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

**ANATOMIA DE ESPÉCIES DE *Leiothrix* RUHLAND (ERIOCAULACEAE, POALES)
E SUA IMPORTÂNCIA PARA A TAXONOMIA E FILOGENIA**

ANA ANGÉLICA SILVA MASCARENHAS

**Rio Claro – SP
2021**

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

ANATOMIA DE ESPÉCIES DE *Leiothrix* RUHLAND (ERIOCAULACEAE, POALES)
E SUA IMPORTÂNCIA PARA A TAXONOMIA E FILOGENIA

ANA ANGÉLICA SILVA MASCARENHAS

ORIENTADORA: DRA. VERA LUCIA SCATENA

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

Rio Claro – SP
2021

M395a Mascarenhas, Ana Angélica Silva
Anatomia de espécies de *Leiothrix* RUHLAND (Eriocaulaceae, Poales) e sua importância para a taxonomia e filogenia / Ana Angélica Silva Mascarenhas. -- Rio Claro, 2021
116 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Vera Lucia Scatena

1. câmara subestomática especializada. 2. desenvolvimento floral. 3. fusão congênita e pós-genital. 4. heterocronia. 5. semente estriada.
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.

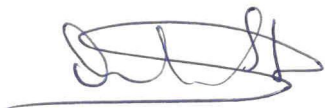
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ANATOMIA DE ESPÉCIES DE *Leiothrix* RUHLAND (ERIOCAULACEAE, POALES) E SUA IMPORTÂNCIA PARA A TAXONOMIA E FILOGENIA

AUTORA: ANA ANGÉLICA SILVA MASCARENHAS

ORIENTADORA: VERA LUCIA SCATENA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIASBIOLÓGICAS (BIOLOGIA VEGETAL), área: Biologia Vegetal pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. VERA LUCIA SCATENA (Participação Virtual)
Departamento de Botânica / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Profa. Dra. BÁRBARA DE SÁ HAIAD (Participação Virtual)
Departamento de Botânica - Museu Nacional / Universidade Federal do Rio de Janeiro / RJ

Profa. Dra. DANIELA GUIMARÃES SIMÃO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / Centro de Ciências Naturais e Exatas / Universidade Federal de Santa Maria - RS

Profa. Dra. FABIANE NEPOMUCENO DA COSTA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - Diamantina / MG

Prof. Dr. KLEBER RESENDE SILVA (Participação Virtual)
Centro de Energia Nuclear na Agricultura / Universidade de São Paulo - Piracicaba / SP

Rio Claro, 16 de agosto de 2021

*Sendo eu, um aprendiz
A vida já me ensinou que besta
É quem vive triste
Lembrando o que faltou*

*Magoando a cicatriz
E esquece de ser feliz
Por tudo que conquistou*

*Afinal, nem toda lágrima é dor
Nem toda graça é sorriso
Nem toda curva da vida
Tem uma placa de aviso
E nem sempre o que você perde
É de fato prejuízo*

*O meu e o seu caminho
Não são muito diferentes
Tem espinho, pedra, buraco
Pra mode atrasar a gente*

*Mas não desanime por nada
Pois até uma topada
Empurra você pra frente*

*Tantas vezes parece que é o fim
Mas no fundo, é só um recomeço
Afinal, pra poder se levantar
É preciso sofrer algum tropeço*

*É a vida insistindo em nos cobrar
Uma conta difícil de pagar
Quase sempre, por ter um alto preço*

*Acredite no poder da palavra desistir
Tire o D, coloque o R
Que você tem Resistir*

*Uma pequena mudança
As vezes traz esperança
E faz a gente seguir*

*Continue sendo forte
Tenha fé no Criador
Fé também em você mesmo
Não tenha medo da dor*

*Siga em frente a caminhada
E saiba que a cruz mais pesada
O filho de Deus carregou*

(Bráulio Bessa)

Dedico este trabalho à todas as mulheres que vieram antes de mim e permitiram que esse trabalho fosse possível: às cientistas e as que sonharam, e por algum motivo não puderam realizar. Especialmente as mulheres da minha família que me permitiram sonhar e realizar.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, com a bolsa de Doutorado concedida e a extensão da vigência da bolsa devido a Pandemia de COVID-19, e ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradeço à Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ (UNESP), pela estrutura para a realização da tese de Doutorado.

Agradeço à minha orientadora Dra. Vera Lucia Scatena por voltar a orientar e me dar a oportunidade de aprender com ela para além de Botânica, me ajudar a identificar e agir de forma mais cuidadosa e incisiva no trabalho e na vida. Obrigada Vera!

Agradeço a Dra. Aline Oriani por me receber em Rio Claro, me auxiliar e ajudar todas as vezes que recorri à ela, sempre muito cuidadosa e prestativa; assim como a Dra. Alessandra Ike Coan pelas inúmeras vezes que facilitou o trabalho com sua ajuda no Laboratório de Morfologia e Anatomia Vegetal. Agradeço ao Dr. Douglas Domingues por todo auxílio no período de desenvolvimento deste trabalho. Agradeço ao Dr. Júlio Lombardi pela ajuda com a bibliografia e auxílio no herbário. Agradeço ao Dr. Gustavo Habermann pela ajuda com as estantes de germinação.

Agradeço à todos os professores que ao longo do meu processo de aprendizado contribuíram para a minha formação, em especial ao Dr. Fabiano Machado Martins, por me apresentar a anatomia vegetal; à Dra. Reyjane Patrícia de Oliveira por me ajudar a olhar as plantas para além da anatomia; à Dra. Kelly Regina B. Leite por me mostrar que podemos construir pontes para além do universo botânico; à Dra. Ana Maria Giulietti Harley por ser uma exemplo de amor pela botânica e mostrar tudo que ainda se pode construir com ela; ao Dr. Thomas Stützel por me mostrar com sua simplicidade o quão precioso é compartilhar o conhecimento.

Agradeço ao Dr. Luciano Paganucci de Queiroz pela apoio e autorização com as amostras de folhas e escapos de *Leiothrix* do Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana. Agradeço a Dra. Fabiane Nepomuceno da Costa pela disponibilidade e auxílio durante as coletas e ida ao Herbário da Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri. Agradeço ao Dr. Marcelo Trovó e Ms. Wellerson Picanço pelo auxílio com material herborizado e as sementes de *L. argyroderma* e *L. beckii*. Agradeço ao Dr. Elliot Watanabe Kitajima e ao Renato Salaroli pela ajuda e apoio no Laboratório de Microscopia Eletrônica (Esalq), bem como os demais integrantes da equipe. Agradeço ao Dr. Simon Mayo por sua atenção e disponibilidade em versar ao inglês os manuscritos da tese.

Agradeço à todos os amigos e colegas que ao longo do doutorado estiveram comigo em coletas, ou aqueles que em suas viagens de campo foram gentis em trazer parte do material estudado neste trabalho: Alexia Riedo, Arthur Silva, Artur Soares, Gala Dädlow, James Lucas da Costa, Josyane

Carneiro, Júnior Carneiro, Kleber Resende, Luana Sauthier, Mara Reis, e os Professores Fabiane Nepomuceno, Paulo T. Sano e Vera Lucia Scatena. Agradeço à Profa. Ana Maria Giuliatti Harley por gentilmente ter permitido que me hospedasse na sua casa em Rio de Contas durante as coletas.

Agradeço à todos os amigos e colegas do Departamento de Botânica, em especial aqueles do convívio diário no Laboratório de Morfologia e Anatomia Vegetal: Alexia Riedo, Aline Sayuri, Anniely Zini, Arthur Silva, Fernanda Passarini, Gisele Barbosa, Gustavo Gomes, Isabela Frollini, João de Oliveira, Kaire Nardi, Kleber Resende, Lucimara Reis e Thales Leandro. Agradeço a Naiara David por todo auxílio no departamento e no laboratório durante o doutorado. Agradeço o acolhimento e companhia dos colegas do Programa nas disciplinas que cursamos ou nos momentos compartilhados, especialmente a Janaíne Hammes e Natacha Silva. Obrigada gente, vocês tornaram essa caminhada mais leve e agradável!

Agradeço as minhas amigas pela presença constante e por transformarem toda e qualquer situação em alegria e esperança: Gi, Jana e especialmente Mara (a alegria transforma qualquer jornada, com você nessa caminhada o riso nunca faltou)! Meninas vocês foram o abraço apertado (mesmo que virtual) e sopro de amor em tempos difíceis. Agradeço aos amigos de longe que estavam à uma ligação de distância para me ouvir, aconselhar, acolher e encorajar: Andreza Matos, Elfany Reis, Jayane Santos, Juliana Mota, Micael Almeida, Petty Almeida e Thaila Vieira. Agradeço à Taiana Paranhos pelos ouvidos atentos e questionamentos difíceis, mas que me ajudaram a encarar com coragem e leveza esse período.

Agradeço à minha família por mesmo sem compreender as minhas escolhas sempre me apoiaram, me incentivaram e estiveram comigo. Aos meus avós(ôs), tias(os), primas(os), aos meus irmãos Ana Mércia e Thiago Lucas, e especialmente aos meus pais César e Jocelma, Muito Obrigada! E por fim, agradeço a Deus que me possibilitou viver e realizar mais um sonho e por me permitir viver tantos outros, Obrigada Senhor!

RESUMO

Eriocaulaceae apresenta ca. de 1.400 espécies distribuídas em 10 gêneros, dentre eles, *Leiothrix*, que se diferencia dos demais por apresentar ramos nectaríferos e estigmáticos posicionados em diferentes alturas no estilete das flores pistiladas e diferentes tipos de fusionamento da corola nas flores estaminadas. Estudou-se o desenvolvimento e a vascularização das flores, morfologia das sementes e desenvolvimento pós-seminal, bem como a anatomia de folhas e escapos, visando elucidar questões morfológicas e anatômicas e auxiliar na compreensão de suas relações infragenéricas. Suas flores são recobertas por brácteas, desenvolvendo primeiramente o cálice, seguido do complexo pétala-estames e do pistilódio nas flores estaminadas; e do gineceu nas flores pistiladas. A fusão das sépalas e pétalas das flores estaminadas é congênita (porção basal) e pós-genital (porções mediana e apical). O desenvolvimento do gineceu apresenta crescimento diferencial dos tecidos marginais dos carpelos (heterocronia), que reflete nas diferentes alturas dos ramos nectaríferos no estilete. As sementes de *Leiothrix* apresentam formas variadas, com contorno das células do envoltório e padrão de ornamentação diferentes entre as espécies estudadas, o que auxilia na identificação das mesmas. O desenvolvimento pós-seminal segue o padrão para Eriocaulaceae. Folhas com mais de sete feixes vasculares estão presentes nos representantes de *Leiothrix* da Cadeia do Espinhaço-Bahia, e folhas com hipoderme e número reduzido de feixes vasculares naqueles da Cadeia do Espinhaço-Minas Gerais. Estômatos com câmara subestomática especializada nas folhas e escapos, número de feixes vasculares nas folhas, espessamento das paredes das células epidérmicas nos escapos, presença de pseudoviviparidade e número de camadas e tipo de espessamento das células do periciclo nos escapos corroboram parcialmente tanto a antiga quanto a atual classificação de *Leiothrix*.

Palavras-chave: câmara subestomática especializada; desenvolvimento floral; fusão congênita e pós-genital; heterocronia; hipoderme; semente estriada.

ABSTRACT

Eriocaulaceae presents ca. 1400 species distributed in 10 genera, among which, *Leiothrix* can be differed from the others due to its nectariferous and stigmatic branches located at diverse heights in pistil flowers as well as different types of corolla fusion in staminate flowers. The development and vascularization of flowers, seed morphology, post-seminal development, and the anatomy of leaves and scapes of this genus were studied, aiming to elucidate morphological and anatomical issues and assist in the understanding of its infrageneric relationships. *Leiothrix* flowers are covered by bracts, first developing the calyx, followed by the stamen-petals complex and the pistillode in staminate flowers and the gynoecium in pistil flowers. The fusion of the sepals and petals in staminate flowers is congenital (basal portion) and post-genital (median and apical portions). The gynoecium development shows differential growth of the carpels marginal tissues (heterochrony), which reflects in the different heights of nectariferous branches in the style. *Leiothrix* seeds have different shapes with different outline of the envelope cells and ornamentation pattern among the studied species, which helps in their identification. Post-seminal development follows the pattern found in Eriocaulaceae. Leaves with more than seven vascular bundles are present in *Leiothrix* species from Cadeia do Espinhaço - Bahia, however, leaves with hypodermis and a reduced number of vascular bundles are found in those from Cadeia do Espinhaço - Minas Gerais. Features such as the presence of stomata with a specialized substomatic chamber in leaves and scapes, number of vascular bundles in the leaves, thickening of the epidermal cell walls in the scapes, presence of pseudoviviparity and number of layers and type of thickening of the pericycle cells in the scapes partially corroborate both the old and the current *Leiothrix* classification.

Keywords: congenital and postgenital fusion; floral development; heterochrony; hypodermis; specialized substomatic chamber; striated seed.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
 CAPÍTULO 1: Desenvolvimento e Vascularização floral de <i>Leiothrix</i> (Eriocaulaceae, Poales).....	25
Resumo	26
Introdução	27
Material e Métodos	29
Resultados	30
Discussão	34
Conclusão	38
Referências	39
Legendas	43
Figuras	46
Tabelas	62
 CAPÍTULO 2: Seed morphology and post-seminal development in <i>Leiothrix</i> Ruhland (Eriocaulaceae, Poales)	63
Abstract	64
Introduction	65
Material and methods	67
Results	68
Discussion	70
References	75
Legends	79
Figures	80
Tables	83

CAPÍTULO 3: Leaf and scape anatomy of <i>Leiothrix</i> Ruhland (Eriocaulaceae) from a taxonomic and ecological perspective	86
Abstract	87
Introduction	88
Material and Methods	90
Results	91
Discussion	93
References	104
Legends	109
Figures	110
Tables	113
CONSIDERAÇÕES FINAIS	115

INTRODUÇÃO GERAL

As Eriocaulaceae são ervas com raízes absorventes e/ou fixadoras; caules curtos, rizomatozos ou alongados; folhas dispostas em roseta; com escapos protegidos por uma espata e emergindo do centro da roseta; capítulos involucrados compactos portando flores unissexuadas (Giulietti et al. 2012; Scatena et al. 2005). Suas flores são diminutas, geralmente monóicas, heteroclamídeas, actinomorfas ou levemente zigomorfas, 2/3-meras; androceu isostêmone ou diplostêmone, com anteras introsas, basifixas ou dorsifixas, 2/4-esporangiadas, pólen espiroaperturado; gineceu com ovário súpero, 2/3-locular, um óvulo por lóculo, óvulo ortótropo, estilete com ramos nectaríferos e ramos estigmáticos; suas sementes apresentam tegumento liso, com apêndices ou estriado; com embrião pequeno e indiferenciado (Giulietti et al. 1986; 2012; Stützel 1998; Rosa e Scatena 2007).

Eriocaulaceae têm distribuição pantropical (Giulietti et al. 2012), compreende cerca de 1.400 espécies (Giulietti 2020) que estão concentradas especialmente nas montanhas da Venezuela e do Brasil. No Brasil, a Cadeia do Espinhaço, que se estende nos Estados de Minas Gerais e Bahia, é detentora da maior diversidade das espécies (Giulietti et al. 2012). A família possui um elevado número de espécies micro-endêmicas, principalmente aquelas que ocorrem em grandes altitudes, nos trópicos do Hemisfério Norte ou Sul (Hensold e Giulietti 1991). Na América do Sul, as espécies de Eriocaulaceae estão especialmente concentradas nos campos rupestres (Giulietti et al. 1995), ambientes com altitudes superiores à 900m, solos geralmente rasos, arenosos, onde afloram rochas (Giulietti et al. 1988).

Os representantes de Eriocaulaceae, além de participarem da fitofisionomia dos campos rupestres apresentam importância econômica, pois são utilizados no extrativismo e comercialização, principalmente pelos habitantes da região da Cadeia do Espinhaço, onde escapos e capítulos são colhidos, secos ao sol e vendidos para decoração de interiores ou para adornos individuais (brincos, colares, tiaras, etc.) (Giulietti et al. 1988). Por conta da sua importância econômica sua coleta pode ser desordenada na maioria das vezes, o que fez algumas espécies entrarem para a lista de espécies brasileiras ameaçadas de extinção pelo seu endemismo e perda do habitat (MMA 2014).

Eriocaulaceae, um pouco de sua taxonomia

A primeira descrição de Eriocaulaceae foi realizada por Linneus (1753), com quatro espécies de *Eriocaulon*, diferenciadas pelo número de costelas dos escapos. Posteriormente Eriocaulaceae foi designada como família por Desvaux (1828).

O primeiro estudo com espécies brasileiras de Eriocaulaceae foi realizado por Bongard (1831) apresentando a descrição de 83 espécies. A primeira revisão taxonômica da família envolve *Eriocaulon* (com *E. subg. Nasmythia* e *E. subg. Paepalanthus*), *Tonina* e *Philodice* (Martius 1835) e posteriormente Kunth (1841) descreveu *Lachnocaulon* e *Paepalanthus*. Uma revisão das espécies neotropicais foi realizada por Koernicke (1854) incluindo duas tribos: Eriocaulae e Paepalanthae.

A revisão mais completa da família foi realizada por Ruhland (1903), apresentando duas subfamílias: Eriocauloideae, cujas flores têm glândulas no ápice das pétalas, flores estaminadas com androceu diplostêmone, estames epipétalos e flores pistiladas com gineceu portando ramos estigmáticos; e Paepalanthoideae, com flores sem glândulas nas pétalas, flores estaminadas com androceu isostêmone e estames não fusionados às pétalas e flores pistiladas com ramos nectaríferos e ramos estigmáticos alternados. Essa revisão incluiu *Eriocaulon*, *Mesanthemum*, *Lachnocaulon*, *Philodice*, *Tonina* e *Paepalanthus*, além da descrição de três novos gêneros a partir de *Paepalanthus*: *Blastocaulon*, *Syngonanthus* e *Leiothrix*.

No Brasil, foram concentrados estudos taxonômicos com *Eriocaulon* e *Leiothrix*, dos campos rupestres da Serra do Cipó, estado de Minas Gerais por Giulietti (1978; 1984). A partir da década de 1990, estudos moleculares (APG 1998) mostraram o monofiletismo da família e sua proximidade com Xyridaceae. A primeira filogenia molecular de Eriocaulaceae foi realizada por Andrade et al. (2010), após o que diversos gêneros foram sinonimizados (Giulietti et al. 2012). Atualmente Eriocaulaceae apresenta 10 gêneros: *Eriocaulon*, *Mesanthemum*, *Lachnocaulon*, *Tonina*, *Paepalanthus*, *Actinocephalus*, *Rondonanthus*, *Comanthera*, *Syngonanthus* e *Leiothrix* (Giulietti et al. 2012).

Leiothrix e seu histórico

Segundo Giulietti (2020), as primeiras espécies de *Leiothrix* foram descritas no gênero *Eriocaulon* e atualmente são reconhecidas como *L. hirsuta*, *L. flagellaris*, *L. prolifera* e *L. vivipara*. O gênero foi reconhecido por Ruhland em (1903), a partir da descrição de uma seção de *Paepalanthus* apresentada por Koernicke (1863). As características que diferem as espécies de *Leiothrix* das demais Eriocaulaceae são: flores com tricomas agudos e lisos, flores estaminadas com corola dialipétala ou gamopétala e flores pistiladas com estilete unido em uma coluna basal, com os ramos nectaríferos e estigmáticos que se separam em diferentes alturas (Ruhland 1903).

As espécies de *Leiothrix* foram distribuídas em cinco subgêneros por Ruhland (1903), de acordo com o hábito e o tipo de reprodução das plantas, bem como, pela presença de brácteas florais e fusão das pétalas. *L. fluitans*, que apresenta corola dialipétala nas flores pistiladas e estaminadas, única espécie aquática, foi classificada em *L. subg. Rheocaulon*; *L. argyroderma*, *L. beckii* e *L. spiralis* apresentam corola dialipétala nas flores pistiladas e estaminadas, e hábito terrestre, foram classificadas em *L. subg. Eleutherandra*; *L. arrecta*, *L. luxurians*, *L. flagellaris*, *L. pendunculosa*, *L. prolifera*, *L. propinqua*, *L. spargula* e *L. vivipara* apresentam corola dialipétala nas flores pistiladas e corola gamopétala nas flores estaminadas, com reprodução assexuada (pseudoviviparidade) foram classificadas em *L. subg. Stephanophyllum*; *L. angustifolia*, *L. curvifolia*, *L. crassifolia*, *L. dielsii*, *L. echinocephala*, *L. flavescens*, *L. fluminensis*, *L. fulgida*, *L. graminea*, *L. hirsuta*, *L. hirsuta var. blanchetiana*, *L. mucronata*, *L. nubigena*, *L. pilulifera*, *L. rufula* e *L. schlechtendalii* apresentam corola dialipétala nas flores pistiladas e corola gamopétala nas flores estaminadas, sem pseudoviviparidade foram classificadas em *L. subg. Calycocephalus*; e *Leiothrix arechavaletae*, única espécie do gênero que ocorre no Uruguai e que não apresenta brácteas florais, foi classificada em *L. subg. Psilanthus*.

Para as Eriocaulaceae do Brasil, Silveira (1928), descreveu 28 espécies de *Leiothrix*, três delas em *L. subg. Eleutherandra*, 10 em *L. subg. Stephanophyllum* e 15 em *L. subg. Calycocephalus*. Nas décadas de 1970 e 1980 algumas Eriocaulaceae brasileiras foram estudadas taxonomicamente, com

destaque para *Leiothrix* (Giulietti 1978; 1984), envolvendo morfologia, anatomia e distribuição geográfica das espécies.

A primeira filogenia de Eriocaulaceae utilizou dados morfológicos (Giulietti et al. 1995) e *Leiothrix* foi selecionado como foco, com 33 espécies analisadas. Os resultados mostraram que *Leiothrix* e *Syngonanthus* são grupo-irmãos, que *L. subg. Stephanophyllum* é monofilético e os demais subgêneros não apresentam boa resolução. Todos os estudos posteriores envolvendo filogenia da família (Andrade et al. 2010; Giulietti et al. 2012; Trovó et al. 2013; Echternacht et al. 2014; Silva 2014) confirmaram os resultados apresentados por Giulietti et al. (1995) para *Leiothrix*.

Na atual revisão taxonômica de *Leiothrix*, apresentada por Giulietti (2020), foram reconhecidas 39 espécies distribuídas em dois subgêneros: *L. subg. Leiothrix* e *L. subg. Stephanophyllum*. Nessa nova classificação, as espécies de *L. subg. Leiothrix*, incluem aquelas sem pseudoviviparidade, com corola dialipétala nas flores pistiladas e estaminadas ou corola dialipétala nas flores pistiladas e gamopétala nas estaminadas; e as espécies de *L. subg. Stephanophyllum* incluem aquelas com pseudoviviparidade, corola dialipétala nas flores pistiladas e gamopétala nas flores estaminadas.

Um pouco da Anatomia de Eriocaulaceae

Nos **órgãos vegetativos**, os primeiros estudos de anatomia de Eriocaulaceae envolveram a caracterização de *Eriocaulon* (van Tieghem 1887; Poulsen 1888; Holm 1901), *Tonina* e *Paepalanthus* (Poulsen 1888). Algumas características anatômicas que delimitam a família foram descritas no início do século XX, como a presença de bainha dupla envolvendo os feixes vasculares (Holm 1901) e presença de estômatos apenas na face abaxial das folhas (Ruhland 1903).

A partir do estudo de Malmanche (1919), as características anatômicas de *Eriocaulon*, *Mesanthemum*, *Tonina*, *Paepalanthus*, *Philodice* e *Lachnocaulon* foram associadas à taxonomia. Posteriormente, Tomlinson (1964) apresentou a caracterização anatômica dos órgãos vegetativos de Eriocaulaceae. Na década seguinte, Giulietti (1978; 1984) utilizou caracteres anatômicos associados à taxonomia para *Eriocaulon* e *Leiothrix*. Em seguida, foi apresentada a anatomia de *Eriocaulon* e *Leiothrix* e sua relação com o ambiente (Monteiro et al. 1984; 1985).

Estudos anatômicos envolvendo taxonomia e ecologia com representantes de Eriocaulaceae ocorreram com *Paepalanthus* (Splett et al. 1993; Castro e Menezes 1995), *Syngonanthus* (Splett et al. 1993; Scatena e Menezes 1996), *Actinocephalus* e *Eriocaulon* (Splett et al. 1993) em que foram utilizadas principalmente as características das células epidérmicas, bem como a natureza das células estomáticas (Splett et al. 1993; Castro e Menezes 1995; Scatena e Menezes 1996). Verificou-se a presença de estômatos com câmaras subestomáticas especializadas nas folhas de *Syngonanthus* (Scatena e Menezes 1993), característica inédita descrita para as angiospermas, que está associada com as trocas gasosas.

A partir da década de 1990, foram realizados diversos estudos de anatomia de órgãos vegetativos de grupos taxonômicos de Eriocaulaceae, voltados à taxonomia e à ecologia (Scatena e Giulietti 1996; Scatena et al. 1998; Giulietti et al. 1998; Scatena e Rosa 2001; Coan et al. 2002; Scatena et al. 2004; 2005; Oriani et al. 2005; Alves et al. 2013; Oliveira e Oriani 2016).

Nos órgãos reprodutivos, o estudo da morfologia e da anatomia floral de Eriocaulaceae tem sido importante na caracterização das subfamílias, dos gêneros, bem como das classificações infragenéricas (Ruhland 1903; Giulietti et al. 2012; Trovó et al. 2013). São considerados caracteres de importância taxonômica: presença de glândulas nas pétalas, graus de fusionamento do cálice ou da corola, presença de antóforos, androceu diplostêmone ou isostêmone, filetes livres ou fundidos às pétalas, anteras basifixas ou dorsifixas, estaminódios lineares ou escamiformes, presença de ramos nectaríferos, diferentes alturas da inserção dos ramos nectaríferos e estigmáticos no estilete, estigmas simples ou bífidos (Ruhland 1903; Rosa e Scatena 2003; 2007; Giulietti et al. 2012).

O primeiro estudo sobre desenvolvimento floral em Eriocaulaceae foi realizado em *E. septangulare* (Smith 1910) mostrando rudimentos de estames e pistilos nas flores. Algumas décadas depois foram publicados os primeiros dados sobre anatomia floral de Eriocaulaceae, também com *E. septangulare*, focados principalmente na embriologia (Hare 1950; Begum 1968) e com citação sobre a presença de nectários nas flores (Hare 1950).

A partir da década de 1980, foram realizados estudos sobre o desenvolvimento das flores de *Eriocaulon*, *Mesanthemum*, *Lachnocaulon*, *Tonina*, *Syngonanthus*, *Paepalanthus* e *Leiothrix*

(Stützel 1984; 1985; Stützel e Gansser 1995). Neles, os autores destacam a importância das glândulas nas pétalas de *Eriocaulon* e *Mesanthemum*; a redução do verticilo de cálice e corola, bem como a redução lateral e facial dos estames em espécies de *Lachnocaulon*, *Tonina* e *Paepalanthus*; e o desenvolvimento dos ramos nectaríferos em posição carinal e dos ramos estigmáticos em posição comissural em *Syngonanthus* e *Leiothrix*.

Duas décadas depois foram concentrados alguns estudos de anatomia de flores de Eriocaulaceae, e dentre estes, foi realizada análise das flores estaminadas e pistiladas de representantes de Eriocauloideae e Paepalanthoideae, com descrição de pistilódio nectarífero nas flores estaminadas, e estilete vascularizado pelos feixes dorsais dos carpelos nas flores pistiladas (Rosa e Scatena 2003). Após análises anatômicas e histoquímicas das flores pistiladas de Paepalanthoideae, com a confirmação da presença de néctar, os termos ‘porção nectarífera’ e ‘porção estigmática’ foram utilizados para designar as estruturas que anteriormente eram consideradas ‘apêndices’ (Rosa e Scatena 2007).

Mais tarde, a análise da evolução das flores dímeras de *Paepalanthus* revelou a origem do ‘pistilódio’ e mostrou que a dímeria ocorre devido a perda da sépala adaxial mediana, de uma das pétalas laterais, de um estame lateral e de um carpelo mediano (Silva et al. 2016). Mais recentemente, através da análise do desenvolvimento do cálice e da corola das flores pistiladas de *E. redactum*, conclui-se que ocorrem dois tipos de redução nas flores da família: a supressão ou a perda total do verticilo (Sokoloff et al. 2020). Através da estrutura floral de *Mesanthemum radicans*, Silva et al. (2021) concluíram que a presença de três traços de feixes vasculares nas peças florais é característica diagnóstica para o gênero, pois nas demais Eriocaulaceae ocorre apenas um.

As sementes de Eriocaulaceae foram descritas como glabras e pilosas com tricomas dispostos em fileiras longitudinais por Koernicke (1863). Estudo envolvendo sementes dos diferentes gêneros da família foi realizado por Giulietti et al. (1986) caracterizando a superfície do envoltório. No ano seguinte foi apresentada uma chave de identificação baseada nas características das sementes de *Eriocaulon* por Nair (1987). Na década seguinte, Stützel (1998) apresentou dados

do tegumento das sementes, cujas ornamentações são provenientes do grau de espessamento das paredes anticlinais das células da camada interna do tegumento externo.

Posteriormente Zona et al. (2012) apresentaram a caracterização das sementes de *Eriocaulon*, *Lachnocaulon* e *Syngonanthus* da América do Norte. Estudos envolvendo implicações taxonômicas e filogenéticas foram realizados por Barreto et al. (2013) com espécies de *Comanthera*. Ainda em *Comanthera*, naquelas espécies ameaçadas de extinção, o estudo do tegumento das sementes das espécies pertencentes ao clado *Comanthera magnifica* de *C. subg. Comanthera*, auxiliou na identificação das mesmas (Corredor et al. 2015).

Estudos sobre o desenvolvimento pós-seminal em Eriocaulaceae mostraram uniformidade entre os representantes dos diferentes gêneros, tais como, dependência de luz direta para a germinação, raiz primária abortiva, emissão de eixo embrionário durante o deslocamento do opérculo, desenvolvimento de colar de rizóides na extremidade do eixo embrionário, desenvolvimento da primeira folha e posteriormente das raízes adventícias (Hare 1950; Ramaswamy et al. 1981; Scatena et al. 1993; Corredor et al. 2015).

A escolha de Leiothrix para o desenvolvimento da tese

Com todas as informações sobre as Eriocaulaceae disponibilizadas na literatura até então, decidiu-se trabalhar com morfologia e anatomia de seus representantes por ser um grupo de grande potencial científico e econômico, de ocorrência nos campos rupestres brasileiros (MG e BA). Dentre as Eriocaulaceae, optou-se por estudar *Leiothrix*, por ser um grupo com escassos estudos anatômicos, apresentar ampla distribuição na América do Sul, ter várias espécies endêmicas do Brasil, e também por ser um grupo ainda em estudo na sua sistemática, desenvolvido pela Dra. Ana Maria Giulietti Harley que, portanto, necessitava de novos dados.

