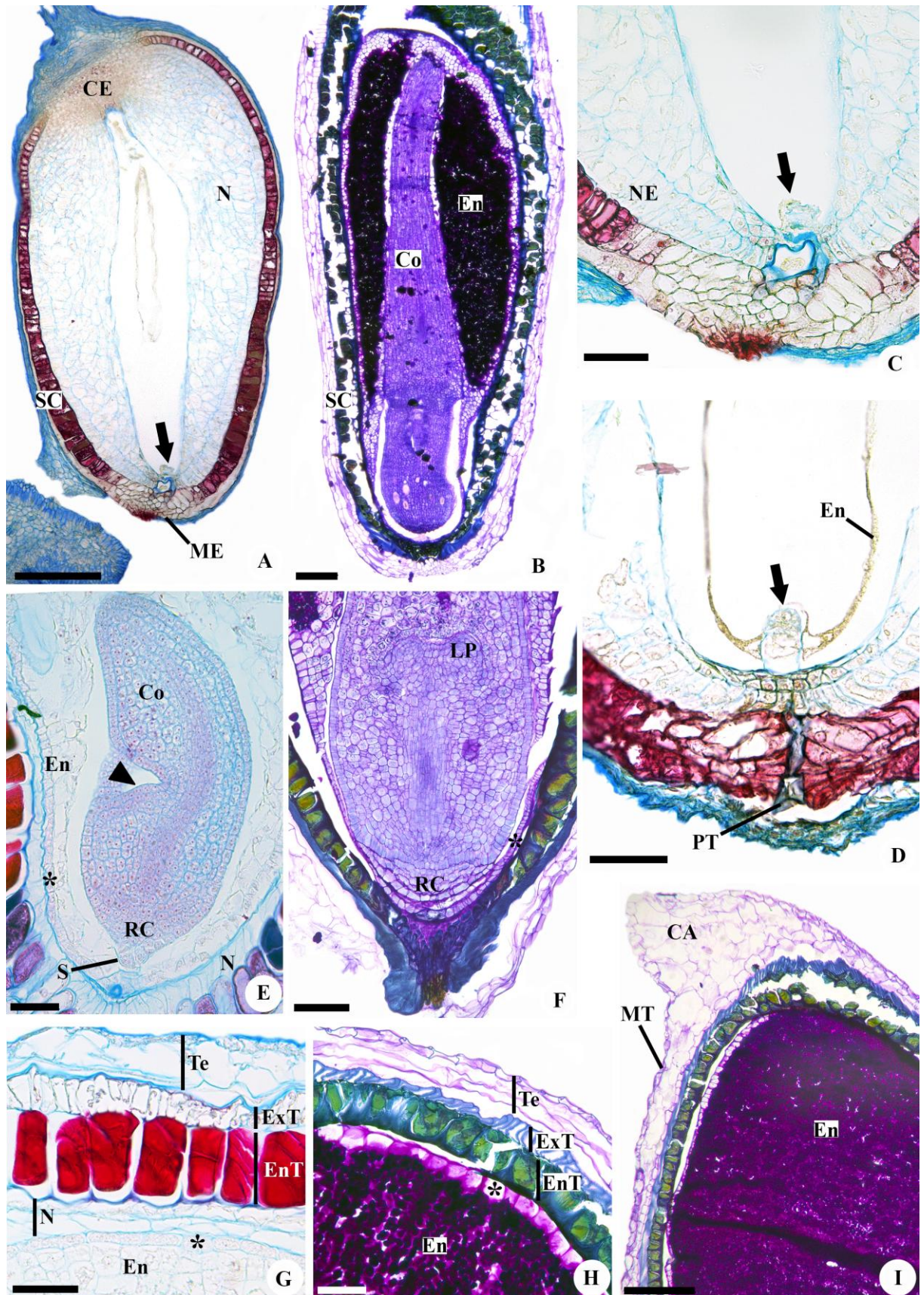


Table 1. Morphological characters of fruits and seeds, collection sites, and herbarium records of the species studied.