Para entender melhor a morfologia e a anatomia de *Leiothrix* escolheu-se estudar:

1. Anatomia e desenvolvimento floral de *Leiothrix*, buscando compreender a origem e as diferenças no comprimento dos ramos nectaríferos e estigmáticos das flores pistiladas, bem como as diferenças no fusionamento da corola das flores estaminadas;

2. Morfologia das sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Leiothrix*, buscando entender as variações existentes no envoltório seminal e sua importância taxonômica e ecológica, assim como, verificar a existência de um padrão no desenvolvimento pós-seminal em Eriocaulaceae;
3. Anatomia de folhas e escapos de espécies de *Leiothrix*, afim de levantar caracteres que possam contribuir na classificação infragenérica e na compreensão da relação das estruturas encontradas com o ambiente em que as espécies ocorrem.

Esses estudos estão aqui apresentados na forma de três capítulos respectivamente, que procuram entender a planta como um todo, buscando dados dos órgãos vegetativos e reprodutivos de *Leiothrix*, uma vez que esse modelo de tese permite fazer essa abordagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves P.G.M., Scatena V.L. & Trovó M. 2013. Anatomy of scapes, bracts, and leaves of *Paepalanthus* sect. *Diphyomene* (Eriocaulaceae, Poales) and its taxonomic implications. *Brittonia* 65: 262-272.
- Andrade M.J.G., Giulietti A.M., Rapini A., Queiroz L.P., Conceição A.S., Almeida P.R.M. & van den Berg C. 2010. A comprehensive phylogenetic analysis of Eriocaulaceae: evidence from nuclear (ITS) and plastid (psbA-trnH and trnL-F) DNA sequences. *Taxon* 59(2): 379-388.
- APG. 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 85: 531-553.
- Barreto L., Echternacht L. & García Q.S. 2013. Seed coat sculpture in *Comanthera* (Eriocaulaceae) and its implications on taxonomy and phylogenetics. *Plant Syst. Evol.* 299: 1461-1469.
- Begum M. 1968. Embryological studies in *Eriocaulon quinquangulare* L. *Proc. Indian Acad. Sci.* 67(4): 148-156.
- Bongard M. 1831. Essai monographique sur les espèces d'Eriocaulon du Brésil. *Bull. Acad. Imp. Sci. Saint-Petersbourg* 6: 601-655.
- Castro N.M. & Menezes N.L. 1995. Aspectos da anatomia foliar de algumas espécies de *Paepalanthus* Kunth, Eriocaulaceae da Serra do Cipó (Minas Gerais). *Acta Bot. Bras.* 9(2): 213-229.
- Coan A.I., Scatena V.L. & Giulietti A.M. 2002. Anatomia de algumas espécies aquáticas de Eriocaulaceae brasileiras. *Acta Bot. Bras.* 16: 371-384.
- Corredor B.A.D., Escobar D.F.E. & Scatena V.L. 2015. Morfología de semillas y desarrollo post-seminal de especies de *Comanthera* (Eriocaulaceae). *Rev. Biol. Trop.* 63(4): 1127-1135.
- Desvaux N.A. 1828. Observations sur quelques familles de plantes monocotyledones, d'apres les manuscrits de feu le Baron Palisot de Beauvois. *Ann. Sci. Nat.* 13: 37-52.

- Echternacht L., Sano P.T., Bonillo C., Cruaud C., Coulou A. & Dubuisson J.Y. 2014. Phylogeny and taxonomy of *Syngonanthus* and *Comanthera* (Eriocaulaceae): evidence from expanded sampling. *Taxon* 63(1): 47-63.
- Giulietti A.M. 1978. Os gêneros *Eriocaulon* L. e *Leiothrix* Ruhl. (Eriocaulaceae) na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências, Univ. de São Paulo.
- Giulietti A.M. 1984. Estudos taxonômicos no gênero *Leiothrix* Ruhl. (Eriocaulaceae). Tese de Livre-Docência - Instituto de Biociências, Univ. de São Paulo.
- Giulietti A.M. 2020. An annotated synopsis of *Leiothrix* (Eriocaulaceae) with additional nomenclatural notes. *Phytotaxa* 477(2): 102-150.
- Giulietti A.M., Monteiro W.R., Mayo S.J. & Stephens J. 1986. A preliminary survey of testa sculpture in Eriocaulaceae. *Beitr. Biol. Pflanzen*. 62: 189-209.
- Giulietti N., Giulietti A.M., Pirani J.R. & Menezes N.L. 1988. Estudos em sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 1: 179-193.
- Giulietti A.M., Amaral M.C.E. & Bittrich V. 1995. Phylogenetic analysis of inter- and infrageneric relationships of *Leiothrix* Ruhland (Eriocaulaceae). *Kew Bull.* 50: 55-71.
- Giulietti A.M., Scatena V.L. & Cardoso V.A. 1998. Anatomia de escapos e de folhas e sua aplicação à taxonomia de *Leiothrix flavesces* (Bong.) Ruhl. S.L. (Eriocaulaceae). *Sitientibus* 18: 31-49.
- Giulietti A.M., Andrade M.J.G., Scatena V.L., Trovó M., Coan A.I., Sano P.T., Santos F.A.R., Borges R.L.B. & van den Berg C. 2012. Molecular phylogeny, morphology and their implications for the taxonomy of Eriocaulaceae. *Rodriguésia* 63(1): 1-19.
- Hare C.L. 1950. The structure and development of *Eriocaulon septangulare* With. *J. Linn. Soc. Bot.* 53: 422-448.

- Hensold N. & Giulietti A.M. 1991. Revision and redefiniyion of the genus *Rondonanthus* Herzog (Eriocaulaceae). *Ann. Mo. Bot. Gard.* 78: 441-459.
- Holm T. 1901. *Eriocaulon decangulare* L. An anatomical study. *Bot. Gaz.* 31: 17-39.
- Körnigke F. 1854. Eriocaulacearum Monographiae Supplementum. *Linnaea* 561-692.
- Körnigke F. 1863. Eriocaulaceae. In: Martius K.F.P., Eichler A.G., Urban N.I. eds. *Flora Brasiliensis*, vol. 3(1). Munich: Typographi Regia, 273-508.
- Kunth C.S. 1841. Eriocaulaceae. In: *Enumeratio plantarum*, vol 3. Stuttgart: J.G. Cotta, 492-580.
- Linneus C. 1753. *Species Plantarum*, vol. 1, 87.
- Malmache L.A. 1919. Contribution à l'étude anatomique des Eriocaulacées et des familles voisines. Restiacées, Centrolepidacées, Xyridacées, Philydracées, Mayacacées. Thesis, St. Cloud, Paris.
- Martius C.F.P. 1835. Die Eriocaulaceae als selbständige Pflanzen-Familie, aufgestellt und erläutert. *Nova Acta Physico-Med.* 17: 1-72.
- MMA. 2014. Ministério do Meio Ambiente. Lista nacional oficial de espécies da flora ameaçada de extinção. Portaria: 442.
- Monteiro W.R., Giulietti A.M. & Castro M.M. 1984. Aspects of leaf structure of some species of *Eriocaulon* L. (Eriocaulaceae) from Serra do Cipó (Minas Gerais, Brazil). *Rev. Bras. Bot.* 7: 137-147.
- Monteiro W.R., Giulietti A.M. & Castro M.M. 1985. Aspects of leaf structure of some species of *Leiothrix* Ruhl. (Eriocaulaceae) from Serra do Cipó (Minas Gerais, Brazil). *Rev. Bras. Bot.* 8: 109-125.
- Nair R.V. 1987. Taxonomic significance of seed coat morphology in *Eriocaulon* Linn. (Eriocaulaceae). *Seed Sci. Techn.* 15: 297-310.

- Oliveira F.M.G. & Oriani A. 2016. Anatomical characterization of vegetative organs and scapes of *Rondonanthus* (Eriocaulaceae, Poales). Braz. J. Bot. 39: 1103-1115.
- Oriani A., Scatena V.L. & Sano P.T. 2005. Anatomia das folhas, brácteas e escapos de *Actinocephalus* (Koern.) Sano (Eriocaulaceae). Rev. Bras. Bot. 28: 229-240.
- Poulsen V.A. 1888. Anatomiske studien over Eriocaulaceerne. Vidensk. Meddel. Dansk. Naturhistorisk. Foren 4: 221-386.
- Ramaswamy S. N., Swamy B. G. L. & Arekal G. D. 1981. From zygote to seedling in *Eriocaulon robusto-brownianum* (Eriocaulaceae). Beitr. Biol. Pflanzen 55: 179-188.
- Rosa M.M. & Scatena V.L. 2003. Floral anatomy of *Eriocaulon elichrysoides* and *Syngonanthus caulescens* (Eriocaulaceae). Flora 198: 188-199.
- Rosa M.M. & Scatena V.L. 2007. Floral anatomy of Paepalanthoideae (Eriocaulaceae, Poales) and their nectariferous structures. Ann. Bot. 99: 131-139.
- Ruhland W. 1903. Eriocaulaceae. In: Engler A. ed., Das Pflanzenreich, vol. 4(3). Leipzig: Wilhelm Engelmann, 1-294.
- Scatena V.L. & Menezes N.L. 1993. Considerações sobre a natureza da câmara subestomática e das células epidérmicas das folhas de *Syngonanthus* Ruhl., seção *Thysanocephalus* Koern. (Eriocaulaceae). Rev. Brasi. Bio. 16(2): 159-165.
- Scatena V.L. & Menezes N.L. 1996. Anatomia de escapos e folhas de *Syngonanthus* Ruhl (Eriocaulaceae). Rev. Brasi. Bio. 56(2): 317-332.
- Scatena V.L. & Giuliatti A.M. 1996. The taxonomy and morphological and anatomical differentiation of populations of *Leiothrix crassifolia* (Eriocaulaceae). Plant Syst. Evol. 199: 243-258.
- Scatena V.L. & Rosa M.M. 2001. Morphology and anatomy of the vegetative organs and scapes from *Aphorocaulon* (*Paepalanthus*, Eriocaulaceae). Braz. Arch. Biol. Tecnol. 44: 49-58.

- Scatena V.L., Menezes N.L. & Stützel T. 1993. Embriology and seedling development in *Syngonanthus rufipes* Silveira (Eriocaulaceae). Beitr. Biol. Pflanzen. 67: 333-343.
- Scatena V.L., Giuliatti A.M. & Cardoso V.A. 1998. Anatomia do escapo floral de espécies brasileiras de *Paepalanthus* subgênero *Platycaulon* (Eriocaulaceae). Acta Bot. Bras. 2: 121-133.
- Scatena V.L., Vich D.V. & Parra L.R. 2004. Anatomia de escapos, folhas e brácteas de *Syngonanthus* sect. *Eulepis* (Bong. ex Koern.) Ruhland (Eriocaulaceae). Acta Bot. Bras. 18(4): 825-837.
- Scatena V.L., Giuliatti A.M., Borba E.L. & van den Berg C. 2005. Anatomy of Brazilian Eriocaulaceae: correlation with taxonomy and habitat using multivariate analyses. Plant Syst. Evol. 253: 1-22.
- Silva D.M. 2014. Filogenia molecular de *Leiothrix* Ruhland (Eriocaulaceae) e implicações taxômicas, morfológicas e biogeográficas. Dissertação de Mestrado – Univer. Est. Feira de Santana.
- Silva A.L., Trovó M. & Coan A.I. 2016. Floral development and vascularization help to explain merism evolution in *Paepalanthus* (Eriocaulaceae, Poales). PeerJ 4: 1-28.
- Silva A.L., Stützel T., Trovó M. & Coan A.I. 2021. Floral structure of *Mesanthemum radicans* (Eriocaulaceae, Poales): morphological and anatomical novelties. S. Afr. J. Bot. 139: 306-317.
- Silveira A.A. 1928. Floralia Montium. v.1, Belo Horizonte: Imprensa Oficial.
- Smith R.W. 1910. The floral development and embryogeny of *E. septangulare*. Bot. Gaz. 49: 281-291.
- Sokoloff D.D., Yadav S.R., Chandore A.N. & Remizowa M.V. 2020. Stability despite reduction: flower structure, patterns of receptacle elongation and organ fusion in *Eriocaulon* (Eriocaulaceae: Poales). Plants 9: 1424.

- Splett S., Barthlott W., Stützel T. & Barros M.A.G. 1993. Leaf anatomy of Brazilian Eriocaulaceae and its diagnostic significance. *Flora* 188: 399-411.
- Stützel T. 1984. Blüten- und infloreszenzenmorphologische Untersuchungen zur Systematik der Eriocaulaceen, *Dissertationes Botanicae* vol. 71. J. Cramer, Berlin.
- Stützel T. 1985. Die Bedeutung monotheclat-bisporangiaten Antheren als systematisches Merkmal zur Gliederung der Eriocaulaceen. *Bot. Jahrb. Syst.* 105: 433-438.
- Stützel T. 1998 Eriocaulaceae. In: Kubitzki K. ed. *The families and genera of vascular plants IV - Flowering plants: monocotyledons - Alismatanae and Comelinanae (except Graminae)*. Berlin: Springer - Verlag, 197-207.
- Stützel T. & Gansser N. 1995. Floral morphology of North American Eriocaulaceae and its taxonomic implications. *Feddes Repert.* 106: 495-502
- Tomlinson P.B. 1969. Commelinales – Zingiberales. In: Metcalfe C.R. ed. *Anatomy of the Monocotyledons III*, vol. 3. Oxford: Clarendon Press, 1-446.
- Trovó M., Andrade M.J.G., Sano P.T., Ribeiro P.L. & van den Berg C. 2013. Molecular phylogenetics and biogeography of Neotropical Paepalanthoideae with emphasis on Brazilian *Paepalanthus* (Eriocaulaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 171: 225-243.
- Van Tieghem P. 1887. Structure de la racine et disposition des racinelles dans les Centrolepidees, Eriocaulées, Juncées, Mayacées et Xyridees. *J. Bot.* 20: 305-315.
- Zona S., Davis P., Gunatillake L.A.A.H., Prince J. & Horn J.W. 2012. Seeds of Eriocaulaceae of the United States and Canada. *Castanea* 77(1): 37-45.

CAPÍTULO 1: Desenvolvimento e vascularização floral de *Leiothrix* (Eriocaulaceae, Poales)¹

Manuscrito editado nas normas do '*Botanical Journal of the Linnean Society*'

RESUMO: *Leiothrix* diferencia-se dos demais gêneros de Eriocaulaceae por apresentar estilete com ramos nectaríferos e estigmáticos que se ramificam em diferentes alturas, e corola dialipétala ou gamopétala nas flores estaminadas. Visando compreender os processos ontogenéticos que resultam nessas diferenças, estudou-se o desenvolvimento e a vascularização floral de espécies do gênero. Nas flores pistiladas, os ramos nectaríferos, que ocupam posição carinal, correspondem ao ápice dos carpelos, enquanto os ramos estigmáticos, que ocupam posição comissural, se formam pelos tecidos marginais dos carpelos e se diferenciam depois que os ramos nectaríferos. Os tecidos marginais da porção mais apical dos carpelos se alongam dando continuidade ao estilete e quanto maior seu desenvolvimento, maior a distância entre os ramos estigmáticos e os ramos nectaríferos. Assim, as diferenças na altura dos ramos estigmáticos e ramos nectaríferos são resultado de heterocronia. Nas flores estaminadas a fusão das pétalas é pós-genital na porção mediana e apical e congênita na porção mais basal. Apesar das diferenças observadas no desenvolvimento, as flores de *Leiothrix* compartilham o mesmo padrão de vascularização, com um plexo vascular central do qual diverge um único traço para cada sépala, pétala e estame. Os estaminódios não são vascularizados. Os feixes carpelares dorsais irrigam os ramos nectaríferos, mas os feixes carpelares ventrais são reduzidos e não irrigam os óvulos e os estigmas, como também observado em outras espécies da família. As diferenças nas alturas dos ramos nectaríferos são provavelmente resultado de pressão seletiva exercida por diferentes grupos de insetos polinizadores. Nossa hipótese é a de que as espécies com ramos nectaríferos mais baixos e, portanto, menos acessíveis, sejam mais especialistas. A ausência de ramos nectaríferos em *L. angustifolia* indica perda secundária provavelmente associada à autopolinização.

PALAVRAS-CHAVE: flor – fusão pós-genital – gineceu – heterocronia – nectário.

INTRODUÇÃO

Eriocaulaceae apresenta 10 gêneros, que estão circunscritos em duas subfamílias: Eriocauloideae, com pétalas glandulosas e flores com 4-6 estames, compreendendo *Eriocaulon* L. e *Mesanthemum* Körn.; e Paepalanthoideae, com pétalas desprovidas de glândulas e flores com 2-3 estames, compreendendo *Actinocephalus* (Körn.) Sano, *Comanthera* L.B.Sm., *Lachnocaulon* Kunth, *Leiothrix* (Körn.) Ruhland, *Paepalanthus* Mart., *Rondonanthus* Herzog, *Syngonanthus* Ruhland e *Tonina* Aubl. (Ruhland, 1903; Giullietti *et al.*, 2012).

As flores de Eriocaulaceae são reunidas em inflorescências capituliformes e são diclamídeas, unissexuais, raramente bissexuais; geralmente trímeras, apesar de ocorrer algumas dímeras (Stützel, 1998; Giullietti *et al.*, 2012; Watanabe, Hensold & Sano, 2015; Silva, Trovó & Coan, 2016). Nas Paepalanthoideae o cálice e a corola são membranáceos, podendo estar ausentes ou na forma de tricomas; tanto as sépalas quanto as pétalas podem ser livres ou fusionadas entre si; o gineceu apresenta estilete ramificado em porções nectaríferas e estigmáticas que se separam na mesma altura ou em alturas diferentes, como em *Leiothrix*; e os estigmas podem ser simples ou bífidos (Ruhland, 1903; Stützel, 1998; Giullietti *et al.*, 2012).

Essas diferenças na morfologia floral são usadas na taxonomia da família para delimitação dos gêneros: *Eriocaulon* apresenta flores pistiladas com pétalas livres e estigmas simples; *Mesanthemum* têm flores pistiladas com pétalas fundidas na região mediana e estigmas bífidos; em Paepalanthoideae, as flores pistiladas têm pétalas livres em *Actinocephalus* e *Paepalanthus*, mas o primeiro distingue-se pelas inflorescências compostas; em *Comanthera* e *Syngonanthus* as pétalas das flores pistiladas são fusionadas na região mediana, mas em *Comanthera* as flores estaminadas têm corola fusionada até a região mediana e filetes livres, enquanto em *Syngonanthus* as flores estaminadas têm corola fusionada até acima da região mediana e filetes adnatos à corola; *Lachnocaulon* apresenta redução total da corola nas flores pistiladas e estaminadas; *Tonina* têm corola reduzida a tricomas nas flores pistiladas e nas estaminadas a corola é gamopétala; *Rondonanthus* difere dos demais gêneros por apresentar estaminódios lineares e, finalmente, *Leiothrix* por apresentar ramos nectaríferos e estigmáticos que saem em diferentes alturas do

estilete e corola dialipétala ou gamopétala nas flores estaminadas (Ruhland, 1903; Giulietti *et al.*, 2012).

Estudos com representantes de Paepalanthoideae mostram que as porções nectaríferas do estilete foram interpretadas como estigmas não-funcionais (Bongard, 1831), verticilo carpelar interno e estéril (Martius, 1834), apêndices (Koernicke, 1863; Ruhland, 1903; Stützel, 1998), nectários (Stützel, 1981; Stützel & Gansser, 1995), apêndices nectaríferos (Rosa & Scatena, 2003) e ramos nectaríferos (Silva, Trovó & Coan, 2016; Silva *et al.*, 2021). No estudo anatômico com flores de Paepalanthoideae, Rosa & Scatena (2007) descrevem que o estilete é oco e ramificado em porções nectaríferas e porções estigmáticas.

Através do desenvolvimento do gineceu em representantes de Paepalanthoideae verificou-se que os ramos nectaríferos têm origem carinal e os ramos estigmáticos têm origem comissural (Stützel & Gansser, 1995). As pétalas das flores estaminadas apresentam desenvolvimento tardio (Silva, Trovó & Coan, 2016). A vascularização das flores de Eriocaulaceae é reduzida, todos os feixes vasculares divergem de um plexo vascular central e, dentre todas as estruturas florais, apenas os estigmas não são vascularizados (Rosa & Scatena, 2003; 2007; Silva, Trovó & Coan, 2016; Silva *et al.*, 2021).

Leiothrix, que inclui 39 espécies (Giulietti 2020), foi descrito por Ruhland (1903) e caracterizado por apresentar estilete unido em uma coluna basal, com ramos nectaríferos e estigmáticos separados em diferentes alturas e presença de tricomas lisos nas flores. Dentre as características utilizadas por Ruhland (1903) para classificar os subgêneros está a presença da corola livre ou fusionada nas flores estaminadas. Mais de um século depois, *Leiothrix* foi revisado por Giulietti (2020), que ressaltou a presença de corola livre ou fusionada como caráter importante na delimitação dos subgêneros, juntamente com outros dados morfológicos e moleculares. Dos quatro subgêneros descritos por Ruhland (1903), *L. subg. Stephanophyllum* (Guill.) Ruhland foi mantido por Giulietti (2020) e se caracteriza por apresentar espécies pseudovivíparas e flores estaminadas com corola gamopétala. Os demais subgêneros propostos por Ruhland (1903) foram

reconhecidos em *L.* subg. *Leiothrix* Giul., cujas espécies não apresentam pseudoviviparidade e as flores estaminadas têm corola dialipétala ou gamopétala (Giulietti, 2020).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar o desenvolvimento e a vascularização das flores de *Leiothrix*, a fim de responder as seguintes questões: (1) Quais diferenças nos processos ontogenéticos explicam as diferentes alturas no posicionamento dos ramos nectaríferos e estigmáticos no estilete? (2) A fusão das pétalas nas flores estaminadas é congênita ou pós-genital? Com isso, buscamos contribuir para o entendimento de aspectos reprodutivos e evolutivos do gênero, além de contribuir para o conhecimento da morfologia floral da família como um todo, especialmente em relação ao gineceu.

MATERIAL E MÉTODOS

As espécies estudadas estão listadas na Tabela 1 e foram coletadas nos campos rupestres dos municípios de Rio de Contas (Bahia), Diamantina e Santana do Riacho (Minas Gerais), Brasil, com as devidas licenças de coleta. Os vouchers foram depositados no *Herbarium Rioclarense* (HRCB) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ (UNESP).

Capítulos contendo flores em diferentes fases de desenvolvimento foram fixados em FAA₅₀ e armazenados em etanol 70% (Johansen, 1940). Para análises anatômicas e estudo da vascularização, em microscopia de luz, capítulos e flores em antese isoladas foram submetidos ao processo de desidratação em série n-butílica (álcool normal butílico – NBA) e infiltração em historresina (Leica Historesin Embedding Kit), seguida de inclusão (Feder & O’Brien, 1968). O material incluído foi seccionado em micrótomo rotativo, com 7-8 µm de espessura. As seções anatômicas foram submetidas à coloração com Ácido Periódico - Reativo de Schiff (PAS) e Azul de Toluidina (Feder & O’Brien, 1968) e montadas em lâminas permanentes com Entellan (Merck). As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Leica DM 4000B equipado com um dispositivo de captura (Leica DFC 450) e software de digitalização de imagens (Leica Application Suite v.4.0.0).

Para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), flores em diferentes fases do desenvolvimento foram isoladas dos capítulos e dissecadas sob estereomicroscópio (Leica EZ4).

Também foram analisados capítulos inteiros, com flores em diferentes fases do desenvolvimento. Para tanto, o material foi desidratado em série etílica crescente (30%, 50%, 70%, 90%, 100%), secado ao ponto crítico (Balzers CPD030 Critical Point) e metalizado com ouro (Balzer 5 CDO 50 Sputter Coater). A documentação dos resultados foi feita por meio de imagens obtidas a partir do programa “TM 3000 Application Program”.

RESULTADOS

ONTOGENIA DA FLOR ESTAMINADA

As flores de *Leiothrix* são recobertas por brácteas (b) desde o início do seu desenvolvimento (Figs. 1A-B, D) até a maturidade. O cálice é o primeiro verticilo a emergir, com duas sépalas latero-abaxiais, que surgem como protuberâncias arredondadas, e uma sépala adaxial, que aparece como uma protuberância achatada (Fig. 1A). Seguido do cálice, surgem os primórdios pétala-estames, alternados com as sépalas (Fig. 1B), que subsequentemente sofrem uma constrição, formando as pétalas externamente e os estames em posição oposta (Fig. 1D, E). As sépalas se alargam (Fig. 1C, D) e se tornam triangulares, apresentando tricomas em início de desenvolvimento nos ápices (Fig. 1F). Posteriormente, as sépalas se alongam, fundidas congenitalmente na região basal (Fig. 1G-I). As anteras começam a se diferenciar, enquanto as pétalas permanecem sub-desenvolvidas (Fig. 1G, H). As sépalas então se sobrepõem sobre as peças florais mais internas (Fig. 1I), protegendo o androceu em desenvolvimento. Observa-se que as sépalas permanecem livres no ápice, até a região mediana, e fundidas na região basal (Figs. 1I, 2A-C).

As pétalas têm desenvolvimento tardio, permanecendo mais curtas que os estames, abaixo das anteras (Fig. 2D-F), sendo possível observar apenas o seu ápice quando não removemos as sépalas (Fig. 2A). As anteras se diferenciam e apresentam posição latrorsa (Fig. 2D, F-H). Internamente às anteras, a partir de uma protuberância arredondada (Fig. 1C-E), que posteriormente se torna triangular (Fig. 1F), diferencia-se o pistilódio, apresentando três estruturas em forma de taça, opostas aos estames e unidas entre si na porção basal (Fig. 2D-F). As pétalas então se alongam, juntamente com os filetes, sendo o filete do estame adaxial mais curto (Fig. 2G-I). As figuras 2G-H

mostram o desenvolvimento sequencial das pétalas de *L. flavescens* (Bong.) Ruhland. Nelas, é possível observar que as pétalas se alongam livres nas regiões apical e mediana (Fig. 2G) e unidas congenitalmente na região basal (Fig. 2H). A fusão das regiões apical e mediana é pós-genital, pela união das margens (Fig. 2I-J). Em *L. angustifolia* (Körn.) Ruhland e *L. vivipara* (Bong.) Ruhland o mesmo ocorre: as pétalas jovens são livres entres si (Figs. 3A-C, 4A) e têm desenvolvimento tardio, alongando-se apenas após a diferenciação dos estames e do pistilódio. Elas se alongam livres entre si na região apical e unidas congenitalmente na região basal (Fig. 3D-G). A fusão da região mediana é pós-genital (Figs. 3H-I, 4B-C). Na antese, os filetes se alongam elevando as anteras acima do tubo floral (Fig. 3J-K). As estruturas em forma de taça do pistilódio também passam a apresentar células papilosas no ápice (Figs. 3J-K, 4D-G) e podem se alongar muito (Figs. 3K, 4D), ou pouco (Fig. 4E). A altura do pistilódio em relação aos estames está indicada na Tabela 2. Em *L. angustifolia*, o pistilódio não se alonga (Fig. 4F-G).

ONTOGENIA DA FLOR PISTILADA

O desenvolvimento inicial das flores pistiladas de *Leiothrix* é semelhante ao das flores estaminadas. Os meristemas florais são arredondados a triangulares, protegidos pelas brácteas florais (Fig. 5A). O cálice é o primeiro verticilo a emergir, com duas sépalas latero-abaxiais e uma sépala adaxial (Fig. 5B). Após o cálice, iniciam-se as pétalas e os estames, ambos em posição alterna a das sépalas (Fig. 5C-G, J).

Posteriormente iniciam-se os três carpelos, como três protuberâncias alargadas e fundidas congenitalmente, ao redor de um domo central (Figs. 5H, 6A). Com o início do desenvolvimento do gineceu, os estames abortam o desenvolvimento, tornando-se estaminódios (Fig. 6A-B). Os estaminódios são então reduzidos na flor em antese, escamiformes (Fig. 6K, 7G, 8E-G, 9G, J, 10A). Os septos dos carpelos são evidentes no início do desenvolvimento do gineceu (Figs. 5H, 6B), sendo que suas margens fundidas formam o domo central. As partes dorsal e laterais dos carpelos se alongam ao redor do domo central formando a parede do ovário (Figs. 5H, 6C). No ápice de cada carpelo diferencia-se um ramo nectarífero, como uma protuberância cilíndrica e, subsequentemente,

iniciam-se os ramos estigmáticos, também como três protuberâncias cilíndricas, alternas aos ramos nectaríferos, nas regiões comissurais dos carpelos (Fig. 5K-L).

Em *L. angustifolia* os ramos nectaríferos não se formam, apenas os ramos estigmáticos se desenvolvem nas regiões comissurais dos carpelos (Fig. 6D-H). A formação de ramos nectaríferos foi observada em apenas um dos exemplares analisados dessa espécie (Fig. 6K). Os ramos estigmáticos se alongam logo após sua iniciação, sendo revestidos por células papilosas (Fig. 6I-J). Posteriormente, o estilete também se alonga por crescimento intercalar (Fig. 6J-L).

Nas demais espécies estudadas, os ramos nectaríferos se desenvolvem, assumindo formato de taça logo no início de seu desenvolvimento (Figs. 7A, 8A, 10A-B). Em *L. curvifolia* (Bong.) Ruhland (Fig. 7), *L. flavescens* (Fig. 8) e *L. fluitans* Mart. Ruhland (Fig. 10), os tecidos marginais no ápice dos carpelos se unem logo abaixo dos ramos estigmáticos já iniciados (Fig. 7B-D) e se alongam fundidos congenitalmente (Figs. 7E-F, H, 8B-F), dando continuidade ao estilete e elevando os ramos estigmáticos acima do nível dos ramos nectaríferos (Figs. 7I, 8G). Observa-se que quanto maior o desenvolvimento dos tecidos marginais dos carpelos, maior a distância entre os ramos nectaríferos e os ramos estigmáticos. Em *L. vivipara* e *L. flagellaris* (Bong.) Ruhland esse alongamento é mínimo (Fig. 9C-D), de forma que os ramos nectaríferos se inserem no estilete quase que na mesma altura que os ramos estigmáticos (Fig. 9E-F, H-I). A porção mais basal do estilete, abaixo do ponto de inserção dos ramos nectaríferos, também se alonga por crescimento intercalar (Figs. 7E, 8C, E-G, 9E, H, 10A). A altura da inserção dos ramos nectaríferos no estilete nas diferentes espécies estudadas está indicada na Tabela 2. Concomitantemente ao crescimento do estilete, os ramos nectaríferos e estigmáticos também se alongam (Figs. 7E-F, H, 8C-F, 9E-F, H-I, 10A). Na flor em pré-antese, os ramos nectaríferos apresentam células alongadas no ápice, enquanto os ramos estigmáticos são completamente revestidos por células papilosas (Figs. 8D-G, 9H-I). Na flor pós-antese observamos muitos grãos de pólen germinando nos ramos estigmáticos e nenhum grão de pólen aderido aos ramos nectaríferos (Fig. 10B-C).

As espécies de *Leiothrix* apresentam o mesmo padrão de vascularização floral, com um único feixe vascular colateral nas peças florais (Figs. 11-16).

Nas flores estaminadas, o receptáculo apresenta um plexo vascular central (Figs. 11A, 12A, 13A), de onde divergem todos os traços vasculares. Primeiramente, três traços vasculares divergem para as sépalas (Figs. 11A, 12A-B, 13B), seguidos de outros três traços vasculares que divergem alternadamente aos primeiros e que correspondem aos complexos pétala-estame (Figs. 11B, 12C, 13B-C). Cada um dos complexos pétala-estame se divide em dois feixes vasculares opostos um ao outro, formando os feixes vasculares das pétalas e dos estames (Figs. 11C-D, 12D-E, 13D-F). O restante do plexo vascular central se divide em três feixes vasculares opostos às sépalas, que vascularizam o pistilódio (Figs. 11C-E, 12D-E, 13D-F). O feixe vascular que irriga o estame ascende até o conectivo (Figs. 11F, 12F, 13G).

Nas flores pistiladas, no receptáculo, observa-se um plexo vascular central (Figs. 14A, 15A), do qual divergem os traços de todas as peças florais (Figs. 14B-J, 15B-J, 16A-H). Os primeiros a divergir são os traços das sépalas, extremamente reduzidos (Fig. 14B-C, 15B), seguidos dos traços das pétalas, que se separam alternadamente às sépalas (Figs. 14C, 15C). Cada sépala e cada pétala recebe apenas um traço vascular. Os estaminódios se separam junto com as pétalas, opostos a elas (Figs. 14D, 15C, 16A) e, apesar de apresentarem aspecto de estrutura secretora, não são vascularizados (Figs. 14E-F, 15D, 16C).

Os feixes vasculares dos carpelos se ramificam logo após a separação das pétalas (Figs. 14E-F, 15D, 16C). Três feixes carpelares dorsais alternos aos feixes das pétalas, vascularizam a parede do ovário (Figs. 14F, 15D, 16C) e ascendem pelo estilete (Figs. 14G-H, 15E-F, 16D-E) até os ramos nectaríferos (Figs. 15F-G, 16F), exceto em *L. angustilofia*, na qual esses últimos são ausentes (Fig. 14H-I). O estilete é triangular e oco, revestido internamente pelo tecido transmissor do tubo polínico (Figs. 14G, 15F-G, 16F). Em *L. angustifolia*, única espécie que não apresenta ramos nectaríferos, os feixes carpelares dorsais ascendem até o ápice do estilete, terminando antes da ramificação dos estigmas (Fig. 14G-I). Em *L. flavescens* (Fig. 15F-I) e *L. vivipara* (Fig. 16F-G), os feixes carpelares dorsais ascendem até os ramos nectaríferos, em até 1/2 da sua extensão. Em *L.*

flavescens, os ramos nectaríferos, que têm forma de taça, são ocos na região central (Fig. 15I), enquanto que em *L. vivipara* os ramos nectaríferos são cilíndricos e sólidos (Fig. 16G). Os ramos estigmáticos, que são cilíndricos e mais estreitos, não são vascularizados (Figs. 14I-J, 15H-J, 16H).

DISCUSSÃO

A presença de ramos nectaríferos e ramos estigmáticos em *Leiothrix*, assim como nos demais gêneros de Paepalanthoideae, é uma das principais características que distingue essa subfamília de Eriocauloideae (Ruhland, 1903; Giulietti *et al.*, 2012). A ausência dos ramos nectaríferos e presença dos ramos estigmáticos na posição carinal dos carpelos em Eriocauloideae é a condição ancestral na família (Stützel & Gansser, 1995).

A distância que os ramos nectaríferos ocupam em relação aos ramos estigmáticos é variável nas espécies de *Leiothrix*. Observou-se que as diferenças no tamanho da porção do estilete que eleva os ramos nectaríferos ocorrem devido ao menor ou maior desenvolvimento dos tecidos marginais na região apical dos carpelos. Como as alterações no desenvolvimento das estruturas florais, considerando tempo de desenvolvimento e tamanho dos órgãos, ainda que sutis, podem exercer pressões na evolução da morfologia floral (Ronse De Craene, 2018; 2021; Vasconcelos *et al.*, 2018), acredita-se que em *Leiothrix*, essas diferenças possam indicar a ocorrência de processos heterocrônicos na evolução dessas estruturas, como já descrito para outras espécies de angiospermas (Li & Johnston, 2000; Buendia-Monreal & Gillmor, 2018; Vasconcelos *et al.*, 2018; Ronse De Craene, 2021). Em Caryophyllales, foi demonstrado recentemente que processos heterocrônicos influenciam na diversidade morfológica do gineceu (Ronse De Craene, 2021). Entende-se por heterocronia mudanças no tempo de surgimento e na taxa de desenvolvimento de estruturas, sendo essa a maior causa de modificações ontogenéticas durante a evolução (Li & Johnston, 2000). Considerando que em *L. flagellaris* e em *L. vivipara* os ramos nectaríferos e os ramos estigmáticos se inserem quase que na mesma altura, no ápice do estilete, como nos demais gêneros da família, e que ambas as espécies pertencem à *L.* subg. *Stephanophyllum*, acredita-se que processos heterocrônicos levando a mudanças na posição dos ramos nectaríferos tenham ocorrido

no ancestral de *L.* subg. *Leiothrix*, de acordo a hipótese filogenética e classificação mais recente do gênero (Giulietti, 2020).

Os ramos nectaríferos nas espécies estudadas se originam na posição carinal, assim como nas demais espécies de Paepalanthoideae já estudadas (Stützel & Gansser, 1995; Rosa & Scatena, 2007; Silva, Trovó & Coan, 2016) e são vascularizados pelos feixes carpelares dorsais. A presença de vascularização nos ramos nectaríferos, somada à epiderme papilosa, em que o néctar é liberado para o exterior, se encaixa na definição de nectário apresentada por Nepi (2007). Dentre as Poales estudadas até o momento, apenas Xyridaceae e Eriocaulaceae apresentam nectários associados ao gineceu (Linder & Rudall, 2005; Oriani & Scatena, 2012). Nas demais famílias da ordem, ou eles não ocorrem, ou são nectários septais, como em Bromeliaceae e Rapateaceae (Linder & Rudall, 2005). Apesar do desenvolvimento dos apêndices nectaríferos do estilete em Xyridaceae se dar de forma semelhante ao que descrevemos aqui para Eriocaulaceae (Stützel, 1990), em Xyridaceae os feixes carpelares dorsais se ramificam para vascularizar o estigma e a otimização desse caráter na árvore filogenética de Poales mostra que ele provavelmente teve origens independentes nessas famílias (Sajo *et al.*, 2017).

Dentre as espécies estudadas, apenas em *L. angustifolia* os ramos nectaríferos não se desenvolvem, porém a perda dessas estruturas não foi acompanhada pela perda da vascularização, uma vez que também nessa espécie os feixes carpelares dorsais ascendem a parede do ovário. A ausência de ramos nectaríferos já foi relatada também em outras espécies de Paepalanthoideae, como *Syngonanthus flavidulus* (Stützel & Gansser, 1995), e resulta provavelmente de perda secundária, evidenciada pela vascularização.

A relação do néctar com a polinização por insetos em Eriocaulaceae foi comprovada em *Syngonanthus elegans* (= *Comanthera elegantula*) (Oriani, Sano & Scatena, 2009) e em *Paepalanthus lundii* (Del Claro *et al.*, 2019). Polinização por insetos também foi demonstrada em *Eriocaulon parkeri* (Sawyer, Mertins & Schuster, 2005), *S. mucugensis* e *S. curralensis* (Ramos, Borba & Funch, 2005), sendo todas espécies generalistas, polinizadas por pequenos insetos de

diferentes ordens, incluindo: Diptera, Hymenoptera e Coleoptera (Ramos, Borba & Funch, 2005; Sawyer, Mertins & Schuster, 2005; Oriani, Sano & Scatena, 2009; Del Claro *et al.*, 2019).

Para *Leiothrix*, ainda não há estudos sobre a biologia da polinização, porém, dada a presença de nectários tanto nas flores estaminadas como nas flores pistiladas, acredita-se que também nas espécies estudadas, com exceção de *L. angustifolia*, a polinização seja realizada por diversos pequenos insetos e que as diferentes alturas entre os ramos nectaríferos e estigmáticos sejam resultado da pressão seletiva exercida pelos polinizadores. Nossa hipótese é a de que as espécies com ramos nectaríferos localizados mais abaixo no estilete sejam mais especialistas, uma vez que o néctar nessas flores fica disponível apenas para aqueles insetos com aparato sugador mais longo. Já nas espécies em que os ramos nectaríferos se localizam na região apical do estilete, na mesma altura que os estigmas, o néctar fica mais acessível, podendo ser consumido por insetos com aparato sugador mais curto ou mastigador, como é o caso dos coleópteros e das formigas. Ressalta-se que nessas espécies o néctar é mais acessível também nas flores estaminadas, uma vez que o pistilódio é mais desenvolvido, com estruturas nectaríferas mais elevadas (Tabela 2), o que reforça nossa hipótese.

A ausência de ramos nectaríferos na flor adulta de *L. angustifolia*, como resultado de perda secundária, pode indicar anemofilia, como ocorre em outras espécies de Poales (Linder & Rudall, 2005), ou até mesmo pode indicar autopolinização, conforme registrado em outras espécies de Eriocaulaceae (Ramos, Borba & Funch, 2005; Sawyer, Mertins & Schuster, 2005; Oriani, Sano & Scatena, 2009). Como *L. angustifolia* é uma espécie anual, que floresce no período chuvoso e tem distribuição restrita, crescendo em ambientes úmidos, próximos a córregos na região da Chapada Diamantina, na Bahia (Giulietti, 1984; Mascarenhas, Giulietti & Scatena, 2020), é mais provável que se reproduza por autopolinização, tornando a ausência dos ramos nectaríferos mais vantajosa, uma vez que significa menor investimento energético.

Com relação aos ramos estigmáticos, chama a atenção o fato dessas estruturas não serem vascularizadas. Dentre as Poales, apenas Eriocaulaceae, Joinvilleaceae e Flagellariaceae não apresentam estigmas vascularizados (Rosa & Scatena, 2007; Sajo & Rudall, 2012). Uma possível

interpretação para esse fato é que, como essas famílias apresentam representantes de tamanho reduzido e flores pequenas, suas flores apresentam estigmas com menor área de adesão para o pólen e com isso menor tempo de receptividade (Heslop-Harrison, 2000).

Nas Poales, apenas Eriocaulaceae e Cyperaceae apresentam mudança na posição dos estigmas. Nas Cyperaceae, Reynders *et al.* (2012) atribuem essa mudança à perda da natureza carpelar do gineceu. De acordo com os autores, o desenvolvimento do gineceu a partir de um primórdio anular ao invés de primórdios carpelares individuais, combinada com o desenvolvimento bidirecional da vascularização, possibilitou o desenvolvimento do gineceu livre das restrições da organização carpelar, permitindo o desenvolvimento dos estigmas em outras posições. Em Eriocaulaceae, no entanto, a organização carpelar do gineceu é evidente desde o início do seu desenvolvimento, pela formação da zona sinascidiada. Dado que a auxina e a citocinina atuam como moduladores do desenvolvimento dos carpelos, como demonstrado em *Arabidopsis* (Deb, Bland & Ostergaard, 2018), sendo que a auxina promove a formação dos estigmas e a citocinina atua nos meristemas marginais dos carpelos (Marsch-Martínez *et al.*, 2012a, b; Marsch-Martínez & de Folter, 2016), é possível que diferenças no fluxo desses hormônios, bem como o desenvolvimento de estruturas nectaríferas e sua relação com os polinizadores, possam ter levado à mudança na posição dos estigmas para a região comissural em Paepalanthoideae ao longo da evolução da família.

Leiothrix é o único gênero da família que apresenta corola gamopétala ou dialipétala nas flores estaminadas (Ruhland, 1903; Giuliatti *et al.*, 2012). Na maioria dos gêneros da família, a corola das flores estaminadas é gamopétala, exceto em *Rondonanthus*, que apresenta corola dialipétala e *Lachnocaulon*, cuja corola é ausente (Ruhland, 1903; Giuliatti *et al.*, 2012).

Através do desenvolvimento do cálice e da corola das flores estaminadas de *Leiothrix*, demonstramos aqui pela primeira vez para Eriocaulaceae que ambos resultam da combinação de processos de fusão congenital (na parte basal das sépalas/pétalas) e pós-genital (nas partes mediana e apical), o que deve ocorrer também nos demais gêneros com sépalas/pétalas unidas. A porção fundida congenitalmente se desenvolve como resultado de crescimento intercalar logo abaixo das

porções livres, que se unem em menor ou maior extensão por fusão pós-genital, resultando nas diferentes morfologias do perianto encontradas na família.

A revisão sobre os tipos de fusão entre órgãos florais realizada por Sokoloff *et al.* (2018) mostra que a fusão pode ser tanto congenital como pós-genital, sendo esta última perfeita ou imperfeita. O que observamos na porção distal das sépalas e pétalas de *Leiothrix* parece se encaixar no tipo considerada fusão pós-genital perfeita por Sokoloff *et al.* (2018), uma vez que essa fusão ocorre por aproximação das células epidérmicas que não apresentam tricomas e nem secreções e a corola permanece fundida mesmo pós-antese.

Como em *Leiothrix* as pétalas podem ou não ser fundidas, enquanto as sépalas são sempre fundidas, acreditamos que o grau de fusão do cálice tem relação com a altura do pistilódio, sendo que quanto mais alongado o pistilódio, maior o grau de fusão das sépalas, que formam um tubo, juntamente com as pétalas, para o acúmulo do néctar.

Ressaltamos por fim que, em *Leiothrix*, assim como nas demais Eriocaulaceae já estudadas, o tamanho diminuto das flores reflete também na redução da vascularização (tanto com relação ao número de feixes vasculares, quanto ao número de elementos condutores) (Rosa & Scatena, 2003; 2007; Silva, Trovó & Coan, 2016; Silva *et al.*, 2021). Apesar de ser comum para Eriocaulaceae apenas um feixe vascular em cada órgão do perianto, Silva *et al.* (2021) reportaram para *Mesanthemum* três feixes vasculares em cada pétala, característica diagnóstica do gênero. Em *Leiothrix*, a redução do mesofilo das sépalas e pétalas, assim como a redução da vascularização é marcante e semelhante às demais espécies da família já estudadas (Rosa & Scatena, 2003; 2007; Silva, Trovó & Coan, 2016). Os estaminódios das flores pistiladas, que são vascularizados e provavelmente exercem função na polinização em *Rondonanthus* (Oriani *et al.*, dados não publicados), não são vascularizados em *Leiothrix*, mas apresentam características anatômicas de estruturas secretoras e podem ser funcionais, atuando como osmóforos, por exemplo.

CONCLUSÕES

O desenvolvimento das flores pistiladas e estaminadas de *Leiosthrix* seguem o mesmo padrão que as demais Eriocaulaceae, divergindo apenas no desenvolvimento do estilete das flores pistiladas e nos tipos de fusionamento da corola das flores estaminadas. Diferenças morfológicas no gineceu ocorre por processos heterocrônicos, que resultam nas diferentes alturas em que os ramos nectaríferos e estigmáticos se inserem no estilete. Essas diferenças podem estar relacionadas a sistemas de polinização mais ou menos generalistas, hipótese que poderá ser confirmada com estudos de biologia reprodutiva. A fusão das sépalas e pétalas das flores estaminadas resulta tanto de fusão congenital (região basal) como pós-genital (regiões mediana e apical) e pode ter relação com a altura do pistilódio nectarífero, formando um tubo para o acúmulo do néctar.

REFERÊNCIAS

- Bongard M.** 1831. Essai monographique sur les espèces d'*Eriocaulon* du Brésil. *Mémoires de l'Académie impériale des sciences de St.-Petersbourg, Série 6* **5**: 601–655.
- Buendía-Monreal M, Gillmor CS.** 2018. The times they are a–changin’: heterochrony in plant development and evolution. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1–8.
- Deb J, Bland HM, Ostergaard L.** 2018. Developmental cartography: coordination via hormonal and genetic interactions during gynoecium formation. *Current Opinion in Plant Biology* **41**: 54–60.
- Del-Claro K, Rodriguez-Morales D, Calixto ES, Martins AS, Torezan-Silingardi HM.** 2019. Ant pollination of *Paepalanthus lundii* (Eriocaulaceae) in Brazilian savanna. *Annals of Botany* **123**: 1159–1165.
- Feder N, O’Brien T.** 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* **55**: 123–142.
- Giulietti AM.** 1984. Estudos taxonômicos no gênero *Leiosthrix* Ruhl. (Eriocaulaceae). Tese de Livre-Docência, Universidade de São Paulo.
- Giulietti AM.** 2020. An annotated synopsis of *Leiosthrix* (Eriocaulaceae) with additional nomenclatural notes. *Phytotaxa* **477(2)**: 102–150.

- Giulietti AM, Andrade MJG, Scatena VL, Trovó M, Coan AI, Sano PT, Santos FAR, Borges RLB, van Den Berg C. 2012. Molecular phylogeny, morphology and their implications for the taxonomy of Eriocaulaceae. *Rodriguésia* **63**(1): 1–19.
- Heslop-Harrison Y. 2000. Control gates and micro-ecology: The pollen-stigma Interaction in perspective. *Annals of Botany* **85**: 5–13.
- Johansen DA. 1940. *Plant Microtechnique*. New York: McGraw–Hill Co.
- Koernicke F. 1863. Eriocaulaceae. In: Martius KFP, Eichler AW, eds. *Flora brasiliensis*, vol. 3(1). Munich: Typographia Regia, 273–508.
- Li P, Johnston MO. 2000. Heterochrony in plant evolutionary studies through the twentieth century. *The Botanical Review* **66**: 57–88.
- Linder HP, Rudall PJ. 2005. Evolutionary history of Poales. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **36**: 107–124.
- Marsch-Martínez N, de Folter S. 2016. Hormonal control of the development of the gynoecium. *Current Opinion in Plant Biology* **29**: 104–114.
- Marsch-Martinez N, Reyes-Olalde JI, Ramos-Cruz D, Lozano-Sotomayor P, Zuniga-Mayo VM, de Folter S. 2012a. Hormones talking: does hormonal crosstalk shape the *Arabidopsis* gynoecium? *Plant Signaling and Behaviour* **7**(12): 1698–1701.
- Marsch-Martinez N, Ramos-Cruz D, Reyes-Olalde J, Lozano-Sotomayor J, Zúñiga-Mayo VM, de Folter S. 2012b. The role of cytokinin during *Arabidopsis* gynoecium and fruit morphogenesis and patterning. *Plant Journal* **72**: 222–234.
- Martius CFP. 1834. Die Eriocaulaceae als selbstständige Pflanzenfamilie aufgestellt und erläutert. *Annales des Sciences Naturelles Botanique* **2**(2): 25–43.
- Mascarenhas AAS, Giulietti-Harley AM, Scatena VL. 2020. Leaf and scape anatomy of *Leiothrix* Ruhland (Eriocaulaceae) from a taxonomic and ecological perspective. *Flora* **262**: 1–10.
- Nepi M. 2007. Nectary structure and ultrastructure. In: Nicolson SW, Nepi M, Pacini E, eds. *Nectaries and Nectar*. Netherlands: Springer, 129–157.

- Oriani A, Sano PT, Scatena VL. 2009. Pollination biology of *Syngonanthus elegans* (Eriocaulaceae_Poales). *Australian Journal of Botany* **57**: 94–105.
- Oriani A, Scatena VL. 2012. Floral anatomy of xyrids (Poales): contributions to their reproductive biology, taxonomy, and phylogeny. *International Journal of Plant Sciences* **173**: 767–779.
- Ramos COC, Borba EL, Funch LS. 2005. Pollination in Brazilian *Syngonanthus* (Eriocaulaceae) species: evidence for entomophily instead of anemophily. *Annals of Botany* **96**: 387–397.
- Reynders M, Vrijdaghs A, Larridon I, Huygh W, Leroux O, Muthama Muasya A, Goetghebeur P. 2012. Gynoecial anatomy and development in Cyperoideae (Cyperaceae, Poales): congenital fusion of carpels facilitates evolutionary modifications in pistil structure. *Plant Ecology and Evolution* **145**(1): 96–125.
- Rosa MM, Scatena VL. 2003. Floral anatomy of *Eriocaulon elichrysoides* and *Syngonanthus caulescens* (Eriocaulaceae). *Flora* **198**: 188–199.
- Rosa MM, Scatena VL. 2007. Floral anatomy of Paepalanthoideae (Eriocaulaceae, Poales) and their nectariferous structures. *Annals of Botany* **99**: 131–139.
- Ronse De Craene LP. 2018. Understanding the role of floral development in the evolution of angiosperm flowers: clarifications from a historical and physico-dynamic perspective. *Journal of Plant Research* **131**: 367–393.
- Ronse De Craene LP. 2021. Gynoecium structure and development in core Caryophyllales: a matter of proportions. *Botanical Journal of the Linnean Society* **195**: 437–466.
- Ruhland W. 1903. Eriocaulaceae. In: Engler A, ed. *Das Pflanzenreich*, vol. **4**(3). Leipzig: Wilhelm Engelmann, 225–239.
- Sajo MG, Rudall PJ. 2012. Morphological evolution in the graminid clade: comparative floral anatomy of the grass relatives Flagellariaceae and Joinvilleaceae. *Botanical Journal of Linnean Society* **170** (3): 1–12.
- Sajo MG, Oriani A, Scatena VL, Rudall PJ. 2017. Floral ontogeny and vasculature in Xyridaceae, with particular references to staminodes and stylar appendages. *Plant Systematics and Evolution* **303**: 1293–1310.

- Sawyer NW, Mertins DS, Schuster LA. 2005. Pollination biology of *Eriocaulon parkeri* in Connecticut. *Aquatic Botany* **82**: 113–120.
- Silva AL, Trovó M, Coan AI. 2016. Floral development and vascularization help to explain merism evolution in *Paepalanthus* (Eriocaulaceae, Poales). *PeerJ* **4**: 1–28.
- Silva AL, Stützel T, Trovó M, Coan AI. 2021. Floral structure of *Mesanthemum radicans* (Eriocaulaceae, Poales): morphological and anatomical novelties. *South African Journal of Botany* **139**: 306–317.
- Sokoloff DD, Remizowa MV, Timonin AC, Oskolski AA, Naruliev MS. 2018. Types of organ fusion in angiosperm flowers (with examples from Chloranthaceae, Araliaceae and monocots). *Biologia Serbica* **40**: 16–46.
- Stützel T. 1981. Zur Funktion und Evolution köpfchenförmiger Blütenstände, insbesondere der Eriocaulaceen. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **56**: 439–468.
- Stützel T. 1990. Appendices am Gynoeceum der Xyridaceen, Morphogenie, Funktion und Systematische Bedeutung. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **65**: 275–299.
- Stützel T. 1998. Eriocaulaceae. In: Kubitzki K, ed. *The families and genera of vascular plants IV: flowering plants: monocotyledons: Alismatanae and Comelinanae (except Gramineae)*. Berlin: Springer–Verlag, 197–207.
- Stützel T, Gansser N. 1995. Floral morphology of North American Eriocaulaceae and its taxonomic implications. *Feddes Repertorium* **106**: 495–502.
- Vasconcelos TNC, Lucas EJ, Faria JEQ, Prenner G. 2018. Floral heterochrony promotes flexibility of reproductive strategies in the morphologically homogeneous genus *Eugenia* (Myrtaceae). *Annals of Botany* **121**: 161–174.
- Watanabe MTC, Hensold N, Sano PT. 2015. *Syngonanthus androgynus*, a striking new species from South America, its phylogenetic placement and implications for evolution of bisexuality in Eriocaulaceae. *PeerJ* **10**(11): 1–15.

LEGENDAS

Figura 1: Desenvolvimento da flor estaminada de *Leiothrix* em MEV. A-C. *L. angustifolia*, D, G-H. *L. flavescens*, E-F, I. *L. curvifolia*. A-H. Desenvolvimento dos primórdios; I. Sépalas recobrimdo completamente o primórdio floral. (b=bráctea, es=iniciação do estame, s=sépala, seta=iniciação da pétala, *=complexo pétala-estame, ‘=posição abaxial). Escalas: A-G= 20µm; H-I= 50µm.

Figura 2: Desenvolvimento da flor estaminada de *Leiothrix* em MEV. A-C, F. *L. angustifolia*, D-E, G-J. *L. flavescens*. A-C, G-J. Desenvolvimento das pétalas; D-F. Detalhes do pistilódio. (an=antera, p=pétala, pis=pistilódio, s=sépala, seta=iniciação da pétala, ‘=posição abaxial, cabeça de seta= limite da fusão das pétalas). Escalas: A, C, F, H-I=100µm; B, D, G=50µm; E=20µm.

Figura 3: Desenvolvimento da flor estaminada de *L. vivipara* em MEV. A. Iniciação dos estames, pétalas e sépalas; B. Início do desenvolvimento das pétalas; C-I. Fusionamentos das pétalas; J-K. Detalhes do pistilódio (an=antera, es=iniciação do estame, p=pétala, pis=pistilódio, s=sépala, cabeça de seta= limite da fusão das pétalas, seta=iniciação da pétala). Escalas: A=10µm; B=20µm; C= 25µm; D-G= 50µm; H-K= 100µm.

Figura 4: Desenvolvimento da flor estaminada de *Leiothrix* em MEV. A-D. *L. curvifolia*, E-G. *L. flavescens*. A-C. Desenvolvimento das pétalas; D-G. Detalhes do pistilódio. (an=antera, p=pétala, pis=pistilódio, s=sépala, cabeça de seta= limite da fusão das pétalas). Escalas: A-B, D-F=50µm; C=100µm; G= 20µm.

Figura 5: Desenvolvimento da flor pistilada de *Leiothrix* em MEV. A-C, G-I, K-L. *L. flavescens*, D-F, J. *L. curvifolia*. A-G, J. Desenvolvimento dos primórdios; H-I. Desenvolvimento dos carpelos; K-L. Fusão dos carpelos e diferenciação dos ramos nectaríferos e estigmáticos. (b=bráctea, c=carpelo, e= ramo estigmático, es=iniciação do estame, p=pétala, mf=meristema floral, n=ramo nectarífero, s=sépala, seta=iniciação da pétala, *=complexo pétala-estame, ‘=posição abaxial). Escalas: A= 50µm; B-F= 10µm; G-L= 20µm.

Figura 6: Desenvolvimento da flor pistilada de *L. angustifolia* em MEV. A-C. Desenvolvimento dos carpelos; D-H. Fusão dos carpelos e diferenciação dos ramos nectaríferos e estigmáticos. I-J. Crescimento do estilete e dos ramos estigmáticos; K. Botão imaturo com ramos nectaríferos e estigmáticos. L. Flor em antese. (c=carpelo, e= ramo estigmático, est=estaminódio, n=ramo nectarífero, p=pétala, s=sépala, seta=iniciação da pétala). Escalas: A-B=10µm; C-F, H=20µm; G, I-J= 25µm, K= 50µm, L= 100µm.

Figura 7: Desenvolvimento da flor pistilada de *L. curvifolia* em MEV. A-F, H-I. Desenvolvimento dos ramos nectaríferos e estigmáticos; G. Detalhe do estaminódio. (e= ramo estigmático, est=estaminódio, n=ramo nectarífero). Escalas: A-B, F=25µm; C, E=50µm; D, G=20µm; H=100µm; I=250µm.

Figura 8: Desenvolvimento da flor pistilada de *L. flavescens* em MEV. A-G. Desenvolvimento dos ramos nectaríferos e estigmáticos. (e= ramo estigmático, est=estaminódio, n=ramo nectarífero). Escalas: A=20µm; B=50µm; C-E=100µm; F-G=200µm.

Figura 9: Desenvolvimento da flor pistilada de *L. vivipara* em MEV (A-B, E-G); Desenvolvimento da flor pistilada de *L. flagellaris* em MEV (C-D, H-J). A-D. Desenvolvimento dos ramos nectaríferos e estigmáticos; E, H. Detalhe do gineceu da flor em antese; F, I. Detalhe dos ramos nectaríferos e estigmáticos; G, J. Detalhe do estaminódio. (e= ramo estigmático, est=estaminódio, n=ramo nectarífero). Escalas: A-B= 50µm; C-D, G= 20µm; E, H= 200µm; F-I=100µm; J= 25µm.

Figura 10: Flor pistilada de *L. fluitans* em MEV. A. Detalhe do gineceu na flor em antese; B. Detalhe dos ramos nectaríferos e estigmáticos; C. Detalhe dos ramos estigmáticos com grãos-de-pólen aderidos. (e= ramo estigmático, est=estaminódio, gp=grão de pólen, n=ramo nectarífero). Escalas: A=250µm; B=100µm; C=50µm.

Figura 11: Secções transversais das flores estaminadas de *Leiothrix angustifolia*. A. Região de diferenciação das sépalas no pedicelo; B. Início de divergência dos traços das sépalas; C. Traços vasculares diferenciados de sépalas, pétalas e pistilódio; D. Sépalas, pétalas, estames e pistilódio diferenciados; E. Sépala, pétala, estames e região nectarífera do pistilódio; F. Estames em pré-antese. (círculo amarelo= traço de sépala, círculo azul= traço de pétala, círculo preto= feixe vascular dorsal, círculo verde= traço de estames, círculo vermelho= plexo vascular central). (es=estame, p=pétala, pis=região basal do pistilódio, n= pistilódio nectarífero; s=sépala). Escalas: A-F= 40µm.

Figura 12: Secções transversais das flores estaminadas de *Leiothrix flagellaris*. A. Região do pedicelo com os traços de sépalas; B-C. Sépalas diferenciadas e traços das pétalas em diferenciação; D-E. Sépalas, pétalas, estames e região nectarífera do pistilódio; F. Detalhe de estame em fase pré-antese. (círculo amarelo= traço de sépala, círculo azul= traço de pétala, círculo verde= traço de estames, círculo vermelho= plexo vascular central). (es=estame, n= pistilódio nectarífero, p=pétala, s=sépala). Escalas: A-E= 40µm; F= 20µm.

Figura 13: Secções transversais das flores estaminadas de *Leiothrix fluitans*. A. Região do pedicelo com diferenciação dos traços de sépalas; B. Sépala em diferenciação e traços de pétalas divergindo; C. Sépala diferenciada e pétalas em diferenciação; D. Sépalas e pétalas diferenciadas, estames em diferenciação da região basal do pistilódio; E. Pétalas, estames e região basal do pistilódio; F. Detalhe da região nectarífera do pistilódio; G. Detalhe do estame em pré-antese. (círculo amarelo= traço de sépala, círculo azul= traço de pétala, círculo preto= feixe vascular dorsal, círculo verde= traço de estames, círculo vermelho= plexo vascular central). (es=estame, n= pistilódio nectarífero; p=pétala, pis=região basal do pistilódio, s=sépala). Escalas: A-E= 40µm; F-G= 20µm.