	<i>Aechmea bromeliifolia</i> var. <i>albobracteata</i>	<i>Billbergia</i> sp.	<i>Neoregelia bahiana</i>
Fruit size (length x width)	1,0 cm x 0,5 cm	3,5 cm x 0,8 cm	4,5 cm x 0,8 cm
Placentation	Axile; in the apical portion of the ovary	Axile; in the subapical portion of the ovary	Axile; in the subapical portion of the ovary
Seed coat	Mucilaginous, without appendage	Mucilaginous, with a short appendage	Mucilaginous, with a long appendage
Collection site	Cerrado; Rio Claro, SP, Brazil	Cerrado; Rio Claro, SP, Brazil	Campos rupestres; Serra do Cipó, MG and Mucugê, BA, Brazil
Life form	Epiphytic, rupicolous, terricolous	Epiphytic	Rupicolous
Vouchers	<i>K. R. Silva 90</i>	<i>K. R. Silva 91</i>	<i>K. R. Silva & K. O. Nardi 75; M. V. Dantas-Queiroz et al. 129</i>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no que foi apresentado e discutido a partir dos nossos resultados e de informações disponíveis na literatura, destacamos aqui nossas principais conclusões sobre os temas abordados. Os resultados apresentados levantaram questões a serem investigadas posteriormente, que também são indicadas nesse tópico, visando contribuir com o conhecimento de Bromeliaceae.

- *Morfologia e anatomia dos complexos de espécies:*
- Em *Neoregelia bahiana*, do ponto de vista anatômico, apenas as folhas se mostram importantes para a taxonomia. Dentre os caracteres destacam-se: arranjo das escamas na face abaxial da lâmina, número de camadas da epiderme aquífera na face adaxial, formato da margem foliar e comprimento das calotas de fribas nos feixes vasculares;
- Apesar dos caracteres diagnósticos para as populações (caracteres qualitativos), as folhas de *N. bahiana* mostram uma maior plasticidade (variações no comprimento, largura e coloração e na dimensão dos canais de ar no mesofilo, relacionadas ao ambiente), o que corrobora o conhecimento já disponível na literatura quanto à maior capacidade adaptativa das folhas de Bromelioideae e ressalta a importância de se analisar diferentes amostras, de diferentes populações, de indivíduos submetidos a diferentes condições ambientais;
- Em *Vriesea oligantha* a presença de feixes de fibras subepidérmicos na região central da lâmina foi a única característica anatômica importante para separar as populações de Minas Gerais daquelas da Bahia. Os poucos caracteres diagnósticos observados evidenciam maior uniformidade entre as folhas de *Vriesea*;
- A forma e constituição anatômica da margem do limbo, caracteres já usados em trabalhos anteriores para diferenciar as espécies, mostraram ter variação infrapopulacional e, portanto, não são úteis para a taxonomia desse complexo;
- Do ponto de vista taxonômico, nossos resultados indicam a presença de mais de um táxon em cada complexo. Ressalta-se que em *V. oligantha* são descritas três espécies constituindo este complexo, mas a análise de similaridade indicou quatro grupos morfologicamente distintos pelas folhas;
- A anatomia da raiz e do caule nos dois complexos apresenta maior uniformidade entre suas populações e quando comparada a de outros gêneros já estudados, indica que a estrutura anatômica desses órgãos é mais uniforme na família como um todo;

- O eixo da inflorescência, apesar do mesmo tipo de organização anatômica, mostra adaptações distintas quanto ao suporte das flores e frutos nos gêneros estudados: aerênquima em *Neoregelia* (que apresenta eixo curto, imerso na roseta de folhas) e periciclo com células esclerenquimáticas em *Vriesea* (cujo eixo é alongado, elevando a inflorescência bem acima da roseta de folhas).

- *Estrutura e desenvolvimento do fruto:*

- A estrutura dos frutos apresentando vários feixes vasculares no pericarpo indica a fusão de tecidos carpelares e não carpelares;
- Nas espécies estudadas o desenvolvimento do pericarpo se mostrou uniforme, apenas com as células do exocarpo e parte do mesocarpo apresentando algum grau de espessamento de parede, indicando que os frutos são bagas verdadeiras;
- *Aechmea bromelifolia* possui maior espessamento do exocarpo nos frutos maduros, do ápice para a base, bem como a presença de escamas e estômatos na porção apical dos frutos; essas características se relacionam com a disposição das flores na inflorescência;
- As mudanças estruturais dos nectários septais quanto ao espessamento de parede do tecido secretor durante a maturação dos frutos indica que a produção de néctar ocorre apenas em estágios anteriores (flor em antese);
- O obturador é funcional em frutos jovens e maduros, secretando substâncias para o interior dos lóculos, e deve contribuir com a suculência dos frutos em conjunto com o mesocarpo;
- A presença de lenticelas no pericarpo, como observado em *N. bahiana*, é característica inédita para Bromeliaceae e provavelmente está relacionada com o desenvolvimento dos frutos imersos no tanque armazenador de água.