Figura 14: Secções transversais das flores pistiladas de *Leiothrix angustifolia*. A. Região do pedicelo; B. Diferenciação das sépalas; C. Diferenciação das pétalas; D. Detalhe do estaminódio; E. Região basal do ovário; F. Região mediana do ovário; G. Região basal do estilete; H. Região mediana do estilete; I. Região apical do estilete; J. Detalhe dos ramos estigmáticos. (círculo amarelo= traço de sépala, círculo azul= traço de pétala, círculo preto= feixe vascular dorsal, círculo vermelho= plexo vascular central). (est=estaminódio, p=pétala, s= sépala). Escalas: A-B, E-F= 40µm; C-D= 30µm; G-J= 20µm.

Figura 15: Secções transversais das flores pistiladas de *Leiothrix flavescens*. A. Região do pedicelo com a diferenciação das sépalas; B. Região da diferenciação das pétalas; C. Detalhe do estaminódio; D. Região mediana do ovário; E. Região basal do estilete; F. Região mediana do estilete com a diferenciação dos ramos nectaríferos; G. Início da liberação dos ramos nectaríferos do estilete. H-I. Região apical do estilete com ramos nectaríferos e estigmáticos diferenciados; J. Detalhe dos ramos estigmáticos. (círculo amarelo= traço de sépala, círculo azul= traço de pétala, círculo preto= feixe vascular dorsal, círculo vermelho= plexo vascular central). (e= ramo estigmático, est=estaminódio, n= ramo nectarífero, p= pétala, s= sépala). Escalas: A-B= 40µm; C-D= 30µm; E-J= 20µm.

Figura 16: Secções transversais das flores pistiladas de *Leiothrix vivipara*. A. Detalhe do estaminódio; B. Região basal do ovário; C. Detalhe da região mediana do ovário; D. Região basal do estilete; E. Região mediana do estilete; F. Início da diferenciação dos ramos nectaríferos. G. Região apical do estilete com ramos nectaríferos e estigmáticos diferenciados; H. Detalhe dos ramos estigmáticos. (círculo amarelo= traço de sépala, círculo azul= traço de pétala, círculo preto= feixe vascular dorsal, círculo vermelho= plexo vascular central). (est= estaminódio, n= ramo nectarífero, p= pétala, s= sépala). Escalas: A, C, G-H= 20µm; B= 40µm; D-F= 30µm.

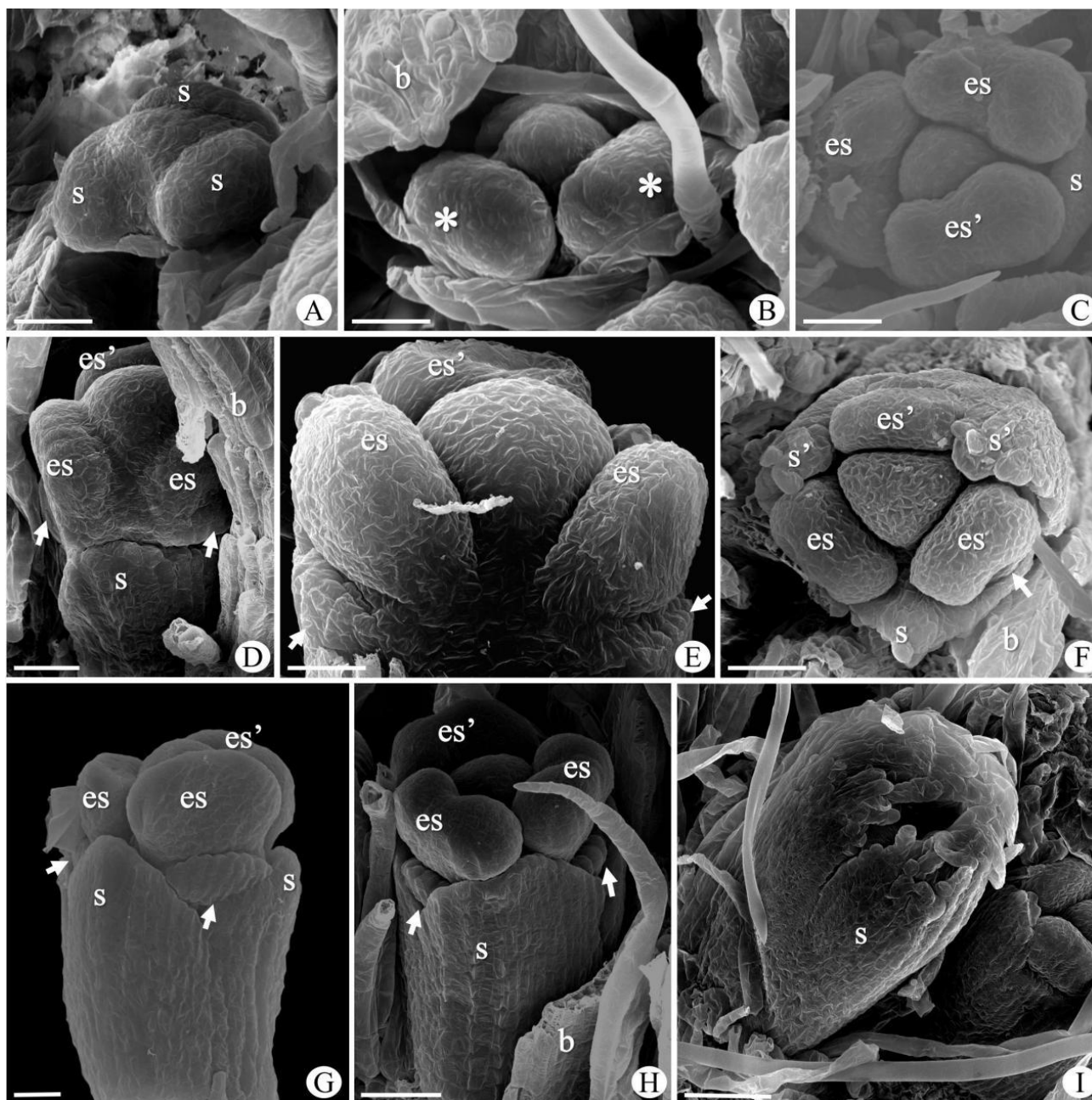


Figura 1

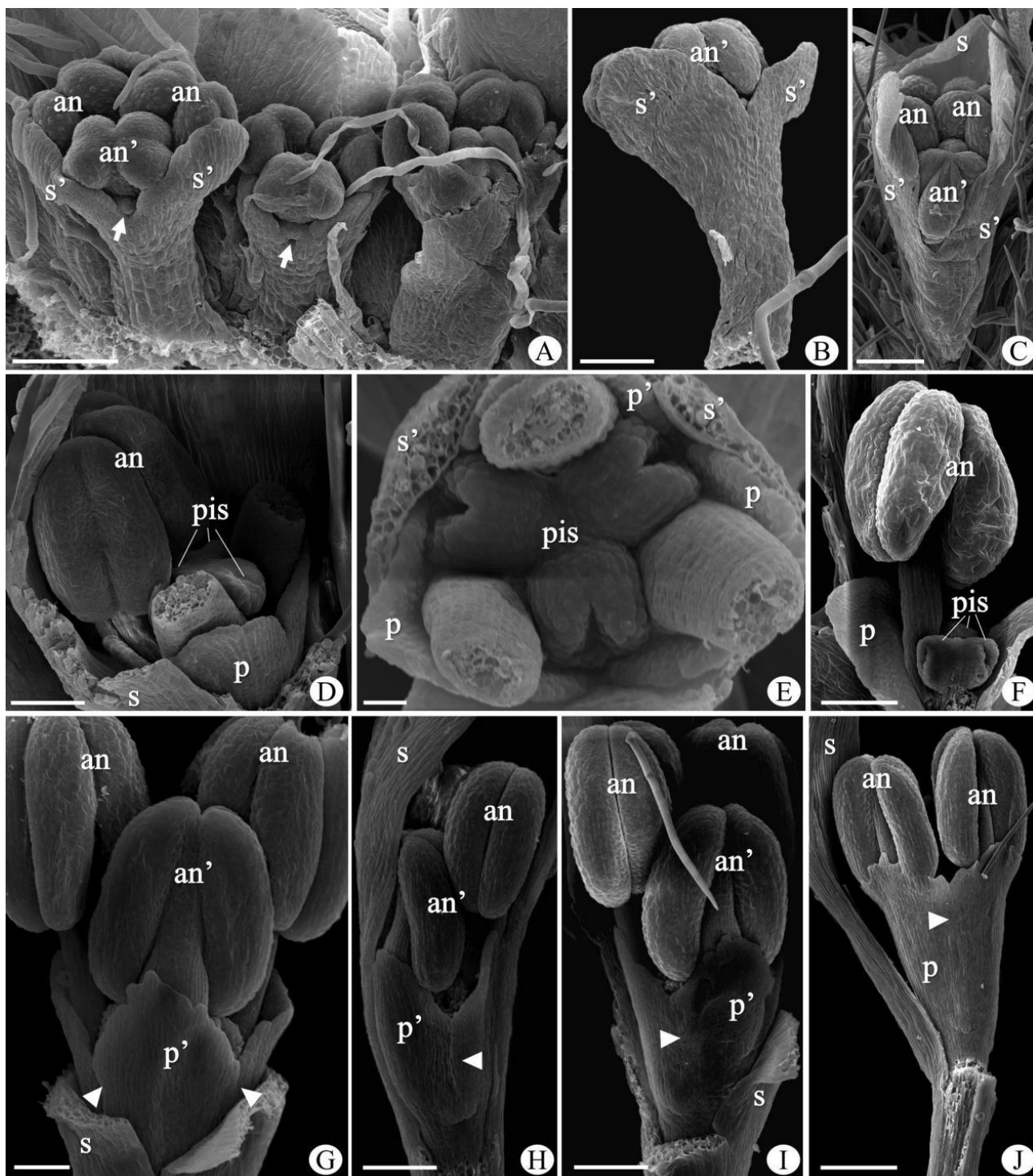


Figura 2

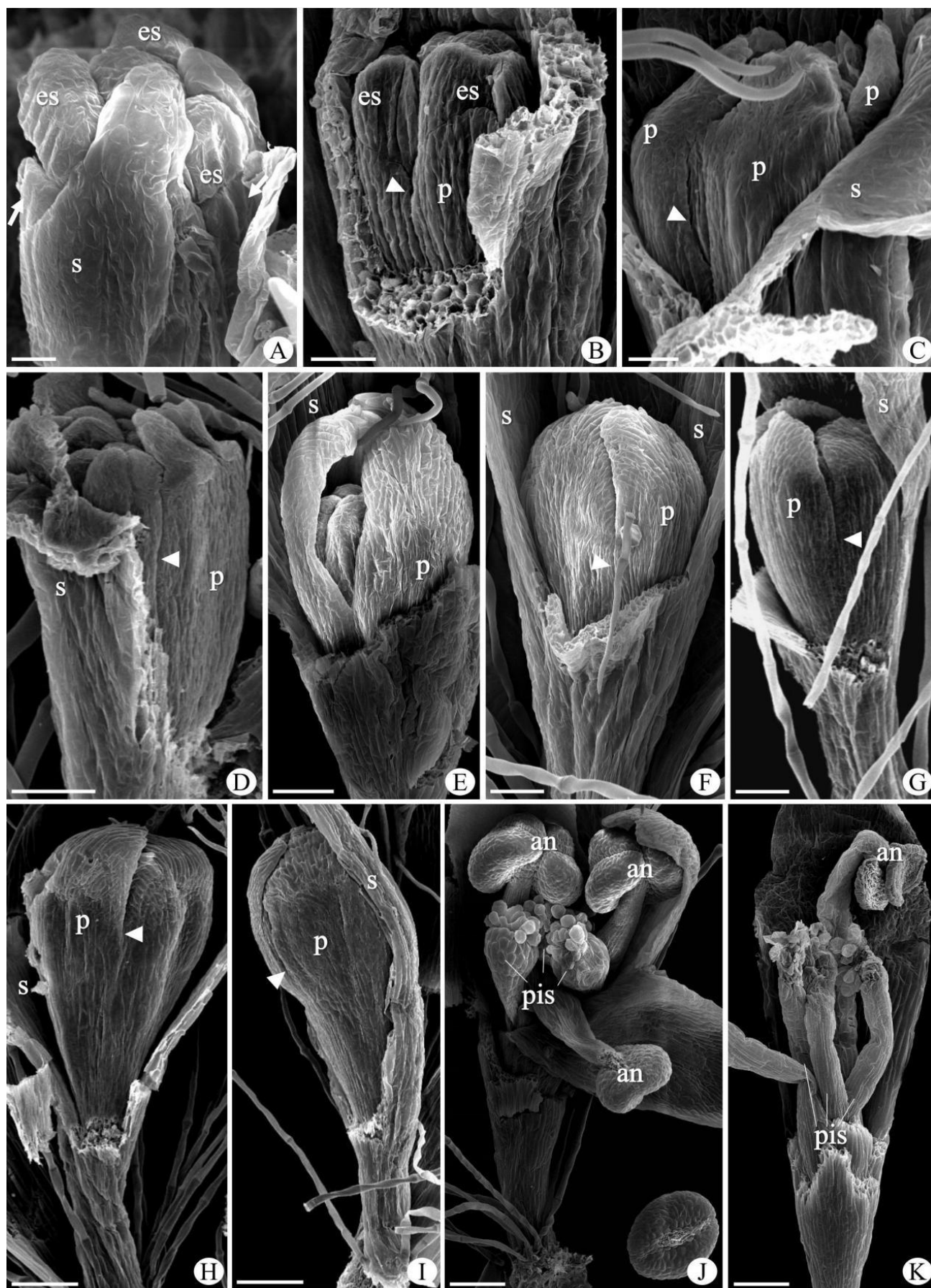


Figura 3

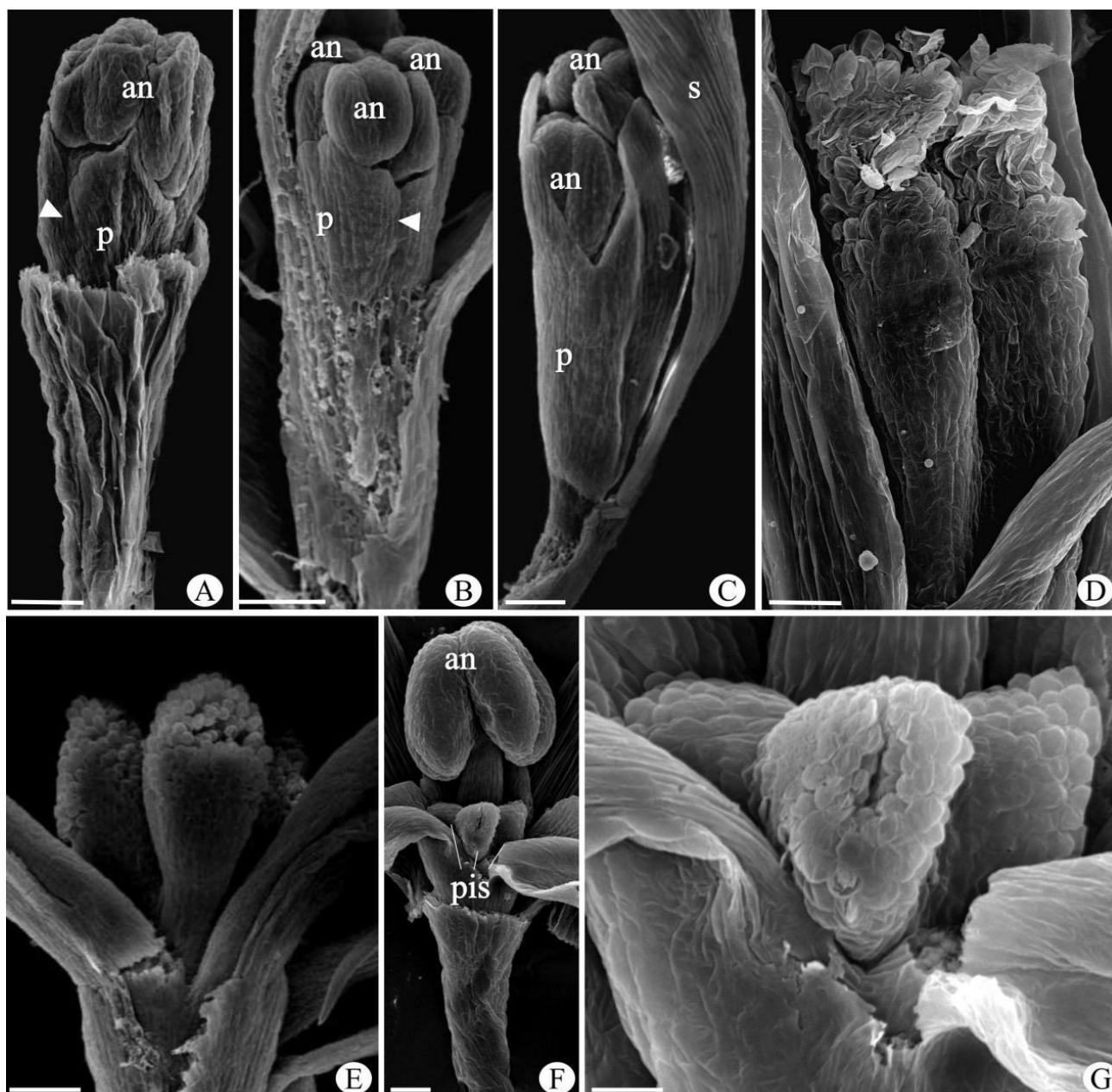


Figura 4

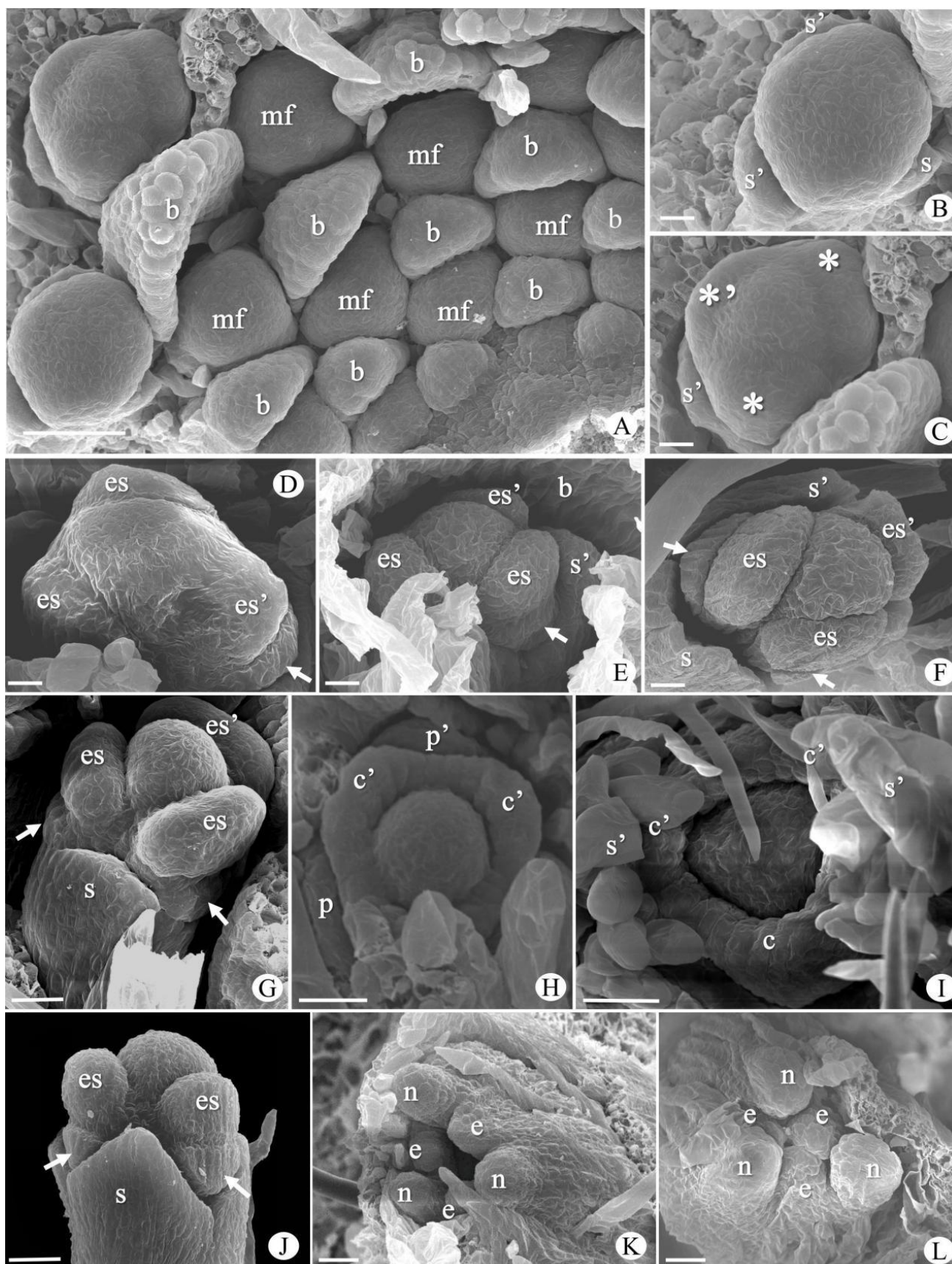


Figura 5

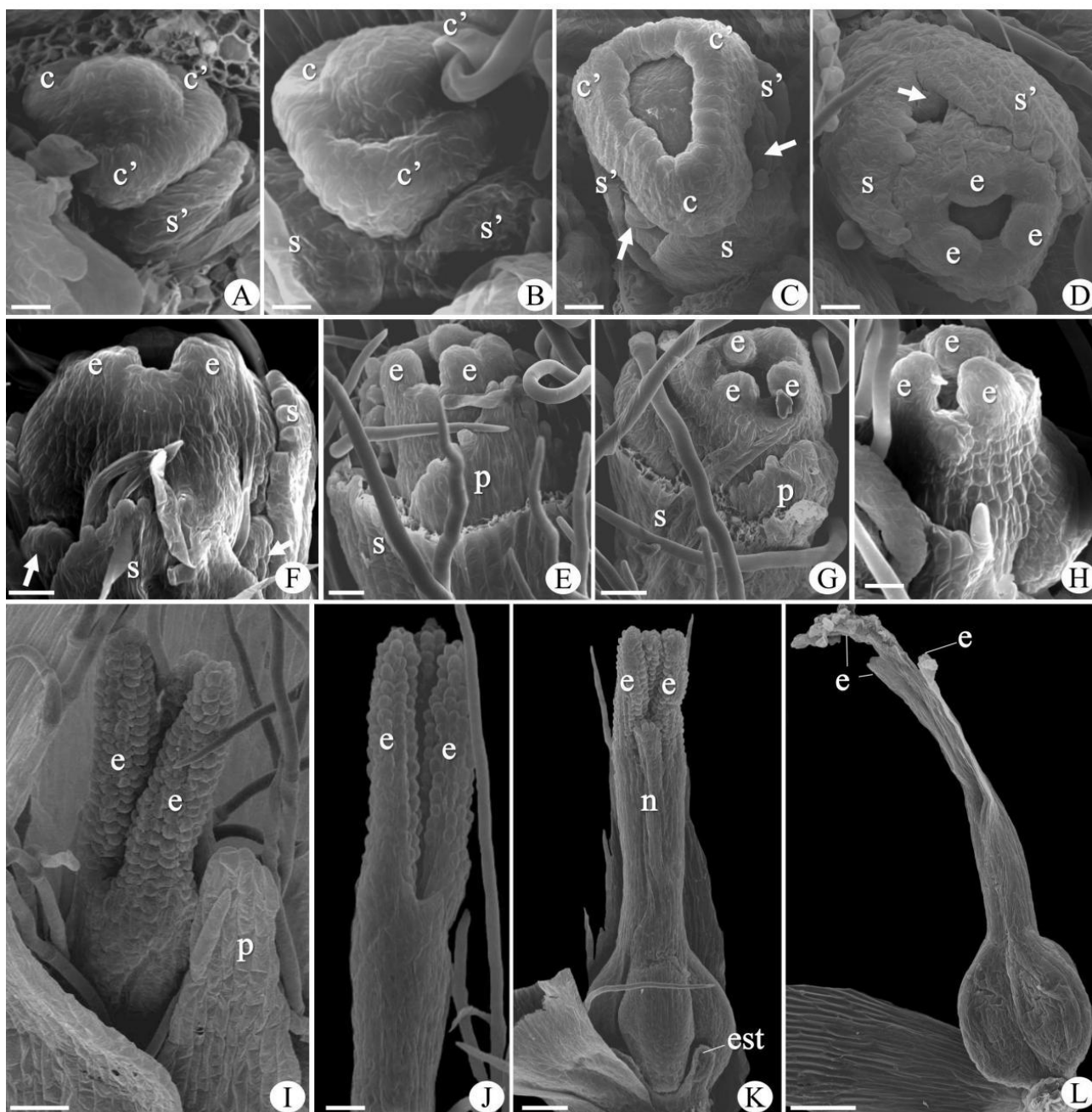


Figura 6

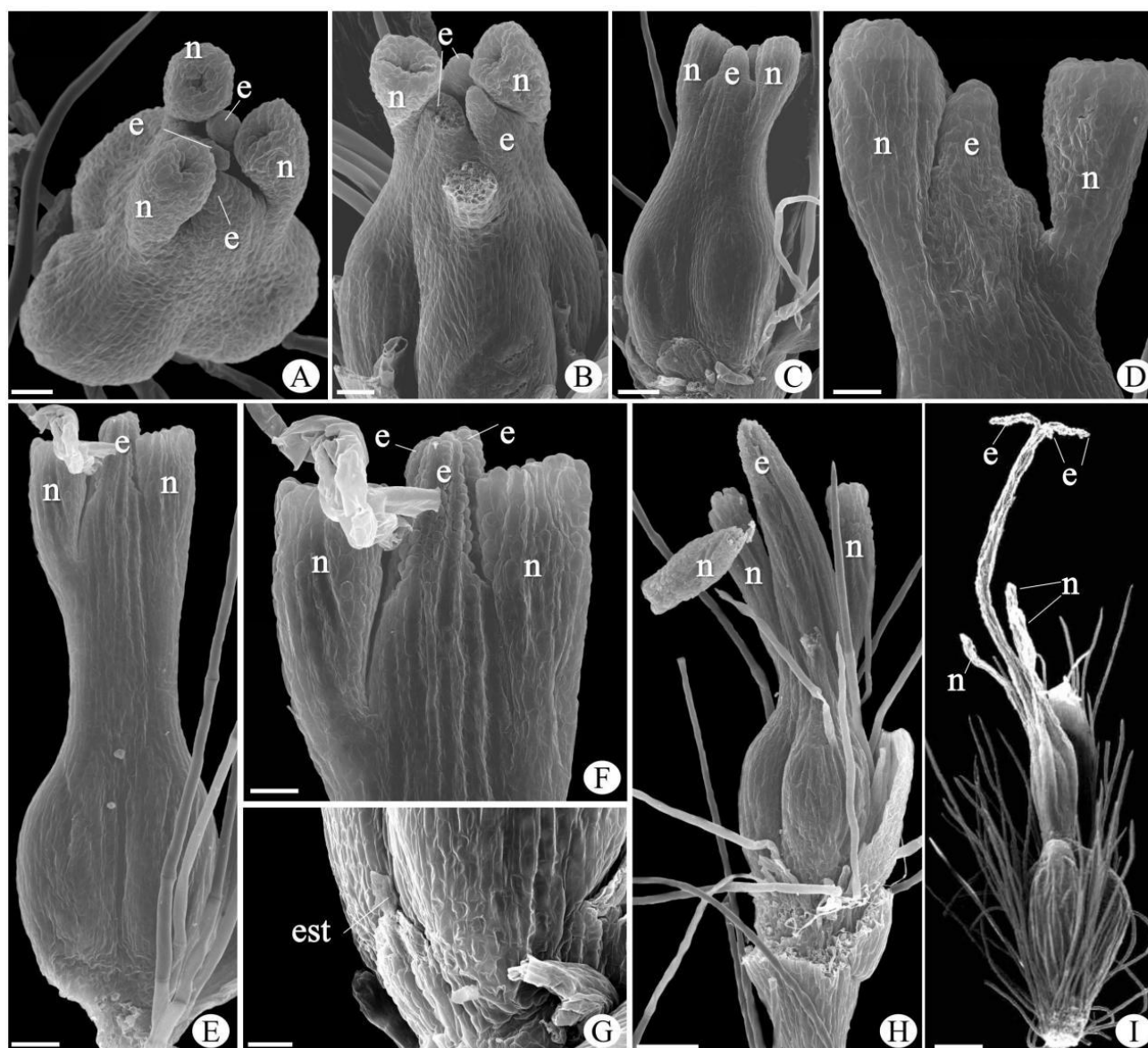


Figura 7

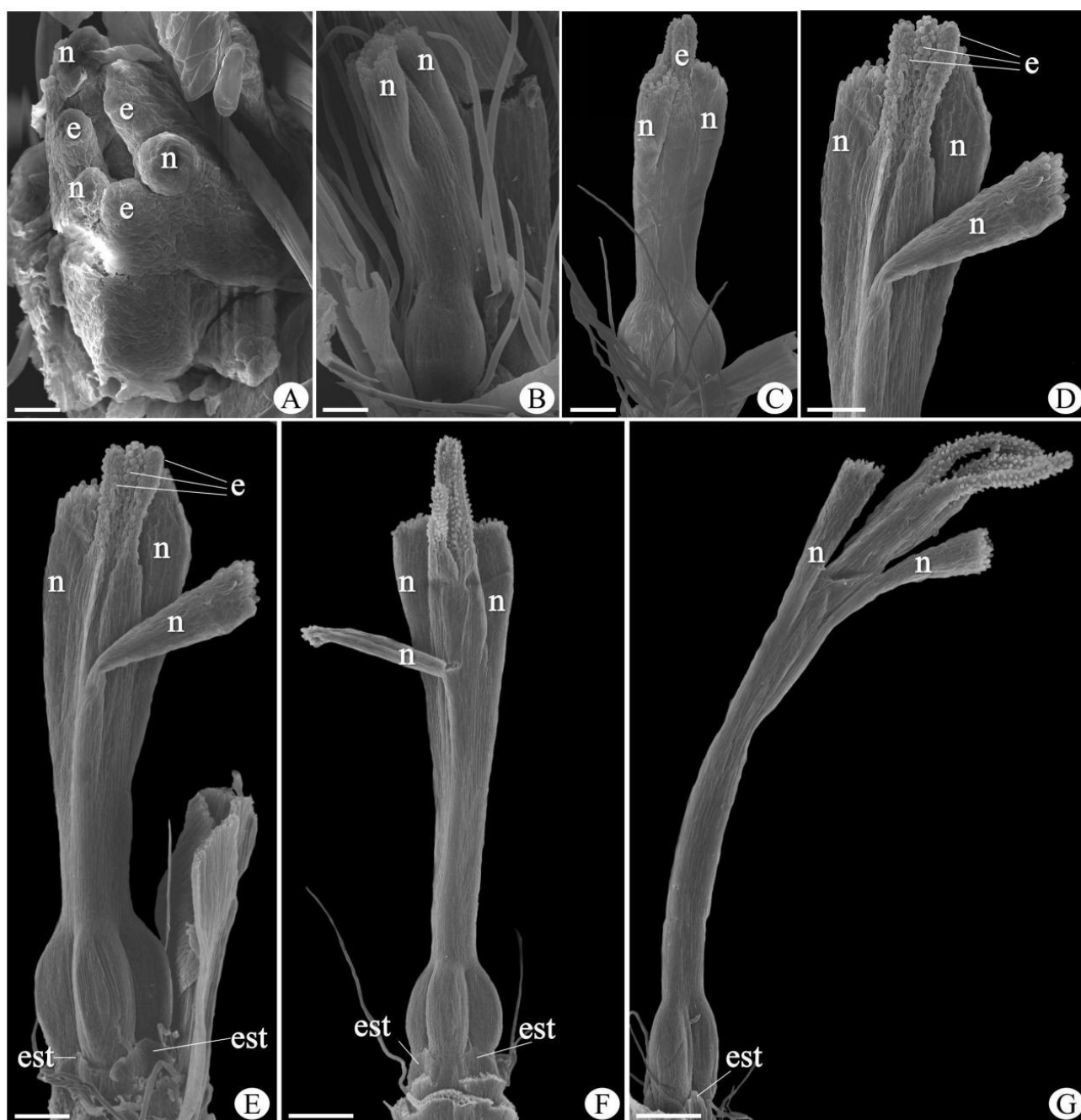


Figura 8

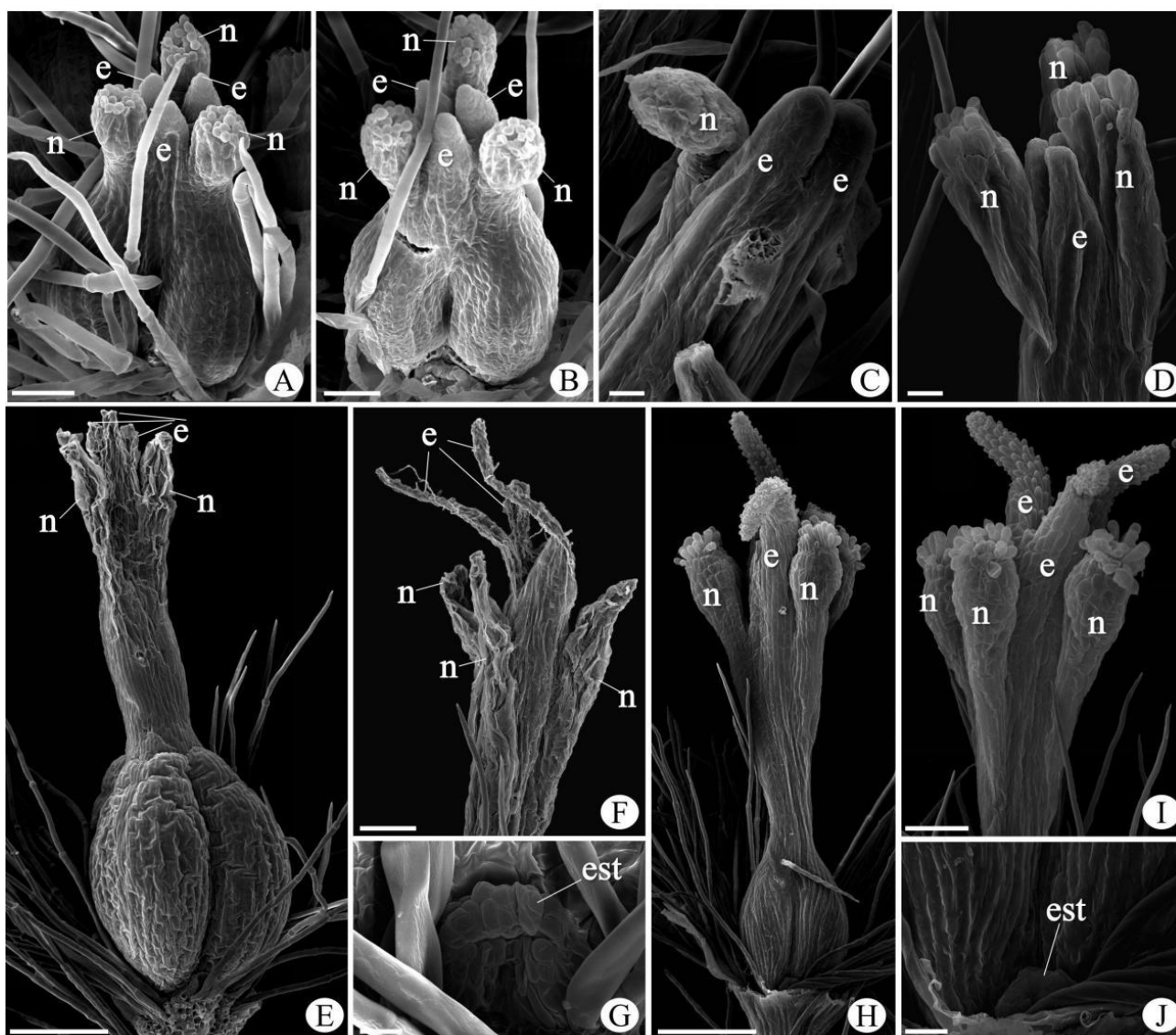


Figura 9

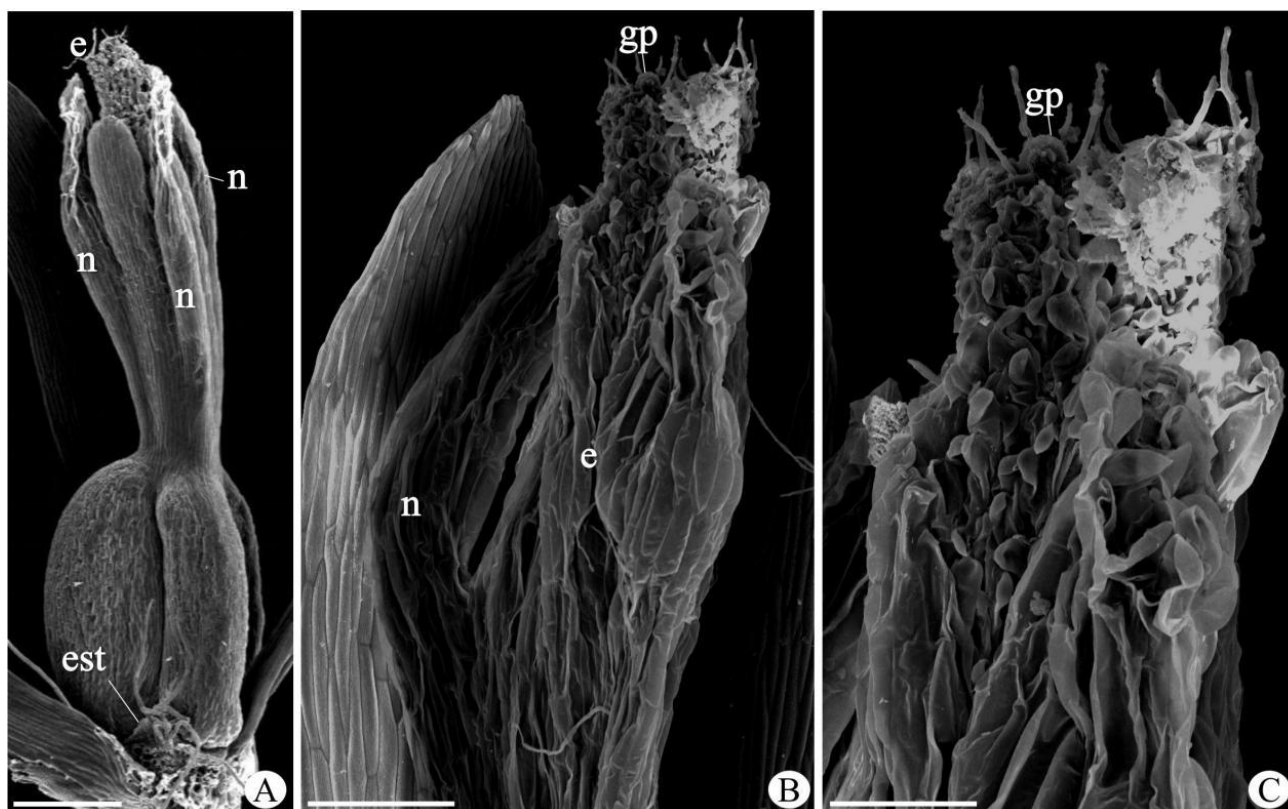


Figura 10

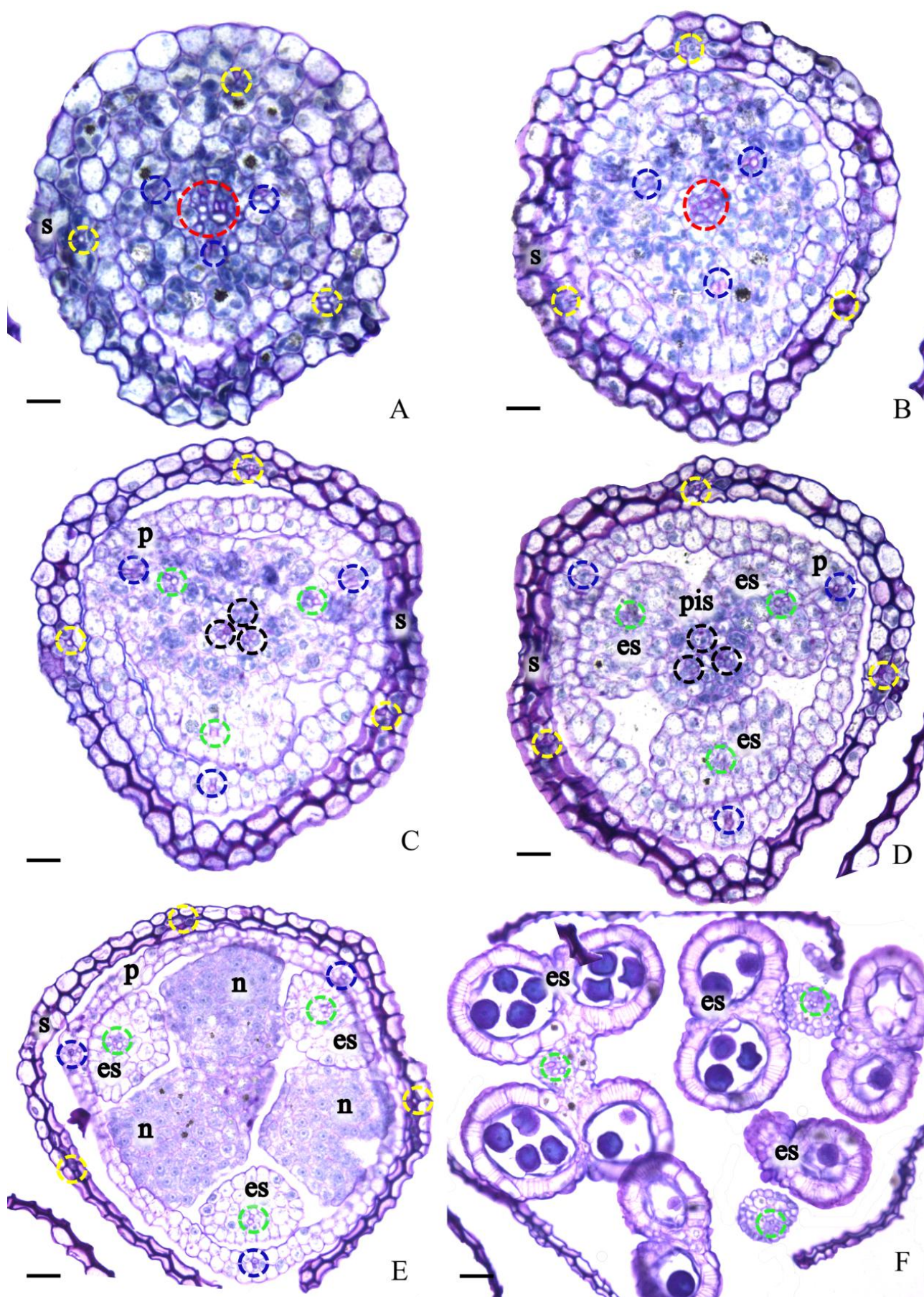


Figura 11

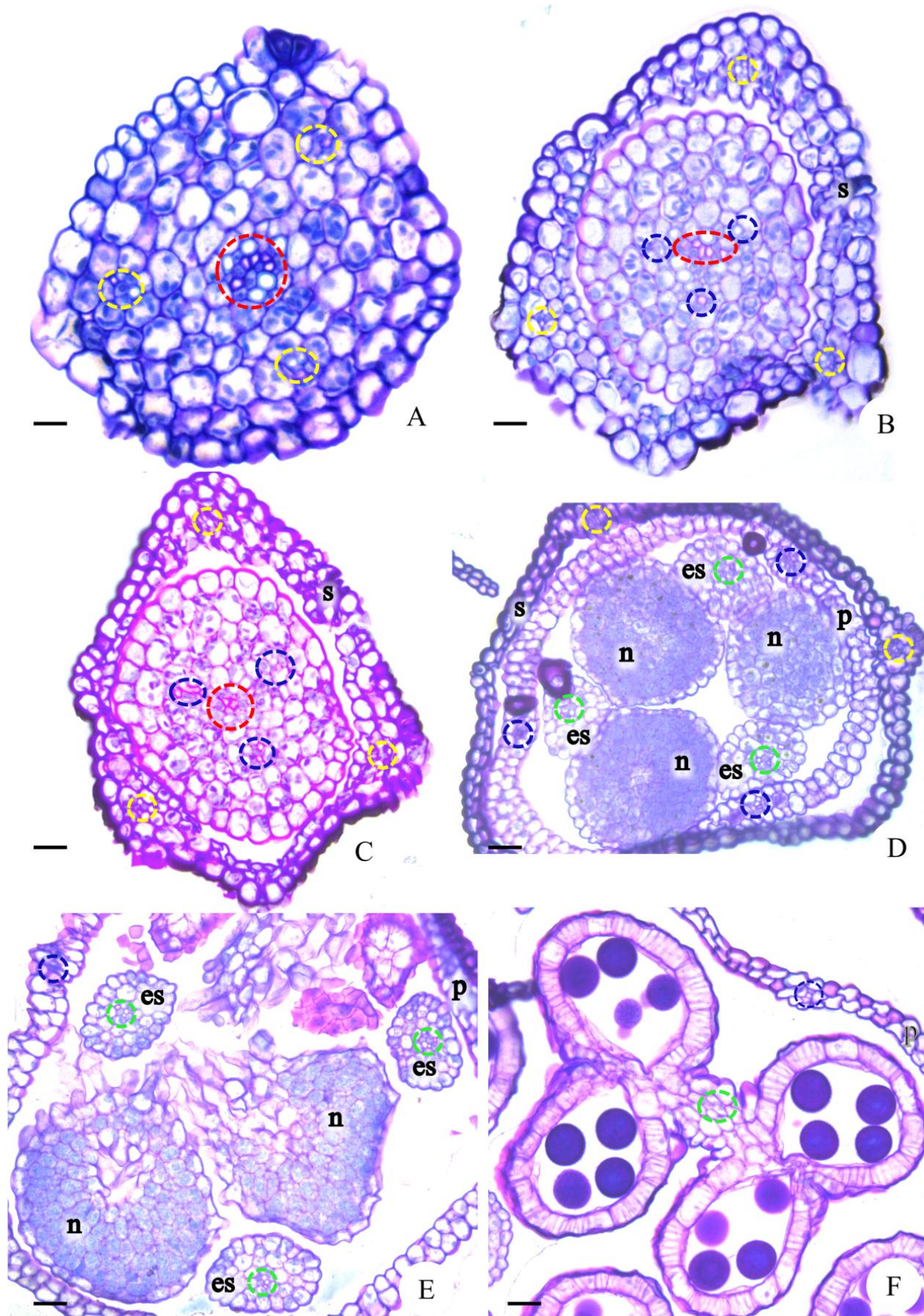


Figura 12

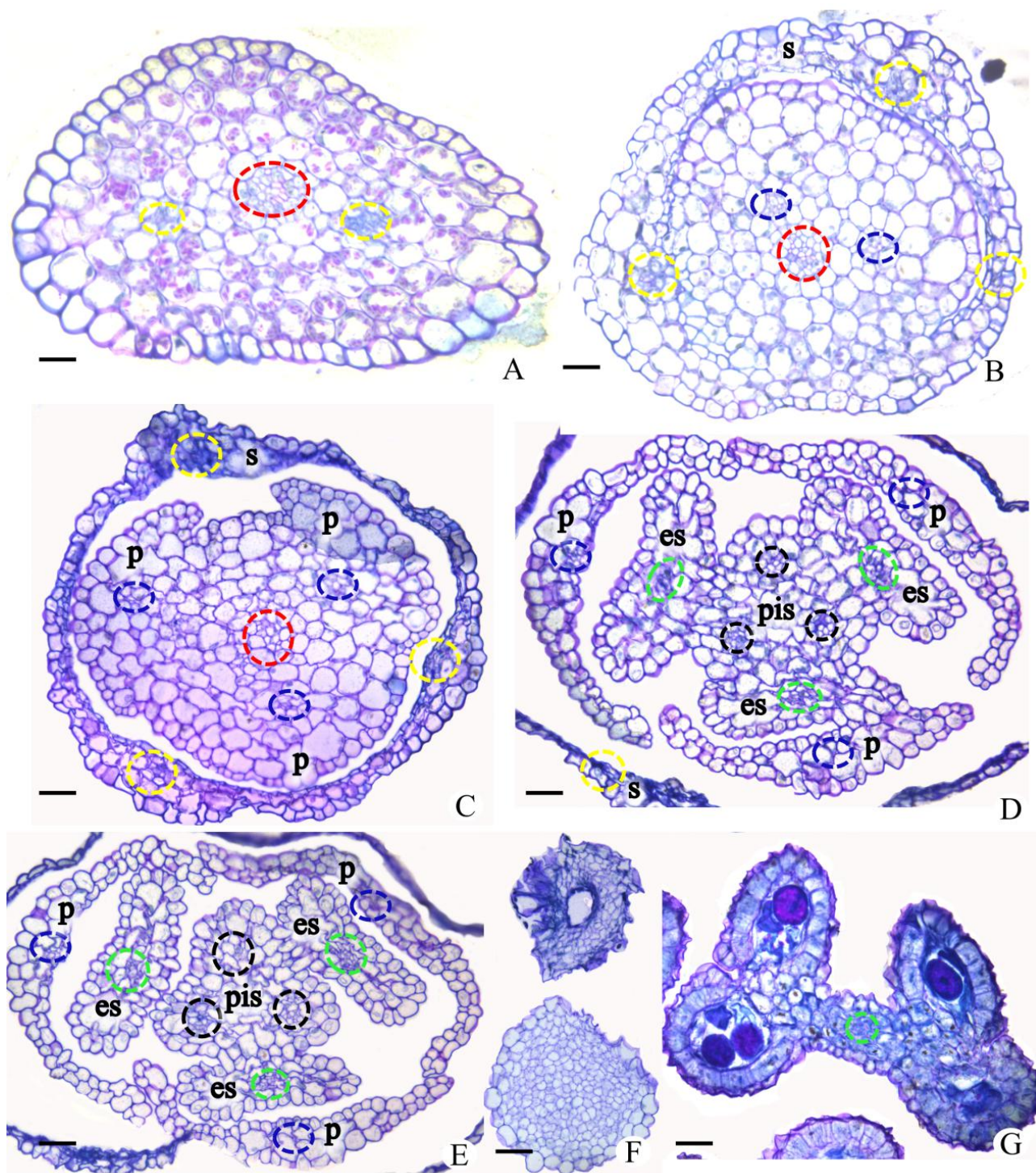


Figura 13

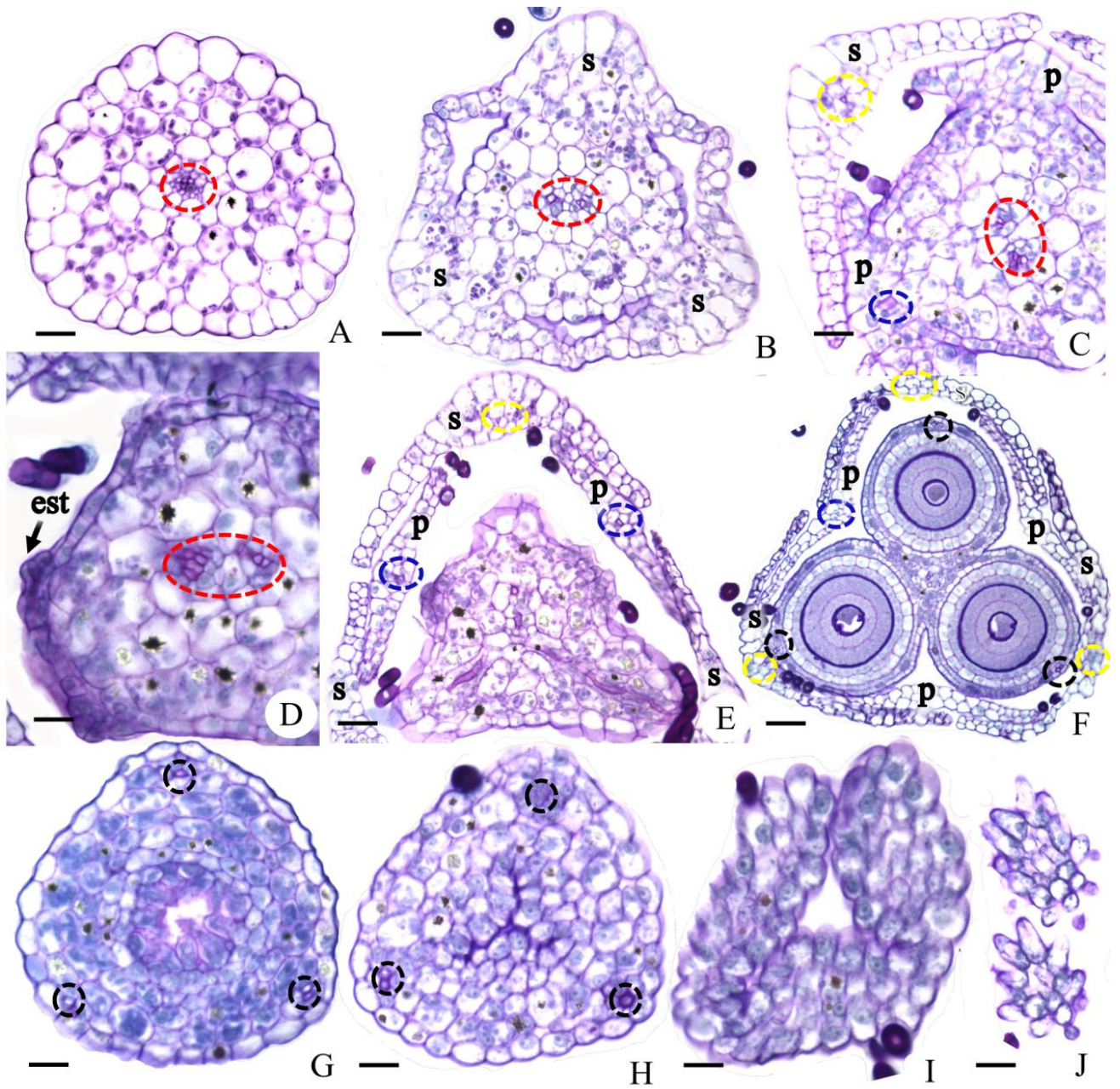


Figura 14

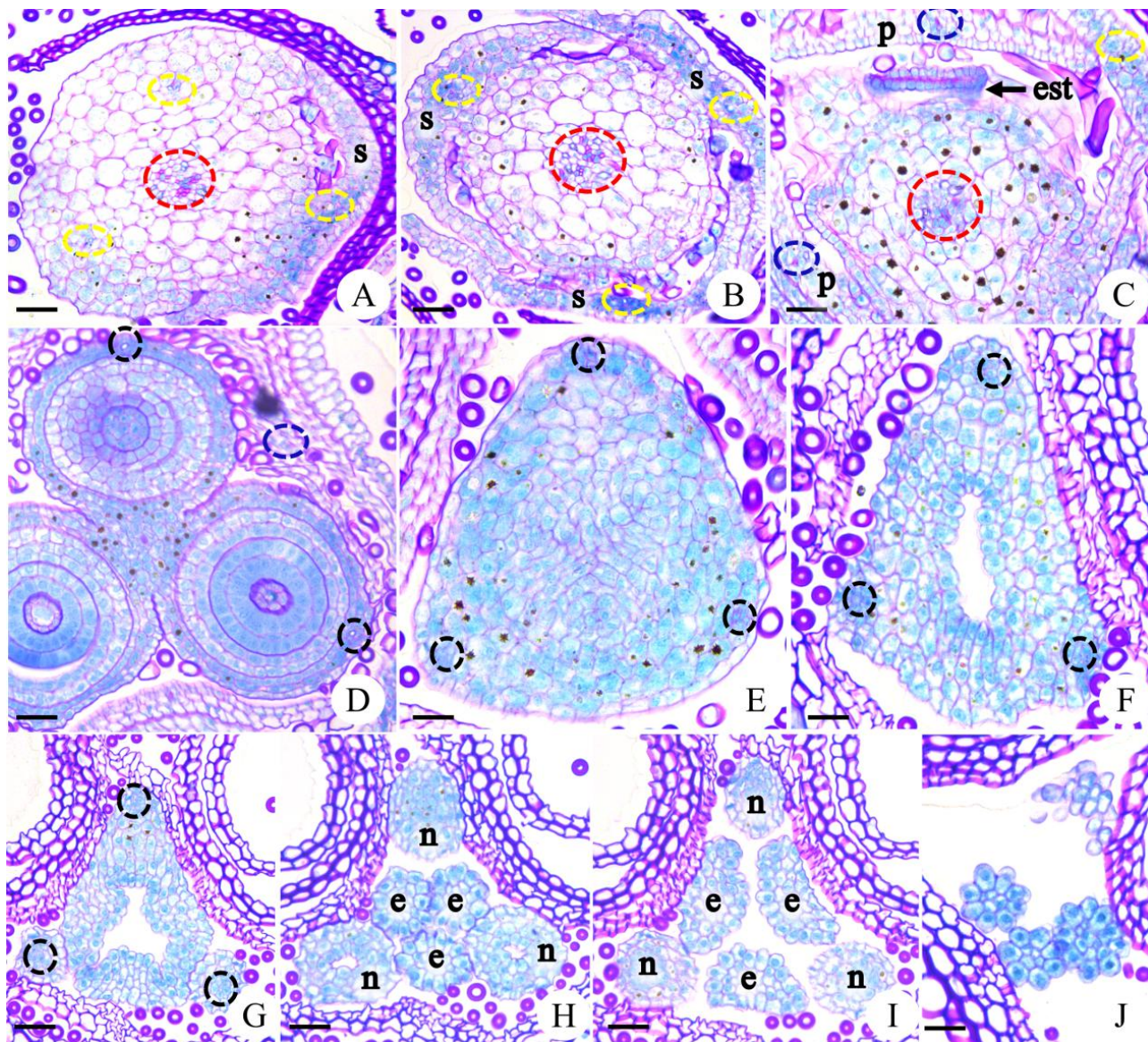


Figura 15

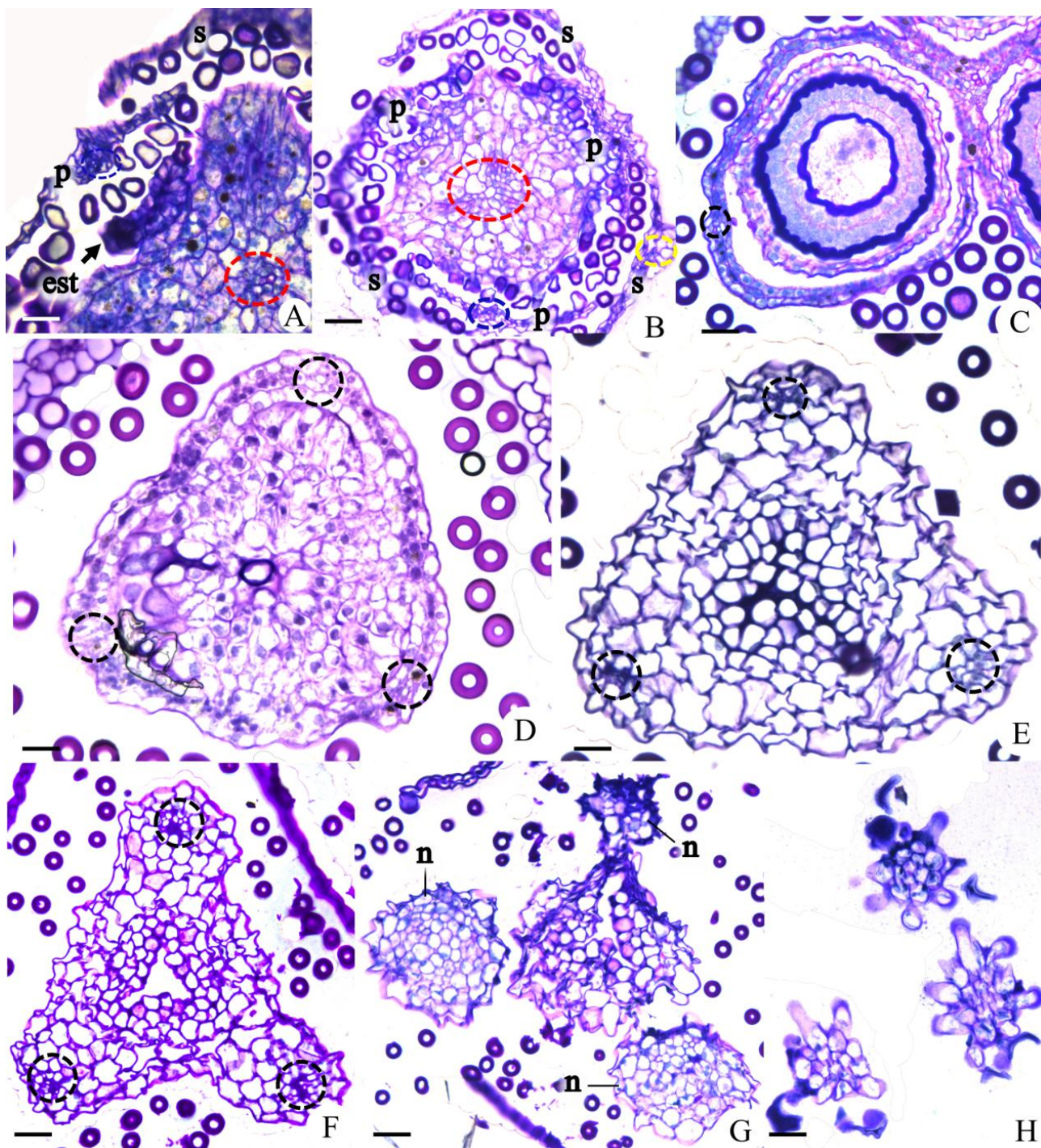


Figura 16

TABELAS

Tabela 1. Espécies estudadas, classificação e dados dos vouchers

Espécie	Ruhland (1903)	Giulietti (2020)	Coletor e nº de coleta
<i>L. angustifolia</i> (Körn.) Ruhland	<i>Leiothrix</i> subg. <i>Calyccephalus</i>	<i>Leiothrix</i> subg. <i>Leiothrix</i>	Mascarenhas et al., 382; 387
<i>L. curvifolia</i> (Bong.) Ruhland			Mascarenhas et al., 395; Sauthier 107
<i>L. flavescens</i> (Bong.) Ruhland			Mascarenhas et al., 330; 357
<i>L. fluitans</i> (Mart.) Ruhland	<i>Leiothrix</i> subg. <i>Rheocaulon</i>	<i>Leiothrix</i> subg. <i>Stephanophyllum</i>	Mascarenhas et al., 402; 425
<i>L. flagellaris</i> (Bong.) Ruhland	<i>Leiothrix</i> subg. <i>Stephanophyllum</i>		Mascarenhas et al. 349
<i>L. vivipara</i> (Bong.) Ruhland			Sauthier 108

Tabela 2. Características variáveis das flores de *Leiothrix*

Espécies	Altura da inserção dos ramos nectaríferos no estilete	Altura do pistilódio em relação aos estames
<i>L. angustifolia</i>	Ausentes	Na base dos filetes
<i>L. curvifolia</i>	Abaixo da região mediana	Na região mediana dos filetes
<i>L. flavescens</i>	Acima da região mediana	Na região mediana dos filetes
<i>L. fluitans</i>	Na região mediana	Acima da região mediana dos filetes
<i>L. flagellaris</i>	Na região apical	Acima da região mediana dos filetes
<i>L. vivipara</i>	Na região apical	Acima da região mediana dos filetes

**CAPÍTULO 2: Seed morphology and post-seminal development in *Leiothrix* Ruhland
(Eriocaulaceae, Poales)**

(Artigo publicado na *Feddes Repertorium*)

Mascarenhas AAS, Scatena VL. 2021. Seed morphology and post-seminal development in *Leiothrix* Ruhland (Eriocaulaceae, Poales). *Feddes Repertorium* 132: 9-19.
doi:10.1002/fedr.202000022

Seed morphology and post-seminal development in *Leiothrix* Ruhland (Eriocaulaceae, Poales)

Running Title: Seed morphology in *Leiothrix*

Ana Angélica Silva Mascarenhas & Vera Lucia Scatena

Abstract: The genus *Leiothrix* (Eriocaulaceae) is restricted to South America, where most species occur in the Espinhaço mountain chain in Brazil. Seed ornamentation has a distinctive origin in the family and in most species of *Leiothrix* the seed coat has a striated pattern. The objective of this study was to evaluate the morphological aspects of seeds of *Leiothrix* as well as the post-seminal development. *Leiothrix* seeds are elliptical or oval, the seed coat has a primary sculpture of isodiametric or hexagonal cells with concave periclinal walls and straight or sinuose anticlinal walls. Most species also have a secondary sculpture, which forms the striate ornamentation and this may be continuous or discontinuous with isolated, connected or cruciform annular striae. A comparative table of seed characters shows that most of them corroborate the current circumscription of the subgenera of *Leiothrix*. The seed coat striae expand with wetting and may help in seed imbibition during germination. *Leiothrix* seeds show a high germination rate and the post-seminal development pattern is similar to that described for other species of Eriocaulaceae.