- *Estrutura e desenvolvimento da semente:*

- O envoltório mucilaginoso de *N. bahiana* é rico em compostos pécnicos na parede celular de suas células e deve reter água para a embebição da semente;
- O envoltório mucilaginoso corresponde à testa, pois tem origem do tegumento externo do óvulo. Tanto o aspecto mucilaginoso das sementes, quanto a suculência dos frutos em estágios finais de desenvolvimento se relacionam com a dispersão zoocórica.

- Durante o desenvolvimento, a semente se alonga longitudinalmente e o envoltório seminal inicia sua diferenciação muito precocemente, em relação ao desenvolvimento do embrião;
- O espessamento de parede das células do exotégmen é importante para a taxonomia. *Neoregelia bahiana* distingue-se das demais espécies estudadas quanto à presença de paredes anticlinais com espessamento celulósico;
- A morfologia das células do tegmento interno do óvulo na região micropilar e sua diferenciação tardia durante o desenvolvimento da semente estão relacionadas com a germinação de Bromelioideae, que ocorre a partir da ruptura da semente madura nessa região;
- O embrião é diferenciado na semente madura e apresenta variações de tamanho em relação ao tamanho da semente nos indivíduos de Bromelioideae;
- O suspensor é persistente e reduzido na semente madura, estágio em que o embrião já apresenta coifa protegendo o meristema apical radicular.

- *Desenvolvimento pós-seminal e anatomia das plântulas:*

- Nossos resultados indicam que a germinação em Bromelioideae envolve o desenvolvimento da raiz primária e, principalmente, do hipocótilo no interior da semente;
- Durante a germinação as camadas de aleurona na porção micropilar possuem atividade meristemática, acompanhando o desenvolvimento do embrião e protegendo o ápice radicular. Análises imunocitoquímicas confirmam a funcionalidade dessas células na região micropilar em relação a outras partes da semente;
- O cotilédone diferencia-se na bainha, região de alongamento e porção haustorial. Essa região de alongamento foi aqui descrita como fanerômero;
- A anatomia dos órgãos das plântulas de Bromeliaceae é descrita pela primeira vez. Demonstramos que as raízes adventícias se originam do hipocótilo ou do epicótilo e, dependendo da origem, diferem anatomicamente;
- O colar de rizóides é a região de transição entre a raiz primária e o eixo caulinar, mostrando a polarização do xilema para formar o único feixe do hipocótilo;
- A estrutura anatômica dos órgãos vegetativos das plântulas mostrou-se diferente daquela dos indivíduos adultos de *N. bahiana*, o que ilustra a heteroblastia na família e indica diferentes respostas fisiológicas;
- A imunocitoquímica foi importante para entender processos de diferenciação e função dos órgãos, como por exemplo, a diferenciação da bainha cotiledonar e do hipocótilo, com a

função de reserva em plântulas de Bromeliaceae. Esse tipo de análise também complementa o conhecimento sobre a diferenciação de órgãos em monocotiledôneas, de uma forma geral, devido aos poucos estudos nessa área.

- *Perspectivas de estudos futuros:*

- Analisar a anatomia floral em cada complexo de espécie estudado, a fim de subsidiar trabalhos seguintes de revisão taxonômica dessas espécies;
- Estudar as variações das folhas entre os estágios de planta jovem até a planta adulta para um melhor entendimento sobre o estabelecimento da estrutura anatômica foliar em Bromeliaceae. Esses resultados serão importantes para relacionar aspectos morfológicos e fisiológicos durante o estabelecimento dos indivíduos em substratos e condições ambientais;
- Ampliar os estudos anatômicos e de desenvolvimento de frutos de Bromeliaceae, devido à escassez de estudos para a família, especialmente com representantes de linhagens basais, como Brocchinioideae, que também possui flores epíginas, a fim de entender sua evolução na família;
- Avaliar se a testa mucilaginosa influencia no tempo de germinação e desenvolvimento das plântulas de Bromelioideae;
- Analisar comparativamente a anatomia das sementes e desenvolvimento pós-seminal em espécies de outras subfamílias, para entender as variações e sua relação com a biologia/ecologia das espécies.

Considerando a grande diversidade morfológica de Bromeliaceae e de ambientes e habitats em que suas espécies ocorrem, ainda há muito o que se explorar para melhor conhecimento dessa família, tão rica e representativa da flora brasileira.