Key words: germination, Poales, seed coat, seedling, striated seeds.

1. Introduction

The order Poales, in which the Eriocaulaceae are classified, consists of about 20,000 species in 15 families forming five clades: bromeliids, cyperids, graminids, restiids and xyrids (Darshetkar *et al.* 2019). The Eriocaulaceae together with the Xyridaceae constitute the xyrid clade and they share characters such as bitegmic and tenuinucellate ovules, seeds with tanniniferous hypostase, starchy endosperm and undifferentiated embryos (Scatena and Bouman 2001; Coan *et al.* 2007; 2010; Nardi *et al.* 2015).

The Eriocaulaceae include about 1,400 species in ten genera (Giulietti *et al.* 2012) and have a pantropical and temperate distribution, with two centres of diversity in the neotropics, eastern Brazil in the Espinhaço mountain range and the tepuis of Venezuela (Hensold and Giulietti 1991). The family is characterized by its capitulate inflorescences and divided into two subfamilies - Eriocauloideae and Paepalanthoideae – based on floral characters (Ruhland 1903).

Leiothrix Ruhland (1903) is divided into the following five subgenera according to habit, floral characters and mode of vegetative growth: *L.* subg. *Calycocephalus* Ruhland, *L.* subg. *Eleutherandra* Ruhland, *L.* subg. *Psilanthus* Ruhland, *L.* subg. *Rheocaulon* Ruhland and *L.* subg. *Stephanophyllum* Ruhland. The genus includes 47 species with its centre of distribution and diversity almost restricted to the Espinhaço range in Brazil, extending from Minas Gerais to Bahia, apart from *L. flavescens* (Bong.) Ruhland, which has a wide distribution extending to the Venezuelan tepuis (Giulietti *et al.* 1995; Flora do Brasil 2020). According to Ruhland (1903), all species of *Leiothrix* occur in Brazil, except for *L. arechavaletae* Ruhland (*L.* subg. *Psilanthus*), which has recently been synonymized in *Syngonanthus chrysanthus* (Bong.) Ruhland by Alff (2020), making the genus almost exclusively Brazilian.

Four of the subgenera proposed by Ruhland (1903) occur in Brazil but their circumscription and the relationships of the species are not yet entirely clear (Giulietti *et al.* 1995). Morphological and molecular data of *Leiothrix* support its monophyly and close relationship to *Syngonanthus* Ruhland (Giulietti *et al.* 1995; Andrade *et al.* 2010; Giulietti *et al.* 2012; Trovó *et al.* 2013;

Echternacht *et al.* 2014), but also show that among the subgenera, only *L.* subg. *Stephanophyllum* are monophyletic.

Giulietti *et al.* (1986) considered seed development in *Leiothrix* to be different from that of the other genera of the family in having an intact outer layer of the outer integument in mature seeds. Coan *et al.* (2010) considered that there was uniformity in seed development of Eriocaulaceae, corroborating the results of Scatena and Bouman (2001), who showed that the cells of the inner layer of the outer integument form the endotesta. Ultrastructural patterns of the seeds are used at infra-specific level because of limited plasticity and variation between individuals (Barthlott 1981), but also at higher levels since they help in understanding taxonomic relationships in some groups within the family (Nair 1987; Zona *et al.* 2012; Barreto *et al.* 2013; Corredor *et al.* 2015).

The post-seminal development on monocotyledons reveals characters peculiar to different groups, as in Poales (Tillich 2007), which shows evolutionary patterns of the cotyledon among the families and particular features in the xyrids, especially the reduced cotyledon in Eriocaulaceae. In this family, studies of germination and post-seminal development have been carried out in *Eriocaulon* L. (Ramaswamy *et al.* 1981), *Syngonanthus* (Scatena *et al.* 1993; 1996), *Paepalanthus* Mart. (Kraus *et al.* 1996) and *Comanthera* L.B.Sm. (Corredor *et al.* 2015), and have revealed common features such as dependency on direct light for seed germination and seedling development, the germination being indicated by a first little leaf not undergoing much further development instead of the formation of a primary root, abortion of the primary root and the development of a shoot-born root after the development of the eophyll.

The objective of the present study was to investigate the seed morphology and ultrastructure of representative Brazilian species of *Leiothrix* to verify if there are significant variations. We also describe the morphology of post-seminal development in order to establish whether there is a common pattern in the Eriocaulaceae.

2. Material and methods

Capitula with fully developed seeds were collected from different individuals representing the four Brazilian subgenera of *Leiothrix* (Table 1). Vouchers of the species are deposited in the Herbarium Rioclarense (HRCB) of the Biosciences Institute of the Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de Rio Claro, São Paulo state, Brazil.

For morphological and post-seminal developmental studies, mature seeds were extracted from the capitula and observed with a stereomicroscope. A scanning electron microscope (SEM) was also used under all of the species cited in the Table 1. Seeds from capitula at the dispersal stage were soaked in water for 36 h in order to better visualize the seed coat, then fixed in 70% alcohol and later coated with gold (Balzer 5 CDO 50 Sputter Coater). Seeds taken from herbarium specimens were also coated with gold (Balzer 5 CDO 50 Sputter Coater). Documentation of the results was made using images obtained with the program "TM 3 000 Applicaton Program".

For the post-seminal developmental study, the mature seeds of *L. angustifolia* (Körn.) Ruhland, *L. argyroderma* Ruhland, *L. arrecta* Ruhland, *L. beckii* (Szyszyl.) Ruhland, *L. curvifolia* (Bong.) Ruhland, *L. flavescens*, *L. fluitans* (Mart.) Ruhland, *L. raymondii* Giul. & Silva and *L. sclerophylla* Silveira were divided between five Petri dishes with 20 seeds in each, on filter paper soaked with distilled water, under the same conditions in a controlled chamber at a temperature of 28 ± 2 °C and constant flourescent light ($\approx 32 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ PAR). Germination was defined as the stage at which the embrionic axis emerged. The progress of the post-seminal developmental phases was observed daily with a stereomicroscope. Photodocumentation was made using images obtained with a Canon Power Shot S80 digital camera attached to a Leica EZ4 stereomicroscope. The method described by Ranal and Santana (2006) was used to calculate the mean time for germination.

Seedlings at different stages of development were fixed in FAA 70 (37% formaldehyde, glacial acetic acid, 70% ethyl alcohol 1:1:18 v/v) (Johansen 1940) for 24 hours and then transferred to 70% alcohol for anatomical study with a light microscope. The fixed material was embedded in (2-hydroxyethyl)-methacrylate (Leica Historesin Embedding Kit) (Feder and O'Brien 1968) and sectioned with a rotary microtome (RM 2245, Leica). The anatomical sections were stained with

periodic acid-Schiff (PAS) and toluidine blue in 0.05% sodium borate (Feder and O'Brien 1968) and mounted in permanent slides with Entellan (Merck). The anatomical sections were photodocumented by an image capturing device (Leica, DFC 450) attached to a microscope (Leica, DM 4000B), using the LAS image digitization program (Leica Application Suite V4.0.0).

The nomenclature proposed by Giulietti *et al.* (1986) was used for seed shape, and the terminology proposed by Barthlott (1981) for the seed coat descriptions. The terminology for post-seminal development was based on Tillich (2007).

3. Results

The seeds of *Leiothrix* vary in length from 0.38mm to 1.12mm and may be elliptical as in *L. argentea* Silveira, *L. argyroderma*, *L. beckii*, *L. curvifolia*, *L. flavescens*, *L. fluitans* and *L. raymondii* (Figs. 1A-G), or oval as in *L. angustifolia*, *L. arrecta*, *L. echinocephala* Ruhland, *L. luxurians* (Körn.) Ruhland, *L. sclerophylla* and *L. vivipara* (Bong.) Ruhland (Figs. 1H-M).

The seed coat in *Leiothrix* has a primary sculpture formed from the cells of the inner layer of the outer integument, which can be observed both in non-imbibed seeds (Figs. 1A-M) and in the details of imbibed seeds (Figs. 2A-O). The cells of the primary sculpture may be isodiametric, as in *L. angustifolia*, *L. argentea*, *L. curvifolia*, *L. echinocephala*, *L. flavescens*, *L. fluitans*, and *L. raymondii* (Figs. 2A-E, 2H-I, 2N-O); or hexagonal, as in *L. argyroderma*, *L. arrecta*, *L. beckii*, *L. luxurians*, *L. sclerophylla* and *L. vivipara* (Figs. 2F-G, 2J-M). They may have concave outer periclinal walls in all the species (Figs. 2A-O). The anticlinal walls of these cells are somewhat sinuose where they meet, as in *L. angustifolia*, *L. flavescens* and *L. raymondii* (Figs. 2B-C, 2H, 2N), or straight as in *L. argentea*, *L. argyroderma*, *L. arrecta*, *L. beckii*, *L. curvifolia*, *L. echinocephala*, *L. fluitans*, *L. luxurians*, *L. sclerophylla* and *L. vivipara* (Figs. 2A, 2D-G, 2I-M, 2O).

Most species have secondary sculpture on the seed coat in addition to the primary sculpture (Figs. 1A-D, 1F, 1H-M, 2A-D, 2F, 2H-O), apart from *L. curvifolia* and *L. beckii* (Figs. 1E, 1G, 2E, 2G), which have only primary sculpture. The secondary sculpture exhibits the relief left by the thickenings of the cell walls of the inner layer of the outer integument, which persist in most species

and appear as striae (Figs. 1A-D, 1F, 1H-M). These striae may be continuous as in *L. argentea*, *L. flavescens* and *L. raymondii* (Figs. 1A-C, 2A), or discontinuous as in *L. angustifolia*, *L. argyroderma*, *L. arrecta*, *L. echinocephala*, *L. fluitans*, *L. luxurians*, *L. sclerophylla* and *L. vivipara* (Figs. 1D, 1F, 1H-M, 2D, 2I, 2L). The striae may have an annular pattern (Figs. 1A-D, 1F, 1H-M), and the annulus may be smooth (Fig. 2N) or microstriate (Fig. 2O) when examined in detail; they may also occur isolated (Figs. 1A-C, 1H, 2A-C, 2H), connected (Figs. 1D, 1F, 1I-J, 1L, 2D, 2I, 2L) or cruciform (Figs. 1K, 1M, 2K, 2M).

The hilum of *Leiothrix* seeds may be inconspicuous as in *L. fluitans* (Fig. 1D) or conspicuous and acute as in *L. angustifolia*, *L. argentea*, *L. argyroderma*, *L. beckii*, *L. curvifolia*, *L. flavescens*, *L. raymondii* and *L. sclerophylla* (Figs. 1A-C, 1E-H, 1J), or curved acute as in *L. arrecta*, *L. echinocephala*, *L. luxurians* and *L. vivipara* (Figs. 1I, 1K-M). The micropyle may be conspicuous and obtuse as in *L. angustifolia*, *L. argentea*, *L. argyroderma*, *L. arrecta*, *L. beckii*, *L. echinocephala*, *L. flavescens*, *L. luxurians*, *L. raymondii*, *L. sclerophylla* and *L. vivipara* (Figs. 1A-C, 1F-M), or cuspidate as in *L. curvifolia* (Fig. 1E), or may be inconspicuous as in *L. fluitans* (Fig. 1D).

If germinating at all, the seeds have a high germination rate (>85%) (Table 2). Of the nine species tested, only *L. fluitans*, *L. raymondii* and *L. sclerophylla* germinated; the time for the emergence of the seedling structures can be seen in Table 2. The imbibed seed (Figs. 3A-B) has an embryo (em) reduced in size compared to the endosperm (en) and the micropylar region with operculum (Fig. 3B). The cells of the embryo situated in front of the micropylar region form the root pole (rp) with primary root aborted (Figs. 3C, 3G). Germination takes place with the emergence of the embrionic axis (ea) by means of the separation of tissues, leading to the rupture of the seed coat in the micropylar region (Figs. 3C-D) between five and twenty days after imbibition. The embrionic axis is composed of meristematic cells (Fig. 3D). After the lengthening of the embrionic axis cells the rhizoids collar (rc) differentiates (Figs. 3E-F) between nine and twenty days after imbibition. The embrionic axis cells elongate (Fig. 3D) and divide (Fig. 3F). The embryonic axis develops and later (Fig. 3G) differentiates initially in an eophyll (eo) and, later, in a shoot-born root (sr) (Fig. 3H). The first eophyll develops from fourteen to twenty six days after imbibition

(Figs. 3I-J), followed by the second eophyll which develops from 22 to 33 days after seed imbibition (Figs. 3K-L). During seedling development the haustorial cotyledon cells remain in contact with the endosperm and are of larger size and have more pronounced nuclei than the rest (Figs. 3D, 3F, 3H, 3J, 3K).

Some morphological characteristics of the seeds of representative species of *Leiothrix* are shown in Table 3 to facilitate understanding and discussion.

4. Discussion

The seeds of *Leiothrix* are varied in shape, as are those of other genera in the family such as *Eriocaulon* (Nair 1987; Zona *et al.* 2012), *Lachnocaulon* Kunth (Zona *et al.* 2012), *Syngonanthus* (Zona *et al.* 2012; Barreto *et al.* 2013) and *Comanthera* (Barreto *et al.* 2013; Corretor *et al.* 2015). Despite the variation, the seed shape in *Leiothrix* is constant in some groups and may be considered as one of the diagnostic characters of *L. subg. Rheocaulon* (elliptical seeds) and *L. subg. Stephanophyllum* (oval seeds).

In *Leiothrix* the species with oval seeds have smaller stature and short scapes whereas the species with elliptical seeds are of greater size and have long scapes. Scape length in *Leiothrix* species may be related to the aerodynamics of seed dispersal (Trovó and Stützel 2011), especially in constantly windy habitats. It is believed that elliptical seeds, because they are narrower than others can be dispersed to greater distances and thus colonize different habitats from that of the mother plant. Since the female flowers are arranged concentrically in the capitula of *L. flavescens*, its seeds can be projected long distances by means of the rupture of the pericarp and this could explain the extensive geographic distribution of this species, which occurs throughout the Cadeia do Espinhaço, in the coastal restingas of Brazil and reaching as far as the Venezuelan tepuis.

The *Leiothrix* species with oval seeds are those with ranges restricted to a few localities in the Cadeia do Espinhaço such as *L. subg. Stephanophyllum*, the only monophyletic subgenus (Andrade *et al.* 2010; Giulietti *et al.* 2012; Trovó *et al.* 2013; Echternacht *et al.* 2014). These species exhibited the least quantity of seeds per capitulum: one in *L. luxurians* (collected in May 2018) and up to

three in *L. arrecta* (collected in August 2019) and *L. vivipara* (collected in May 2018), which could be explained by the occurrence of asexual reproduction by vegetative multiplication, one of the diagnostic characters of the subgenus. Oval seeds were also observed in species of other subgenera of *Leiothrix*, as for example in *L.* subg. *Eleutherandra*, in *L. sclerophylla*, for which the dispersal of complete capitula was observed (Mascarenhas, pers. comm.). It could explain the restricted distribution of this species, since when the capitula reach the ground their seeds are likely to germinate near the mother plant.

The term testa is used by many authors to describe the seed coat. According to Font Quer (1979), the testa is the outer covering of the seed. For the Eriocaulaceae, Phillips (1996) and Zona *et al.* (2012) used this term to describe the whole seed covering. However, embryological and seed developmental studies use the term testa according to its origin, which is from the outer integument of the ovule (Johri *et al.* 1992). Therefore, the outer and inner integument of the ovule, after undergoing structural modification in development, is respectively called the testa and the tegmen (Johri *et al.* 1992). The latter authors stated that one or more of these cell layers may in some cases collapse during seed maturation. In embryological studies of *Leiothrix fluitans*, Monteiro-Scanavacca and Mazzoni (1978) showed that the cells of the outer layer of the outer integument of the seeds have thickened walls and the cells of the inner layer of the outer integument elongated during development. In a study of testa sculpture of mature seeds of Eriocaulaceae, Giulietti *et al.* (1986) stated that during seed development in *L. fluitans* and *L. spiralis* (Bong.) Ruhland, the cells of the outer layer of the outer integument remained intact with only cell thickenings, whereas in the representatives of the other genera the cells of the outer layer of the outer integument elongated initially and later ruptured, thus bringing about the seed coat ornamentations observed.

Later on, Scatena and Bouman (2001), by means of embryological and seed developmental studies of *Paepalanthus* sect. *Actinocephalus* (Koern.) Ruhland, stated that the cells of the outer layer of the outer integument disintegrated and the anticlinal walls of the cells of the inner layer of the outer integument thicken during development and it is this that produces the seed coat ornamentation. Coan *et al.* (2007; 2010) studied the development of the seeds in six genera of

Eriocaulaceae, including *Leiothrix* (*L. flavescens*) and confirmed the findings of Scatena and Bouman (2001), concluding that most Eriocaulaceae have endotestal seeds.

Although in most Eriocaulaceae seeds the striate seed coat ornamentation is derived from the thickening of the anticlinal walls of the inner layer of the outer integument, there are some species of *Eriocaulon* and *Paepalanthus* in which the disintegration of the outer layer of the outer integument does not occur (Stützel 1998; Davies *et al.* 2007). The same may occur in *L. beckii* and *L. curvifolia* which do not have striate seed coat ornamentation, and this suggests the need for future developmental studies of these seeds to clarify their structure. On comparing seed coat ornamentation between species of *Comanthera* and *L. vivipara*, Barreto *et al.* (2013) stated that the former had a distinct origin, and that whereas in *Leiothrix* the projections originate from the outer layer of the outer integument thus forming the striated pattern, in *Comanthera* the projections originate from the inner layer and are the cause of the rugose pattern. It is likely that in *Leiothrix* as in the rest of the Eriocaulaceae, there may be variation in the origin and development of the seed structures that give rise to the different kinds of ornamentation observed and this is an aspect of the group's diversity.

The primary sculpture of the seeds of *Leiothrix* is important for the identification of the species of *L.* subg. *Eleutherandra* and *L.* subg. *Stephanophyllum* (Table 3), two of the subgenera described by Ruhland (1903). Primary sculpture also varies according to subgeneric limits in *Comanthera* (Barreto *et al.* 2013). These data corroborate Barthlott (1981), who stated that primary sculpture is of significant taxonomic importance in diverse groups of plants. The majority of the species of *Leiothrix* have secondary seed sculpture, which produces their striated ornamentation and which may aid in seed imbibition during germination, since they expand on contact with water and give the seeds a gelatinous appearance. Striate seed coats in other monocot groups such as the Orchidaceae are also related to the establishment of the seed on the substrate since after seed imbibition the striae expand and help to fix the seed in its habitat (Barthlott 1981).

The seed germination characters we observed in *Leiothrix* are common to those of the other Eriocaulaceae so far studied (Scatena *et al.* 1993; 1996; Kraus *et al.* 1996; Corredor *et al.* 2015), i.e.

rapid germination by protrusion of the embryonic axis and appearance of a shoot-born root after the development of the first eophyll. The germination rate is high in *Leiothrix* and seedling growth is rapid in comparison to other monocotyledons, and the same is true for species of *Comanthera*, *Eriocaulon*, *Paepalanthus*, and *Syngonanthus* (Ramaswamy *et al.* 1981; Scatena *et al.* 1993; 1996; Kraus *et al.* 1996; Corredor *et al.* 2015).

The species of *Leiothrix* occur in aquatic habitats (e.g. *L. fluitans*), and in open (e.g. *L. sclerophylla*) and shaded (e.g. *L. raymondii* Giul. & Silva) areas, but all have a high rate of germination. The seeds of *Leiothrix* are positively photoblastic, which is also characteristic of other plant groups typical of *campo rupestre* vegetation such as Xyridaceae and Velloziaceae (Oliveira and Garcia 2005; 2011).

The embryo of *Leiothrix* seeds is undifferentiated as in other genera of Eriocaulaceae (Ramaswamy *et al.* 1981; Scatena *et al.* 1993; 1996; Kraus *et al.* 1996; Corredor *et al.* 2015). The same occurs in species of Mayacaceae and Xyridaceae (Venturelli and Bouman 1986; Nardi *et al.* 2015; Nardi 2018), and this is a character common to the families of the xyrid clade and of other families of the Poales (Baskin and Baskin 2018). During the post-seminal development of *Leiothrix* the seedling structures are the same as those observed in *Eriocaulon*, *Paepalanthus*, *Syngonanthus* and *Comanthera* (Ramaswamy *et al.* 1981; Scatena *et al.* 1993; 1996; Kraus *et al.* 1996; Corredor *et al.* 2015), forming a pattern for the Eriocaulaceae.

The seedling development in *Leiothrix* also follows the pattern described for the other genera of Eriocaulaceae (Ramaswamy *et al.* 1981; Scatena *et al.* 1993; 1996; Kraus *et al.* 1996; Corredor *et al.* 2015). According to Tillich (2007), the haustorial cotyledon is considered ancestral for the Poales, since it is present in most families: Bromeliaceae, Eriocaulaceae, Rapateaceae, Restionaceae and Xyridaceae (*Orectanthe* Maguire).

As in the other genera of Eriocaulaceae, the primary root aborts in *Leiothrix* at the beginning of germination, leaving only cellular remnants, as described originally by Scatena *et al.* (1993) for *Syngonanthus rufipes*. The degeneration of the primary root in Eriocaulaceae probably occurs because the root apex is covered by a rigid structure (the operculum) and as a result the root cannot

penetrate the soil (Scatena *et al.* 1993; 1996; Kraus *et al.* 1996; Corredor *et al.* 2015). The presence of numerous rhizoids in Eriocaulaceae was indicated by Tillich (2007) to be a compensation for the absence of the primary root, with the rhizoids carrying out the functions of absorption and fixation followed by the development of adventitious roots. The species of *Leiothrix* studied here and other species of the family which have been investigated all show the same developmental pattern, in which the development of the first eophyll precedes that of the shoot-born root (Ramaswamy *et al.* 1981; Scatena *et al.* 1993; 1996; Kraus *et al.* 1996; Corredor *et al.* 2015).

Since the primary root degenerates in the Eriocaulaceae (Scatena *et al.* 1993; 1996; Kraus *et al.* 1996; Corredor *et al.* 2015), leaf development is one of the first post-germination stages and in *Syngonanthus* is considered to be an adaptive factor according to Oliveira and Garcia (2005; 2011). These species occur in habitats of high light intensity and obtain the energy they need for seedling establishment by photosynthesis.

The results of this study show that most of the morphological seed characters of *Leiothrix* species are important for their identification and that features of their germination and post-seminal development are similar to those of the other taxa of Eriocaulaceae.

Acknowledgments

We are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the PhD grant awarded to AASM and to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the research productivity grant awarded to VLS. We thank the researchers Dr. Marcelo Trovó and Ms. Wellerson Picanço for collecting and sending us seeds of *Leiothrix argyroderma* and *L. beckii*. We are grateful to the reviewers for their valuable contributions; we also thank Simon Mayo for the translation of the manuscript into English. Patrimônio Genético/CTA nº ADFB275.

We hereby declare that there is no conflict of interest.

References

- Alff, C.C. 2020: An updated overview of Eriocaulaceae in subtropical South America. – MSc. dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, Rio Grande do Sul.
- Andrade, M.J.G.; Giulietti, A.M.; Rapini, A.; Queiroz, L.P.; Conceição, A.S.; Almeida, P.R.M. & van den Berg, C. 2010: A comprehensive phylogenetic analysis of Eriocaulaceae: Evidence from nuclear (ITS) and plastid (psbA-trnH and trnL-F) DNA sequences. - *Taxon* 59 (2): 379-388.
- Barreto, L.; Echternacht, L. & García, Q.S. 2013: Seed coat sculpture in *Comanthera* (Eriocaulaceae) and its implications on taxonomy and phylogenetics. - *Plant Syst Evol* 299: 1461-1469.
- Barthlott, W. 1981: Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. - *Nord J Bot* 1: 345-355.
- Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 2018: Resolving the puzzle of Martin's broad embryo: A solution based on morphology, taxonomy and phylogeny. - *P Plant Eco Evo Syst* 34: 61-67.
- Coan, A.I.; Rosa, M.M. & Scatena, V.L. 2007: Embryology and seed development of *Syngonanthus caulescens* (Poir.) Ruhland (Eriocaulaceae-Poales). - *Aqua Bot* 86: 148-156.
- Coan, A.I.; Stützel, T. & Scatena, V.L. 2010: Comparative embryology and taxonomic considerations in Eriocaulaceae (Poales). - *Feddes Repert* 121 (7-8): 268-284.
- Corredor, B.A.D.; Escobar, D.F.E. & Scatena, V.L. 2015: Morfología de semillas y desarrollo post-seminal de especies de *Comanthera* (Eriocaulaceae). - *Rev Biol Trop* 63 (4): 1127-1135.
- Darshetkar, A.M.; Datar, M.N.; Tamhankar, S.; Li, P. & Choudhary, R.K. 2019: Understanding evolution in Poales: Insights from Eriocaulaceae plastome. - *Plos One* 14 (8): 1-16.
- Davies, R.J.P.; Craigie, A.I.; Mackay, D.A.; Whalen, M.A.; Cheong, J.P.E. & Leach, G.J. 2007: Resolution of the taxonomy of *Eriocaulon* (Eriocaulaceae) taxa endemic to Australian mound springs, using morphometrics and AFLP markers. - *Austral Syst Bot* 20: 428–447.
- Echternacht, L.; Sano, P.T.; Bonillo, C.; Cruaud, C.; Coulou, A. & Dubuisson, J.Y. 2014: Phylogeny and taxonomy of *Syngonanthus* and *Comanthera* (Eriocaulaceae): Evidence from expanded sampling. - *Taxon* 63 (1): 47-63.

- Feder, N. & O'Brien, T. 1968: Plant microtechnique: some principles and new methods. - *Am J Bot* 55: 123-142.
- Flora do Brasil. 2020 em construção: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB7541>>. (acesso em: 10 Mar. 2020).
- Font Quer, D.P. 1953: Diccionario de Botánica: 1039. Editorial Labor S.A., Barcelona.
- Giulietti, A.M.; Monteiro, W.R.; Mayo, S.J. & Stephens, J. 1986: A preliminary survey of testa sculpture in Eriocaulaceae. - *Beitr Biol Pflanzen* 62: 189-209.
- Giulietti, A.M.; Amaral, M.C.E. & Bittrich, V. 1995: Phylogenetic analysis of inter and infrageneric relationships of *Leiothrix* Ruhland (Eriocaulaceae). - *Kew Bull* 50: 55-71.
- Giulietti, A.M.; Andrade, M.J.G.; Scatena, V.L.; Trovó, M.; Coan, A.I.; Sano, P.T.; Santos, F.A.R.; Borges, R.L.B. & van Den Berg, C. 2012: Molecular phylogeny, morphology and their implications for the taxonomy of Eriocaulaceae. - *Rodriguesia* 63 (1): 1-19.
- Hensold, N. & Giulietti, A.M. 1991: Revision and redefinition of the genus *Rondonanthus* Herzog (Eriocaulaceae). - *Ann Mo Bot Gard* 78: 441-459.
- Johri, B.M.; Ambegaokar, K.B. & Srivastava, P. S. 1992: Comparative embryology of angiosperms, vol. 1: 97 - 101. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Johansen, D.A. 1940: Botanical Microtechnique: 523. - Mc Graw Hill Book. - New York, NY.
- Kraus, J.E.; Scatena, V.L.; Lewinger, M.U. & Trench, K.U. 1996: Morfologia externa e interna de quatro espécies de *Paepalanthus* Kunth (Eriocaulaceae) em desenvolvimento pós-seminal. - *Bol Bot Univer S Paulo* 15: 45-53.
- Monteiro-Scanavacca, W.R. & Mazzoni, S.C. 1978: Embryological studies in *Leiothrix fluitans* (Mart.) Ruhl. (Eriocaulaceae). - *Rev Bras Bot* 1: 59-64.
- Nair, R.V. 1987: Taxonomic significance of seed coat morphology in *Eriocaulon* Linn. (Eriocaulaceae). - *Seed Sci Techn* 15: 297-310.
- Nardi, K.O.; Scatena, V.L. & Oriani, A. 2015: Development of ovule, fruit and seed of *Xyris* (Xyridaceae, Poales) and taxonomic considerations. - *Bot J Linn Soc* 177: 619-628.

- Nardi, K.O. 2018: Embriogênese e desenvolvimento pós-seminal de Xyridaceae e Mayacaceae e anatomia floral de *Xyris*, com ênfase na evolução de caracteres. – PhD thesis, Universidade Estadual Paulista ‘Julio de Mesquita Filho’ - Rio Claro, São Paulo.
- Oliveira, P.G. & Garcia, Q.S. 2005: Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Syngonanthus elegantulus* Ruhland, *S. elegans* (Bong.) Ruhland e *S. venustus* Silveira (Eriocaulaceae). - *Acta Bot Bras* 19 (3): 639-645.
- Oliveira, P.G. & Garcia, Q.S. 2011: Germination characteristics of *Syngonanthus* seeds (Eriocaulaceae) in campos rupestres vegetation in south-eastern Brazil. - *Seed Sci Resear* 21: 39-45.
- Phillips, S.M. 1999: *Eriocaulon schimperi* (Eriocaulaceae) and some related species in Eastern Africa. - *Kew Bull* 51 (2): 333-342.
- Ramaswamy, S.N., Swamy B.G.L. & Arekal, G.D. 1981: From zygote to seedling in *Eriocaulon robusto-brownianum* Ruhl. (Eriocaulaceae). - *Beitr Biol Pflanzen* 55: 179-188.
- Ranal, M.A. & Santana, D.G. 2006: How and why to measure the germination process? - *Rev Bras Bot* 29: 1-11.
- Ruhland, W. 1903: Eriocaulaceae: 225 - 239. - In: Engler A (ed) Das Pflanzenreich, vol 13.
- Scatena, V.L.; Menezes, N.L. & Stützel, T. 1993: Embriology and seedling development in *Syngonanthus rufipes* Silveira (Eriocaulaceae). - *Beitr Biol Pflanzen* 67: 333-343.
- Scatena, V.L.; Lemos-Filho, J.P. & Lima, A.A.A. 1996: Morfologia do desenvolvimento pós-seminal de *Syngonanthus elegans* e *S. niveus* (Eriocaulaceae). - *Acta Bot Bras* 10: 85-91.
- Scatena, V.L. & Bouman, F. 2001: Embryology and seed development of *Paepalanthus* sect. *Actinocephalus* (Koern.) Ruhland (Eriocaulaceae). - *Plant Biol* 3: 341-350.
- Stützel, T. 1998: Eriocaulaceae - 197-207. - In K. Kubitzki [ed.], The families and genera of vascular plants, vol. IV, Flowering Plants: Monocotyledons – Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Tillich, H.J. 2007: Seedling diversity and the homologies of seedling organs in the order Poales (Monocotyledons). - *Ann Bot* 100: 1413-1429.

- Trovó, M. & Stützel, T. 2011: Diaspores in Eriocaulaceae: morphology, mechanisms, and implications. - *Feddes Repert* 122: 1-9.
- Trovó, M.; Andrade, M.J.G.; Sano, P.T.; Ribeiro, P.L. & Van den Berg, C. 2013: Molecular phylogenetics and biogeography of Neotropical Paepalanthoideae with emphasis on Brazilian *Paepalanthus* (Eriocaulaceae). - *Bot J Linn Soc* 171: 225-243.
- Venturelli, M. & Bouman, F. 1986: Embryology and seed development in *Mayaca fluviatilis* (Mayacaceae). - *Acta Bot Neerl* 35: 497–516.
- Zona, S.; Davis, P.; Gunathilake, L.A.A.H.; Prince, J. & Horn, J.W. 2012: Seeds of Eriocaulaceae of the United States and Canada. - *Castanea* 77 (1): 37-45.

Legends

Figure 1. Morphology of seeds of *Leiothrix* observed in scanning electron microscope (SEM). (A) *L. argentea*, (B) *L. flavescens*, (C) *L. raymondii*, (D) *L. fluitans*, (E) *L. curvifolia*, (F) *L. argyroderma*, (G) *L. beckii*, (H) *L. angustifolia*, (I) *L. echinocephala*, (J) *L. sclerophylla*, (K) *L. arrecta*, (L) *L. luxurians* and (M) *L. vivipara*. Scale: A-B, D-G, K-M=100µm; C, H-J= 50µm

Figure 2. Details of the seed coat imbibed of *Leiothrix* under the scanning electron microscope (SEM). (A) *L. argentea*, (B) *L. flavescens*, (C) *L. raymondii*, (D, O) *L. fluitans*, (E) *L. curvifolia*, (F) *L. argyroderma*, (G) *L. beckii*, (H, N) *L. angustifolia*, (I) *L. echinocephala*, (J) *L. sclerophylla*, (K) *L. arrecta*, (L) *L. luxurians* and (M) *L. vivipara*. Scale: A-O=10µm.

Figure 3. Morphology of post-seminal development in *Leiothrix* under the stereomicroscope and light microscope. (A, I) *L. sclerophylla*, (B-D, G-H, J) *L. raymondii* and (E-F, K-L) *L. fluitans*. (ea) embryonic axis, (em) embryo, (en) endosperm, (eo) eophyll, (hc) haustorial cotyledon cells, (op) operculum, (pr) primary root, (rc) rhizoid collar, (rp) root pole, (sr) shoot-born root. Scale: A, C, E, G, I, L= 20 mm; B, D, F, H, J, K= 40µm.

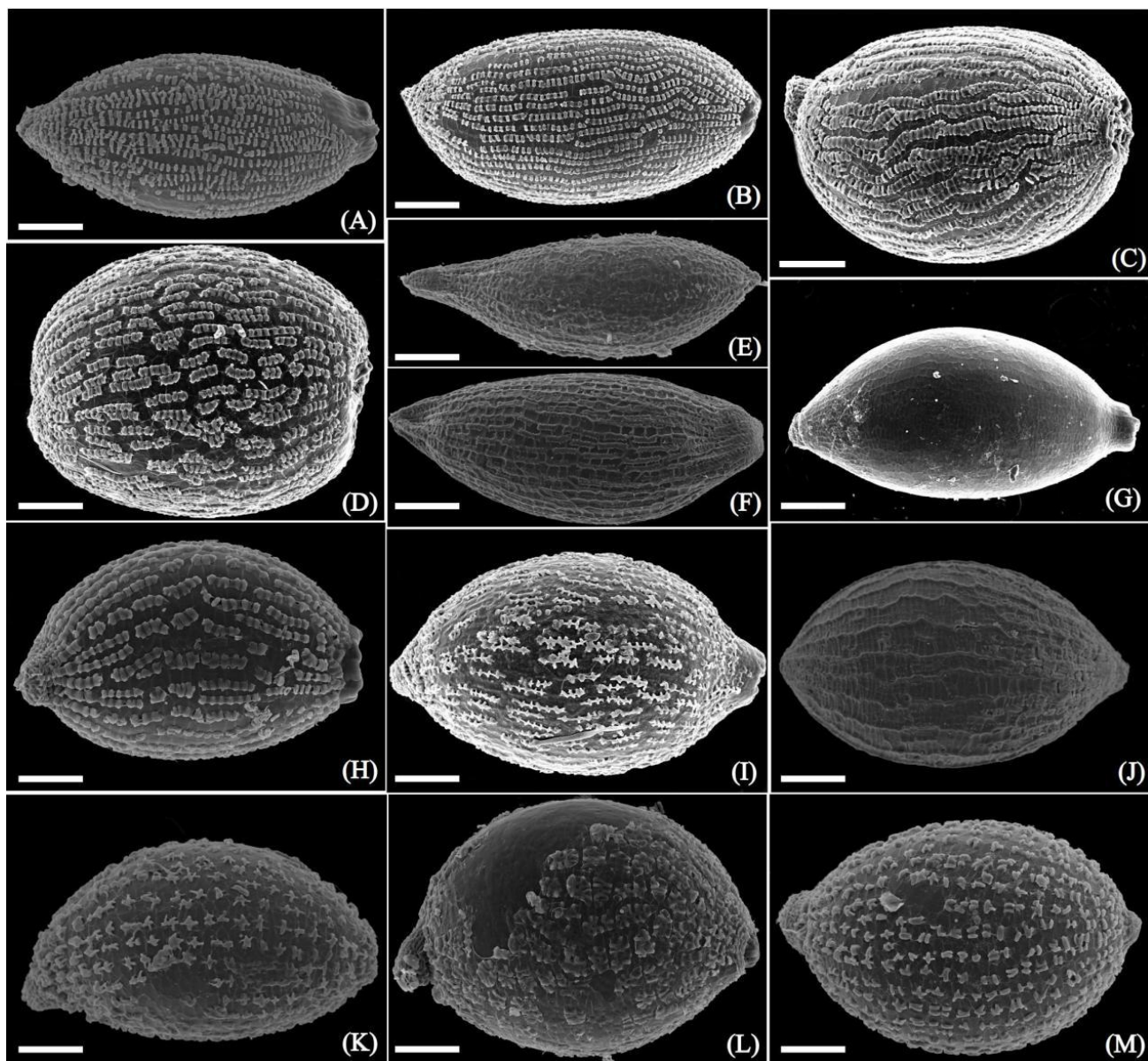


Figure 1

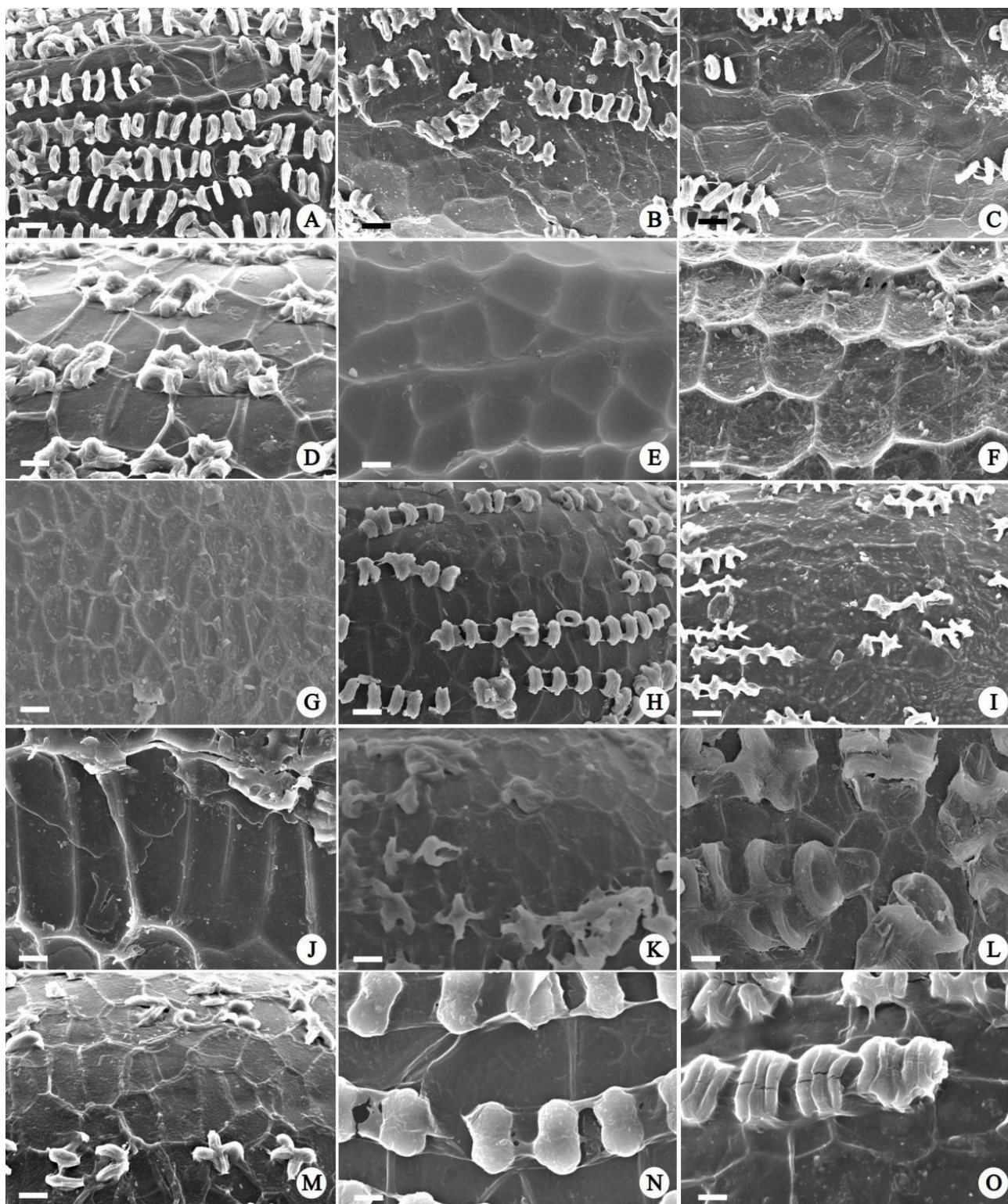


Figure 2

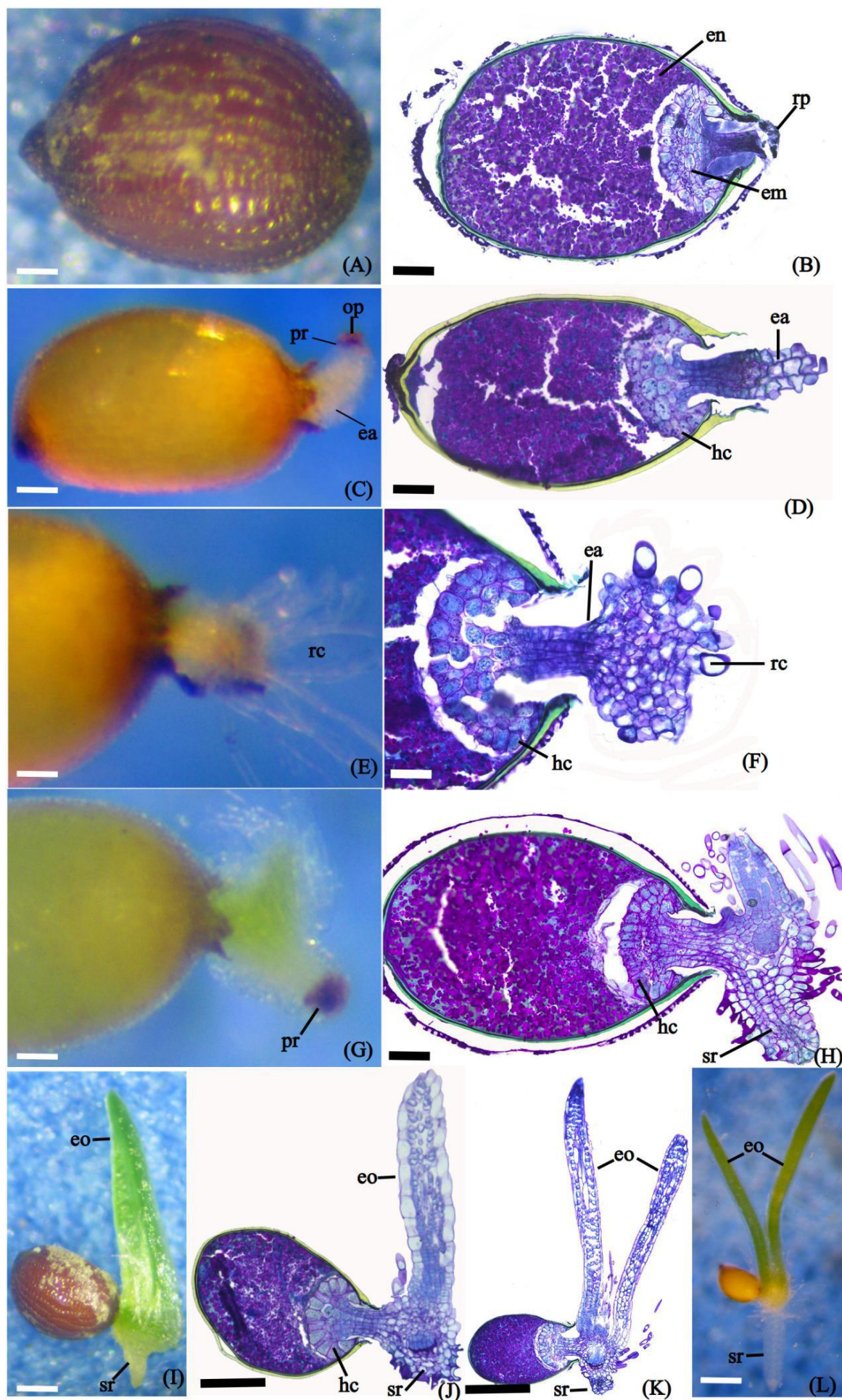


Figure 3

Tables

Table 1. Brazilian species of *Leiothrix* used in studies of seed morphology and post-seminal development*

Ruhland (1903)	Species	Collector and collector's number
<i>Leiothrix</i> subg. <i>Calyccephalus</i>	* <i>L. angustifolia</i> (Körn.) Ruhland	Mascarenhas et al. 382; 387
	<i>L. argentea</i> Silveira	Mascarenhas et al. 403
	* <i>L. curvifolia</i> (Bong.) Ruhland	Mascarenhas et al. 395; Sauthier 107
	<i>L. echinocephala</i> Ruhland	Mascarenhas et al. 399
	* <i>L. flavescens</i> (Bong.) Ruhland	Mascarenhas et al. 330; 359
	* <i>L. raymondii</i> Giul & Silva	Mascarenhas et al. 374
<i>Leiothrix</i> subg. <i>Rheocaulon</i>	* <i>L. fluitans</i> (Mart.) Ruhland	Mascarenhas 398; 422
<i>Leiothrix</i> subg. <i>Eleutherandra</i>	* <i>L. argyroderma</i> Ruhland	Castellanos 21899; Löfgren 3580
	* <i>L. beckii</i> (Szyszyl.) Ruhland	Silva 6; Barreto 82; Braga 2310
	* <i>L. sclerophylla</i> Silveira	Mascarenhas 410
<i>Leiothrix</i> subg. <i>Stephanophyllum</i>	* <i>L. arrecta</i> Ruhland	Mascarenhas 421
	<i>L. luxurians</i> (Körn.) Ruhland	Mascarenhas 352
	<i>L. vivipara</i> (Bong.) Ruhland	Sauthier 108

(*) species studied in post-seminal development

Table 2. Germination percentage, mean time to beginning of germination (in days) and start and end time (in days) for the appearance of the organs in the seedlings of *Leiothrix*

Species	Germination (%)	Embrionic axis		Collar of rhizoids		First eophyll		Shoot-born root		Second eophyll	
		Mean time (in days)	Start - end time (in days)	Mean time (in days)	Start - end time (in days)	Mean time (in days)	Start - end time (in days)	Mean time (in days)	Start - end time (in days)	Mean time (in days)	Start - end time (in days)
<i>L. fluitans</i>	92%	5.05±0.35	5 - 9	7.73±1.95	10 - 15	17.21±2.73	16 - 26	19.85±2.49	18 - 23	23.66±7.12	23 - 28
<i>L. raymondii</i>	89%	5.85±0.97	5 - 20	7.98±1.41	9 - 12	15.75±2.02	15 - 20	18.03±2.98	18 - 21	23.04±2.04	22 - 33
<i>L. sclerophylla</i>	85%	7.28±1.95	5 - 12	10.76±1.32	9 - 13	14.64±1.25	14 - 20	20.5±2.12	15 - 22	23.65±4.45	23 - 32

Table 3. Morphological characteristics of seeds of *Leiothrix* Brazilian species

Ruland (1903)	Species	Seed shape	Hilum shape	Micropyle shape	Outline of cells	Anticlin al walls	Surface pattern	Striated shape
	<i>L. angustifolia</i>	Oval	Acute	Obtuse	Isodiametric	Sinuate	Discontinuos Striated	Isolated Annular
<i>L. subg. Calycocephalus</i>	<i>L. argentea</i>	Elliptical	Acute	Obtuse	Isodiametric	Straight	Continuos Striated	Isolated Annular
	<i>L. curvifolia</i>	Elliptical	Acute	Cuspidate	Isodiametric	Straight	Without Striated	Without Annular
	<i>L. echinocephala</i>	Oval	Acute Curved	Obtuse	Isodiametric	Straight	Discontinuos Striated	Connected Annular
	<i>L. flavescens</i>	Elliptical	Agudo	Obtuse	Isodiametric	Sinuate	Continuos Striated	Isolated Annular
	<i>L. raymondii</i>	Elliptical	Acute	Obtuse	Isodiametric	Sinuate	Continuos Striated	Isolated Annular
<i>L. subg. Eleutherandra</i>	<i>L. argyroderma</i>	Elliptical	Acute	Obtuse	Hexagonal	Straight	Discontinuos Striated	Connected Annular
	<i>L. beckii</i>	Elliptical	Acute	Obtuse	Hexagonal	Straight	Without Striated	Without Annular
	<i>L. sclerophylla</i>	Oval	Acute	Obtuse	Hexagonal	Straight	Discontinuos Striated	Connected Annular
<i>L. subg. Rheocaulon</i>	<i>L. fluitans</i>	Elliptical	Inconspicuous	Inconspicuous	Isodiametric	Straight	Discontinuos Striated	Connected Annular
	<i>L. arrecta</i>	Oval	Acute Curved	Obtuse	Hexagonal	Straight	Discontinuos Striated	Cruciform Annular
<i>L. subg. Stephanophyllum</i>	<i>L. luxurians</i>	Oval	Acute Curved	Obtuse	Hexagonal	Straight	Discontinuos Striated	Connected Annular
	<i>L. vivipara</i>	Oval	Acute Curved	Obtuse	Hexagonal	Straight	Discontinuos Striated	Cruciform Annular

CAPÍTULO 3: Leaf and scape anatomy of *Leiothrix* Ruhland (Eriocaulaceae) from a taxonomic and ecological perspective
(Artigo publicado na *Flora*)

Mascarenhas AAS, Giulietti-Harley AM, Scatena VL. 2020. Leaf and scape anatomy of *Leiothrix* Ruhland (Eriocaulaceae) from a taxonomic and ecological perspective. *Flora* 262:1–10. doi: doi.org/10.1016/j.flora.2019.151518

Leaf and scape anatomy of *Leiothrix* Ruhland (Eriocaulaceae) from a taxonomic and ecological perspective

Ana Angélica Silva Mascarenhas, Ana Maria Giuliatti Harley, Vera Lucia Scatena

Abstract: *Leiothrix* is endemic to South America with 47 species, only two of which do not occur in Brazil. Its distinguishing characters are habit, dialypetalous or gamopetalous corolla of the male flowers and presence or not of pseudovivipary. According to Ruhland's monograph (1903) there are five subgenera. Recent molecular and morphological analyses of the family show the genus to be monophyletic, but infrageneric relationships are not well established. The study objective was to investigate leaf and scape anatomy of representatives of the four subgenera that occur in Brazil in order to contribute to the taxonomy and better understand the plants' environmental adaptations. *Leiothrix* anatomy is similar to that of other Eriocaulaceae genera: leaves and scapes have a single-layered epidermis, collateral vascular bundles are surrounded by a double sheath, leaves have stomata only on the abaxial side, and scapes have alternating vascular bundles of larger and smaller size. *Leiothrix* subg. *Rheocaulon* is monospecific, leaves have a single vascular bundle, scapes lack ribs, the epidermal cells have slightly thickened walls, and the cortex contains collenchyma and chlorophyllous parenchyma. In *L.* subg. *Eleutherandra* the leaf epidermis cell walls have homogeneous thickening at the margins, specialized substomatal chambers, a hypodermis, and sclerenchymatous extensions of the vascular bundle sheaths. Most taxa of *L.* subg. *Calycocephalus* have smaller vascular bundle sheath extensions facing both surfaces and ribbed scapes. Species from Minas Gerais have a hypodermis and up to seven leaf vascular bundles; those from Bahia lack a hypodermis and have more than seven leaf vascular bundles. *L.* subg. *Stephanophyllum* has scapes with a cylindric multilayered pericycle with thickened and lignified cell walls. These anatomical structures partly corroborate the subgenera proposed by Ruhland, suggest the existence of other infrageneric groups and reflect the environmental adaptations of the studied species.

Key-Words: adaptations, anatomical structures, Eriocaulaceae, systematics

1. Introduction

Leiothrix Ruhland is a genus restricted to South America (Giulietti and Hensold, 1990), with its centre of diversity in the Brazilian campos rupestres, especially in the Espinhaço mountain chain which extends through the interior of the states of Minas Gerais and Bahia, as well as in the "tepui" of Venezuela (Giulietti et al., 1995). Apart from *L. flavescens* (Bong.) Ruhland, which occurs in Brazil, Venezuela, Guiana and Peru, most of the species are endemic to limited mountainous areas of Minas Gerais and Bahia (Giulietti and Hensold, 1990).

In the only complete taxonomic revision of the Eriocaulaceae (Ruhland, 1903), *Leiothrix* was established based on 16 species of the genus *Paepalanthus* Mart., which were transferred species and new species described based on the styles united into a basal column, the nectariferous branches and stigmas separated from one another at different levels, and smooth, acute trichomes. The author recognized 28 species of *Leiothrix* in five subgenera, of which four occur in Brazil and one in Uruguay (*Leiothrix* subg. *Psilanthus*). Those in Brazil are: *Leiothrix* subg. *Rheocaulon*, with the single species *L. fluitans* (Mart.) Ruhland, from Minas Gerais, the only aquatic species in the genus, having a dialypetalous corolla in the staminate flower; *L.* subg. *Eleutherandra*, with three species, from Minas Gerais and São Paulo, having a dialypetalous corolla in the staminate flower and a terrestrial habit; *L.* subg. *Stephanophyllum*, with eight species, all from Minas Gerais, a gamopetalous corolla in the staminate flower and pseudovivipary (budding of new individuals linked to the mother plant with asexual descendants (Elmqvist and Cox, 1996; Coelho et al., 2006)) and *L.* subg. *Calycocephalus*, the largest in number of species (15) and a more generalist definition, with distribution in Brazil and Venezuela, with a gamopetalous corolla in the staminate flower and lacking pseudovivipary. Since Ruhland's monograph various new species and infraspecific taxa have been described and today 47 species and 18 further subspecific taxa are recognized for Brazil (Flora do Brasil 2020, 2019).

The first cladistic analysis carried out in the Eriocaulaceae, that included species of *Leiothrix*, was based on morphological data (Giulietti et al., 1995) and showed the genus to be monophyletic. Later cladistic analyses with species across the family and using both morphological

and molecular data (Giulietti et al., 2000; Andrade et al., 2010; Trovó et al., 2013; Echternacht et al., 2014), showed *Leiothrix* to be monophyletic with strong support, with the sister group comprising the genera *Syngonanthus* Ruhland and *Comanthera* L.B.Sm. (a genus split off from *Syngonanthus*).

The anatomy of vegetative and floral organs has contributed to understanding the taxonomy and ecology of the Eriocaulaceae. In *Syngonanthus* the type of thickening in the epidermal cells, the presence of a specialized substomatal chamber and the presence of a hypodermis in the leaves and scapes corroborates the sectional delimitations of the genus proposed by Ruhland (1903) as well as the separation of *Comanthera* (Scatena and Menezes, 1996; Scatena et al., 2004; Scatena et al., 2005; Parra et al., 2010). The genus *Actinocephalus* (Körn.) Sano is delimited by the form of the epidermal cells, the cell composition of the vascular bundle sheath extensions and the specialized (inverted "T") substomatal chambers (Oriani et al., 2005). The diagnostic characters of *Paepalanthus* sect. *Diphyomene* Ruhland are considered to be the epidermal cell wall thickenings of the leaves and scapes, the composition of the leaf hypodermis, the cross-sectional shape of the scape and the composition of the medulla (Alves et al., 2013; Trovó et al., 2010). Anatomy has aided the understanding of species complexes in *Leiothrix*. Scatena and Giulietti (1996), using morpho-anatomical data from different populations to synonymise *L. obtusifolia* Silveira and *L. nubigena* (Kunth) Ruhland within *L. crassifolia* (Bong.) Ruhland and to delimit *L. flavescens* var. *flavescens* (Bong.) Ruhland and *L. flavescens* var. *distichophylla* Silveira (Giulietti et al., 1998).

Anatomical studies of Eriocaulaceae have also helped in understanding structures in relation to their environment, as shown by Tomlinson (1969), Castro and Menezes (1995), Scatena and Giulietti (1996), Scatena and Menezes (1996), Giulietti et al. (1998), Oriani et al. (2005), and Oliveira and Oriani (2016). In species of *Leiothrix* from the Serra do Cipó, in the Espinhaço Range of Minas Gerais, Monteiro et al. (1985) interpreted the structure of the leaf as an adaptive response to the habitat, which may be terrestrial, between rocks, in dry or wet sandy soils or aquatic. Scatena and Rocha (1995) pointed out adaptations of *L. crassifolia* to the campo rupestre habitat. Coan et al. (2002) showed that *L. fluitans* has structures similar to those of aquatic species of other genera of the family.

Given the importance of anatomy for improving understanding of the taxonomy of the Eriocaulaceae, the objective of this study is to survey the leaf and scape anatomy of species of *Leiothrix* with the aim of contributing to its infrageneric classification, and to investigate the relationships between these structures and the habitats in which the species occur.

2. Materials and Methods

2.1 Collection of material

This anatomical study of leaves and scapes from 27 taxa of *Leiothrix* was carried out using samples from three localities. Data from previously published studies were used only for *L. crassifolia* (Scatena and Rocha, 1995; Scatena and Giulietti, 1996). Some species of *Leiothrix* were not included because they are known only from the type specimen. Collected material was fixed in FAA 50 (Johansen, 1940) and later transferred into 70% alcohol. The field collections were made in Rio de Contas and Mucugê (Bahia) and at Diamantina and the Serra do Cipó (Minas Gerais) and vouchers were deposited at the Rioclarense herbarium (HRCB) of the Instituto de Biociências at the Universidade Estadual Paulista (UNESP). This material was complemented with leaves and scapes taken from duplicates of specimens deposited at the herbaria of the Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri (DAM), Universidade de São Paulo (SPF), and the Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB) (Table 1).

2.2 Sample processing

The herbarium material was boiled in distilled water with drops of glycerine added to aid tissue expansion and then transferred to 70% alcohol. In both herbarium and fixed material freehand transverse sections were made in the median region of the leaves and scapes, using a barber's razor. The sections were stained with basic fuchsin and Astra blue (Roeser, 1962) and mounted in glycerine jelly as semi-permanent slides (Kaiser, 1880).

In addition, samples of leaves and scapes of fixed material were dehydrated in a butyl series, infiltrated with historesin (glycolmethacrylate - JB4/Polysciences), and embedded (Feder &

O'Brien, 1968) and transversely sectioned with a rotary microtome (RM 2245, Leica). The sections were stained in Periodic acid-Schiff reagent (PAS) and 0.05% Toluidine Blue in sodium borate (Feder & O'Brien, 1968) and mounted in synthetic resin (Entellan) as permanent slides.

Documentation of the results was made using photomicrographs obtained with an Leica LAS EZ Image Capture System attached to a Leica DM500 microscope.

3. Results

3.1 Leaf anatomy

The species studied have leaves with single-layered epidermis (Figs. 1-12, 22-30) composed of cells with thin (Figs. 1-3, 6-7, 10, 27, Table 2) or thick walls (Figs. 4-5, 8-9, 11-12, 22-26, 28-30, Table 2). When thick, the external cell wall may be thicker than the internal (Figs. 4-5, 11-12, 22, 30, Table 2) or the walls may have homogeneous thickening at the margins (Figs. 8, 28-29, Table 2). Most species have isodiametric epidermal cells as seen in cross-section (Figs. 1-6, 8-12, 22, 24, 28, 30) except *L. spiralis* (Figs. 7, 23, 29) and *L. argyroderma* (Table 2) in which the cells are elongated radially.

The leaves have stomata only on the abaxial surface (Figs. 1-12, 22-30). The stomata may be situated at the same level as the other epidermal cells (Figs. 5, 22-23) or lie above them (Figs. 9, 24). The substomatal chambers are ample and may be simple (Fig. 22, Table 2) or specialized (Figs. 23-26, Table 2). In the latter the cells of the chamber have thick walls and are u-shaped, as in *L. spiralis* (Figs. 23, 25), or i-shaped as in *L. sclerophylla* (Figs. 24, 26). In some species the trichomes have basal cells throughout the whole leaf epidermis (Figs. 2-4, 7, 27-28).

The leaves of all the species have collateral vascular bundles all arranged at the same level and alternating with chlorophyllous parenchyma (Figs. 1-4, 6-8, 10-12, 27-30). Most of the species studied have a hypodermis, which may be composed of collenchyma (Figs. 1, 12, 30, Table 2), sclerenchyma (Figs. 2, 4, 11, Table 2) or aquiferous parenchyma that consists of water-storage cells (Scatena and Menezes, 1996) (Figs. 8, 28, Table 2). The chlorophyllous parenchyma is composed

of one or two layers of peripheral palisade parenchyma and a variable number of layers of lacunar parenchyma (Figs. 1-4, 7-8, 11-12, 27-30), or it may be made up of isodiametric cells (Figs. 6, 10).

The mesophyll is discontinuous because of the presence of vascular bundle sheath extensions which may be composed of collenchyma (Figs. 1, 6, 8, 10, 12, 28, 30, Table 2), sclerenchyma (Figs. 2-3, 7, 11, 27, 29, Table 2) or both (Fig. 4). The vascular bundles are collateral and surrounded by a double sheath (Figs. 1-4, 6-8, 10-12, 23-24, 27-30); the external sheath (ES) with thin-walled cells originates from the endoderm, and the internal sheath (IS) with thick-walled cells from the pericycle (Figs. 1, 23, 30). The tissue immediately below the epidermis of the margins may consist of chlorophyllous parenchyma (Fig. 27-CP), collenchyma (Fig. 30-CO), sclerenchyma (Fig. 29-SC), or aquiferous parenchyma (Fig. 28-AP).

3.2 Scape anatomy

The scapes of the species studied are made up of epidermis, cortex and the vascular cylinder (Figs. 13-21, 31-38). In transverse section the scapes are cylindric and most species exhibit external ribs, as in *L. angustifolia*, *L. fulgida*, *L. argentea*, *L. longipes*, *L. flagellaris* and *L. luxurians* (Figs. 13-16, 19-21). There are no ribs in *L. sclerophylla*, *L. fluitans* (Figs. 17-18, respectively), *L. curvifolia* var. *lanuginosa*, *L. distichoclada* and *L. propinqua* (Table 2).

The epidermis is single-layered with thin- (Figs. 16, 18, 31-32, Table 2) or thick-walled cells (Figs. 13-15, 17, 19-21, 33-34, Table 2). In the latter the external periclinal wall may be thicker than the internal one (Figs. 17, 19-20, 34, Table 2) or have homogeneous thickening (Figs. 13-15, 21, 33, Table 2). The stomata are situated at the same level as the chlorophyllous parenchyma (Figs. 13-21, 31-34).

The cortex is composed of supporting tissues and chlorophyllous parenchyma and together with the epidermis constitutes the tissue of the ribs. The ribs, when present, have different shapes in transverse section (Table 2), such as convex (Figs. 13, 16, 19-21), straight (Fig. 15), or with recesses (Figs. 14, 34). Sulcae may occur in the rib itself (Figs. 14, 34) or between the ribs (Figs. 13, 15-16, 20-21). The ribs may be composed of various tissues including: collenchyma and chlorophyllous parenchyma (Figs. 16, 31-32, 36, Table 2); collenchyma, sclerenchyma and

chlorophyllous parenchyma (Figs. 13, 15, 21, 33, Table 2); or sclerenchyma and chlorophyllous parenchyma (Figs. 14, 19-21, 34-36, Table 2). The cortex is delimited internally by a continuous endoderm (Figs. 16, 18, 31-32, 36) with the cells thin-walled and parenchyma-like when in contact with the chlorophyllous parenchyma (Figs. 13-15, 17, 19-21, 33-34) or thick-walled when in contact with supporting tissues (Figs. 13-15, 17, 19-21, 33-34, 37-38).

The vascular cylinder is delimited by the pericycle which may be star-shaped (Figs. 13-18, 36-37, Table 2) or cylindric (Figs. 19-21, 34-35, 38, Table 2). The cells of the pericycle may be thin-walled (Figs. 18, 31, 36, Table 2) or thick-walled (Figs. 13-17, 32-33, 37, Table 2), and may consist of a single cell layer (Figs. 13-18, 31-32, 36-37, Table 2) or several layers (Figs. 19-21, 34-35, 38, Table 2). The pericycle cylinder is composed of various cell layers with entirely thickened and lignified walls (Figs. 19-21, 34-35, 38, Table 2). The vascular bundles are collateral and of two sizes. The smaller ones are completely surrounded by the pericycle and appear to be intercalated between the larger ones, the latter being only partially surrounded by the pericycle (Figs. 13-21, 31-34, 36-38). In these bundles the lacunae of the protoxylem can be observed (Figs. 13-15, 17-18, 20, 31, 34, 36, 38) and the metaxylem elements are well developed (Figs. 14-16, 19-21, 32, 34-35, 37-38). The medulla may be composed of thin-walled parenchyma cells (Figs. 16, 18, 31-32, 36, Table 2), thick-walled parenchyma cells (Figs. 13, 15, 17, 37, Table 2) or sclerenchyma cells (Figs. 14, 19-21, 34, 38, Table 2).

Some characteristics of the leaves and scapes of representative species of *Leiothrix* are shown in Table 2 to facilitate understanding of the anatomical descriptions and discussion.

4. Discussion

4.1 Taxonomic value of leaf and scape anatomy in *Leiothrix*

The results show that the genus *Leiothrix* is characterised by a single-layered epidermis, thin cuticle and collateral vascular bundles in the leaves and scapes; the stomata occur only on the abaxial leaf surface, chlorophyllous parenchyma is intercalated with the vascular bundles and the scapes are composed of epidermis, cortex and vascular cylinder. In general, *Leiothrix* shares this

same set of characters with other genera of Eriocaulaceae, according to Tomlinson (1969), Hensold (1988), Splett et al. (1993), Castro and Menezes (1995), Scatena and Giulietti (1996), Scatena and Menezes (1996), Giulietti et al. (1998), Oriani et al. (2005), Scatena et al. (2005), Alves et al. (2013) and Oliveira and Oriani (2016). However, in the species of *Leiothrix* studied here variation among the subgenera occurs in the following leaf characters: wall thickening in the epidermal cells, type of substomatal chamber, structure of the leaf margin, hypodermis and sheath extensions of the vascular bundles, number of vascular bundles in the mesophyll. Variations also occur in scape characters: cross-sectional shape, structure of the ribs and pericycle, presence or not of cell wall thickening in the medulla. These character variations are potentially important for recognition of subdivisions in *Leiothrix*, but could also be associated with adaptations of the species to their habitats.

Five of the taxa of *Leiothrix* studied here were described after the monograph of Ruhland (1903) and are included here in the subgenera proposed by him based on their floral characters. *Leiothrix distichoclada*, described by Herzog (1924) and *L. argentea* described by Silveira (1928) were included in *L.* subg. *Calycocephalus*. *Leiothrix sclerophylla*, described by Silveira (1928), was classified in *L.* subg. *Eleutherandra*. *Leiothrix longipes* described by Silveira (1928) was included in *L.* subg. *Stephanophyllum*, because of the united petals of the staminate flowers and the presence of pseudovivipary in the adult plant.

Leiothrix subg. *Rheocaulon*, which consists of the only aquatic species in the genus *L. fluitans*, has an anatomy which reflects adaptation to aquatic habitats in the following characters: single leaf vascular bundle, cortex of the scape composed of collenchyma and chlorophyllous parenchyma and a pericycle of thin-walled cells. These characters are common in the other aquatic species of the family (Coan et al., 2002), as well as in species of *Blastocaulon* Ruhland (= *Paepalanthus*) (Scatena et al., 1999b) which occur in wet, shaded places. The anatomical characters of *L. fluitans* are exclusive in the genus, justifying its classification as *L.* subg. *Rheocaulon* Ruhland (1903).

The species of *Leiothrix* subg. *Eleutherandra* studied here have leaf mesophyll with more than seven vascular bundles and wide leaf blades; *L. gomesii* Silveira, the only species of the subgenus we did not study, also has wide leaves. *Leiothrix gomesii* was the only species of subg. *Eleutherandra* included in the phylogenetic study of Echternacht et al. (2014) and it formed a sister group with *L. arrecta*, which represented *L.* subg. *Stephanophyllum* in that analysis. *Leiothrix argyroderma*, *L. beckii*, *L. sclerophylla* and *L. spiralis* have epidermal cells with homogeneous thickening at the margins, specialized substomatal chambers, a hypodermis (apart from *L. beckii* and *L. spiralis*) and sclerenchymatous vascular bundle sheath extensions. The substomatal chambers in the leaves of the species of this subgenus are considered specialised because the stomatal cells grow to greater size than the other epidermal cells. As these cells are elongated in the long axis of the leaf and because of their appearance in cross section, which is similar to equivalent cells in the Poaceae, they were termed bulliform cells in *L. cipoensis* Giul. (*L.* subg. *Calycocephalus*) (Giulietti, 1978), and in *L. subulata* Silveira and *L. crassifolia* (*L.* subg. *Calycocephalus*) (Giulietti, 1984).

The presence of specialized substomatal chambers was confirmed in the leaf of *L. crassifolia* by Scatena and Giulietti (1996), who recorded that the abaxial epidermis is composed of short and elongated cells and the substomatal chambers are composed of u- and i-shaped cells in *Leiothrix*, which constitute an efficient protection for gas exchange. Giulietti et al. (1995), in a morphological phylogenetic study of *Leiothrix*, recognized a clade B, the common ancestor of a clade consisting of species from Minas Gerais, with an adjacent subclade that included *L. fluitans*, *L. argyroderma*, *L. spiralis*, *L. beckii*, *L. crassifolia*, *L. cipoensis*, *L. sclerophylla* e *L. subulata*. In *L. fluitans* and *L. argyroderma* these authors indicated a reversion of the synapomorphy “pseudobulliform cells” in the leaves. They did not agree with the infrageneric classification of Ruhland (1903) and considered *L.* subg. *Eleutherandra* to be polyphyletic.

We studied 14 taxa of *Leiothrix* subg. *Calycocephalus*, the subgenus with the most species – 15 of the 28 included in Ruhland's treatment (Ruhland 1903) and 28 of 46 recorded in the Flora do Brasil 2020 (2019) – and that with the widest geographical distribution, including the mountains of

the Cadeia do Espinhaço in Minas Gerais and Bahia states, the Serra Geral in southern Brazil, the tepuis of Venezuela and the coastal restingas of Brazil (Giulietti, 1984).

Anatomically the species we studied do not show characters useful for delimiting the subgenus. However, some occur together in more than one species. In all morphological and molecular phylogenetic analyses, the species of *L.* subg. *Calycocephalus* of the Cadeia do Espinhaço in Minas Gerais emerge in a clade distinct from that of the Bahian species (even when these occur outside that state, Giulietti et al., 1995; Andrade et al., 2010; Giulietti et al., 2012; Trovó et al., 2013; Echternacht et al., 2014). The anatomy shows that, apart from *L. distichoclada*, the Bahian species have leaf mesophyll containing more than seven vascular bundles and there is no hypodermis. In contrast, the leaves of the species from Minas Gerais have between three and six vascular bundles and a hypodermis. Furthermore, conduplicate leaves are restricted to the Bahian species *L. distichoclada*, *L. hirsuta*, *L. schlechtendalli* and some individuals of *L. flavescens*. In Minas Gerais conduplicate leaves occur only in *L. flavescens* var. *disticophylla* (Giulietti & Hensold, 1991).

All the species of Minas Gerais we studied have a hypodermis, but its occurrence was not recorded for the *Leiothrix* species studied by Monteiro et al. (1985), nor in leaves of the species of *Paepalanthus* and *Syngonanthus* (= *Comanthera*), studied by Splett et al. (1993), who referred to the hypodermis as a multilayered epidermis. Scatena and Menezes (1996) used leaf ontogeny to confirm the occurrence of a hypodermis distinct from a multilayered epidermis in the Eriocaulaceae. Later, Alves et al. (2013) distinguished *Paepalanthus* sect. *Diphyomene* from the other sections of the genus by the presence of a hypodermis composed of aquiferous parenchyma.

The endemic species of Minas Gerais have a more variable anatomy but with little variation at infraspecific level. In *L. curvifolia* the four varieties studied consistently showed a hypodermis, vascular bundle sheath extensions composed of collechyma, sheath extensions of the smaller bundles facing the adaxial leaf surface and a star-shaped pericycle with 1-2 cell layers. There was however, variation in scape cross-sectional shape (cylindric or ribbed), number of ribs (5 to 7) and

the medulla where the cell walls were thin or thickened. These data thus turned out to be important for delimiting this species complex, in which Ruhland (1903) included six infraspecific taxa.

Only two species, *Leiothrix argentea* and *L. echinocephala*, have leaf mesophyll with three vascular bundles and pentangular scape cross-sections. These species also have the smallest leaves (up to 10 mm long) of the genus and form a well-supported sister group in the morphological phylogeny of *Leiothrix* (Giulietti et al., 1995).

Seven of the eight species included by Ruhland (1903) in *L. subg. Stephanophyllum* were studied, as well as *L. longipes*, which was described and included in this subgenus by Silveira (1928). Anatomically all the species included in *L. subg. Stephanophyllum* have leaf epidermis in which the external periclinal walls are thicker than the internal ones and the substomatal chambers are simple; all except *L. prolifera* have a hypodermis, and all except *L. arrecta* have leaf mesophyll with seven vascular bundles. In this group the hypodermis structure is variable, consisting only of collenchyma in *L. arrecta*, *L. luxurians* and *L. vivipara*, only sclerenchyma in *L. flagellaris* and *L. spargula*, or aquiferous parenchyma in *L. longipes* and *L. prolifera*. The presence or absence of hypodermis and the different states of this character were observed for the first time in this study and represent an important tool for delimiting species within this complex subgenus.

The scape of the species studied may be cylindric and without ribs as in *L. propinqua*, or it may have a variable number of ribs according to the species: four in *L. flagellaris*, *L. prolifera*, *L. spargula* and *L. vivipara*, seven in *L. longipes* and eight in *L. luxurians*. The ribs also show structural differences; in *L. longipes* the ribs consist only of collenchyma and parenchyma, in *L. luxurians* collenchyma, parenchyma and sclerenchyma, and in the other species only sclerenchyma and parenchyma.

The number of scape ribs in Eriocaulaceae, especially in *Eriocaulon* L., has been considered an important taxonomic character (Ruhland, 1903; Tomlinson, 1969; Splett et al., 1993). Based on the results obtained here, rib number can be used to separate the species of *L. subg. Stephanophyllum*, although this character can vary within the same species and even within the same individual, as was observed in *L. crassifolia* (Scatena and Rocha, 1995) and *L. flavescens*

(Giulietti et al., 1998). The presence of a multilayered pericycle composed of cells with strongly thickened and lignified walls is a synapomorphy for *L.* subg. *Stephanophyllum*, despite its absence in *L. longipes*, in which the pericycle has one or two layers. This character was also not observed in any other genus of Eriocaulaceae.

Leiothrix subg. *Stephanophyllum* is the only subgenus which has turned out to be monophyletic both in the morphological phylogenetic analysis by Giulietti et al. (1995) and in those based on molecular data (Andrade et al., 2010; Giulietti et al., 2012; Trovó et al., 2013). The main synapomorphy of the subgenus is the constant presence of pseudovivipary (propagation by vegetative budding from the central part of the capitulum) (Ruhland, 1903; Giulietti, 1984; Coelho et al., 2005). Coelho et al. (2006) distinguish two kinds of pseudovivipary in *Leiothrix*. In the type found in *L. spiralis*, termed the “splitter ramet strategy”, propagule formation is late, occurring when the capitula are mature and especially when they touch the soil. In the other type, termed “canopy-forming strategy” and exemplified by *L. vivipara*, the pseudoviviparous propagules are formed early, just after formation of the capitulum, and remain mostly suspended from the scapes.

In species with splitter ramet strategy pseudovivipary, as represented by *L. longipes* (*L.* subg. *Stephanophyllum*) and *L. spiralis* (*L.* subg. *Eleutherandra*), the pericycle is star-shaped, 1- or 2-layered and formed by thin-walled cells. The other species of *L.* subg. *Stephanophyllum* exhibit canopy-forming pseudovivipary and have a cylindric pericycle composed of thick-walled cells. In the species with canopy-forming pseudovivipary the scapes are more robust and shorter than those of the splitter ramet type. The presence of the pericycle, which is potentially meristematic at the beginning of shoot development, is related to habit and the thickening of the pericycle cells progresses as the plant ages. In the study by Giulietti et al. (1995) *L. spiralis* and *L. longipes* emerged in distinct clades that were themselves distinct from all other species of *L.* subg. *Stephanophyllum*, the latter being grouped into a clade well supported by two synapomorphies: scape with multiseriate “endodermis” and capitula with obligate vegetative sprouting. The published molecular phylogenies included the species *L. arrecta*, *L. flagellaris* and *L. vivipara* grouped into a well-supported clade (Andrade et al., 2010; Giulietti et al., 2012; Trovó et al., 2013).

L. longipes and *L. spiralis* were not included in these analyses. The anatomical data suggest the possibility that only canopy-forming species should be included in *L.* subg. *Stephanophyllum*, but new molecular phylogenies that include more species and both kinds of pseudovivipary need to be carried out.

Monteiro-Scanavacca et al. (1976), in an analysis of the formation of pseudovivipary, reported that the new shoots arose from cells associated with the endodermis. Species of *Leiothrix* were studied which exhibit sporadic occurrence of pseudovivipary (*L. curvifolia* var. *plantago*, *L. sinuosa* and *L. fluitans*) as well as those with obligate pseudovivipary; the splitter ramet strategy was represented by *L. spiralis* (under the name *L. cuscutoides* Silv.) and the canopy-forming strategy by *L. propinqua* and *L. vivipara*. Menezes et al. (2005) considered that it is the pericycle and not the endoderm which is responsible for the formation of the new shoots. Coelho et al. (2006) considered that the pseudoviviparous canopy-forming strategy appears to be more advantageous than the splitter ramet strategy because, even under similar soil moisture conditions in the Serra do Cipó in Minas Gerais, the survival of *L. vivipara* plantlets was greater than that of *L. spiralis*, and when the two species were found in the same microhabitat, the populations of *L. vivipara* were usually larger than those of *L. spiralis*.

4.2 Anatomical structures of the leaf and scape in Leiothrix interpreted as environmental adaptations

The leaves and scapes of most of the species of *Leiothrix* we studied have epidermis in which the external periclinal cell walls are thicker the rest. These species occur on sandy soils with low water availability and are exposed directly to intense luminosity; their epidermal anatomy represents an adaptive response to the habitat conditions. Species of other taxa of Eriocaulaceae which grow in the campos rupestres have similar adaptations, such as *Syngonanthus* (Scatena and Menezes, 1996; Scatena et al., 2004; Scatena et al., 2005), *Actinocephalus* (Oriani et al., 2005), *Paepalanthus* sect. *Diphyomene* (Alves et al., 2013) and *Rondonanthus* Herzog (Oliveira and Oriani, 2016). The epidermal cell wall thickenings function mainly to protect the internal tissues

against transpiration and excessive light intensity. Only *L. angustifolia* and *L. fluitans* have thin-walled epidermal cells in the leaves and scapes, a characteristic of Eriocaulaceae that occur in aquatic habitats, such as *Eriocaulon* (Scatena et al., 1999a), or in shaded situations like caves and grottos in the case of *Blastocaulon* (Scatena et al., 1999b). *L. fluitans* is aquatic and *L. angustifolia* is an annual species with a very short, two and three month life cycle that corresponds to the rainy season in the Chapada Diamantina (Giulietti pers. comm.). According to Tomlinson (1969) direct contact with water in damp environments obviates the need for the protection of internal tissues seen in the other species.

Specialized substomatal chambers are known at present only in Eriocaulaceae (Scatena and Menezes, 1996; Scatena et al., 2005; Oriani et al., 2005) and are considered to be a family synapomorphy. Their presence is related to the need for air spaces to maintain gas exchange efficiency (Scatena and Menezes, 1996; Scatena and Giulietti, 1996). Substomatal chambers have different forms in Eriocaulaceae depending on the taxonomic group (Scatena et al., 2005). In the species studied here the cells of the chamber are u- and i-shaped, while in *Actinocephalus* they are T-shaped (Oriani et al., 2005).

The leaf margin of the species studied may be composed of collenchyma, sclerenchyma, aquiferous parenchyma and chlorophyllous parenchyma below the epidermis. The tissue composition of the leaf margin in Eriocaulaceae presents taxonomically important differences in *Paepalanthus* subg. *Xeractis* Mart. (Hensold, 1988), *Actinocephalus* (Oriani et al., 2005) and also differentiates populations of *L. flavescens* (Giulietti et al., 1998). In the species we observed this character is directly related to the environment. Those with chlorophyllous parenchyma immediately below the epidermis are found in habitats with greater water availability, while those found where water is scarcer, light intensity greater and at higher elevations have collenchyma and sclerenchyma which act as structural support in the leaves.

The hypodermis, present in most of the species studied here, was observed to be composed of collenchyma, sclerenchyma or aquiferous parenchyma. The presence of a hypodermis is usually related to the storage and transport of water (Tomlinson, 1969), since it occurs in plants of dry

habitats (Scatena and Menezes, 1996). We came to the same conclusion as Scatena and Menezes (1996), who stated that leaf hypodermis composed of sclerenchyma acts as structural support in relation to constant exposure of the plant to wind, intense luminosity and water stress.

In *Leiothrix*, the vascular bundle sheath extensions may vary both in their position in relation to the leaf surface and the size of the vascular bundles, and in their tissue composition, whether collenchymatous, sclerenchymatous or mixed. Sheath extensions of smaller vascular bundles facing the adaxial surface, as previously described for *L. crassifolia* (Scatena and Rocha, 1995), are frequent in most species studied here. In *L. distichoclada* the sheath extensions of smaller vascular bundles face the abaxial surface, which is a character peculiar to the species and certainly associated with the conduplication of the leaf in which the abaxial surface becomes the external surface and therefore most subject to direct influence of the environment. Despite these characters having taxonomic value in various groups of Eriocaulaceae (Castro and Menezes, 1995; Scatena et al., 1999a; Oriani et al., 2005; Oliveira and Oriani, 2016), in the species we observed these variations were linked to the environment. In habitats with water availability the bundle sheath extensions were collenchymatous, in dry habitats sclerenchymatous and in habitats alternating between wet and dry conditions the bundle sheath extensions were a mixture of these tissue types.

In previous anatomical studies with different taxa of Eriocaulaceae, various authors (Scatena and Menezes, 1996; Scatena and Giulietti, 1996; Scatena et al., 1998; Scatena and Rosa, 2001; Scatena et al., 2004; Oriani et al., 2005; Alves et al., 2013; Oliveira and Oriani, 2016) defined cylindric scapes with or without ribs, and also triangular and pentangular scapes with a variable number of ribs. In the present study it was observed that there are scapes lacking ribs, those called cylindric in earlier studies, and scapes with ribs, the ribs themselves being defined as projections which include both epidermis and cortex and consequently in cross section the scape is differently shaped according to the number of ribs present (which varies from three to eight), i.e. triangular, quadrangular, etc. *Leiothrix crassifolia*, with three to eight ribs, is the species with the greatest variation in rib number (Scatena and Giulietti, 1996).

According to Ruhland (1903), the scape ribs of Eriocaulaceae are defined as "what appears below the epidermis, a strong mechanical tissue composed of sclerenchyma cells (never collenchyma) which are usually T-shaped". According to Font Quer (1953), ribs which can be seen with the naked eye are defined for angiosperms in general as "a line which is evident in more or less pronounced form on the surface of organs". For Giuliatti (1978), in taxa of *Eriocaulon* and *Leiothrix* the ribs are formed internally with supporting cortical rays and externally by the costal zone of the scape. For Scatena and Rocha (1995) in *Leiothrix crassifolia*, the ribs are defined by their composition of supporting tissue with chlorophyllous parenchyma and the presence of a longitudinal indentation or sulcae between each pair of ribs.

None of the above descriptions completely defines what we have observed in the species of *Leiothrix* we studied. The supporting tissue of the scapes is not composed exclusively of sclerenchyma as supposed by Ruhland (1903), because collenchyma was also observed and its shape also varies. Font Quer (1953) described only the external morphology of the ribs. Giuliatti (1978) and Scatena and Rocha (1995) described the ribs in greater detail, but from our observations we established in *L. fulgida* and *L. prolifera* not only the presence of sulcae between pairs of ribs, but also in the central region of the ribs themselves.

The number of ribs of the scapes of each species of *Leiothrix* studied here is always equal to half the number of vascular bundles. Thus in the cross section of the scape of *Leiothrix fulgida* it might appear that there are six ribs due to the strongly developed sulcae of the central region of each rib as well as between them, but in fact there are only three. Given these observations we consider that a rib is initiated at the epidermis and extends to the endoderm, thus including cortical tissue. The rib may consist only of supporting tissue (collenchyma and sclerenchyma) or it may include both supporting tissue and chlorophyllous parenchyma. In cross-sectional outline the ribs are seen as protrusions with the sulcae (grooves) both between them and in the centre of each one.

The studied species of *Leiothrix* subg. *Stephanophyllum* are endemic to the mountains of the Cadeia do Espinhaço of Minas Gerais and occur in microhabitats (Giuliatti, 1984). According to Coelho et al. (2008) the specialized vegetative propagation of these species may be an example of

ecological speciation or the result of polyploidy. Despite polyploidy being very common in plants, the authors suggest that since ecological speciation involves niche changes within an environmental mosaic, this could be an important mechanism among the different reproductive modes found in *Leiothrix*. The lignification of the cells of the pericycle and the cylindric shape and multilayered structure of the latter in species of *L.* subg. *Stephanophyllum* are characters which could be related to ecological speciation as suggested by Coelho et al. (2008), because of the influence of different nutritional capacities of the soils.

In the species of *Leiothrix* studied here the medulla is composed of thin- or thick-walled parenchymatous and sclerenchymatous cells. The cell wall thickening of the medulla of Eriocaulaceae scapes varies among the different genera (Scatena and Menezes, 1996; Scatena et al., 1998; Scatena et al., 1999a, b; Coan et al., 2002; Scatena et al., 2004; Scatena et al., 2005; Oriani et al., 2005; Oliveira and Oriani, 2016). In *Leiothrix flavescens* the presence or absence of cell wall thickening in the medulla is associated with habitat (Giulietti et al., 1998). We also observed that medulla cell wall thickening is associated with the habitat since thin-walled cells occur in aquatic species or those of habitats with high water availability and thick-walled cells occur in species in habitats under water stress; medullas with sclerenchymatous cells occur in species from dry habitats.

According to the anatomical structures of the *Leiothrix* species studied here, we propose that *Leiothrix* subg. *Rheocaulon* is characterized by leaf mesophyll containing only a single vascular bundle, a scape with cortex composed of collenchyma and chlorophyllous parenchyma, and a pericycle of thin-walled cells. *L.* subg. *Eleutherandra* is characterized by compartmentalized substomatal chambers and *L.* subg. *Stephanophyllum* by a multilayered cylindric pericycle composed of cells with strongly thickened and lignified walls. In *L.* subg. *Calyccephalus* the species from Minas Gerais have a hypodermis and up to seven vascular bundles in the leaves, while in the species from Bahia the leaves have more than seven vascular bundles. These characters corroborate the delimitation of the subgenera established by Ruhland (1903) and provide new support for defining a greater number of infrageneric taxa, as well as reflecting adaptations to the environment in which these taxa occur.

Acknowledgements

We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, for the doctoral grant to AASM and to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, for the productivity grants to VLS and AMGH.

References

- Alves, P.G.M., Scatena, V.L., Trovó, M., 2013. Anatomy of scapes, bracts, and leaves of *Paepalanthus* sect. *Diphyomene* (Eriocaulaceae, Poales) and its taxonomic implications. *Brittonia* 65, 262-272. doi: 10.1007/s12228-012-9263-z
- Andrade, M.J.G., Giulietti, A.M., Rapini, A., Queiroz, L.P., Conceição, A.S., Almeida P.R.M., van den Berg, C., 2010. A comprehensive phylogenetic analysis of Eriocaulaceae: Evidence from nuclear (ITS) and plastid (psbA-trnH and trnL-F) DNA sequences. *Taxon* 59, 379-388. doi: 10.2307/25677597
- Castro, N.M., Menezes, N.L., 1995. Aspectos da anatomia foliar de algumas espécies de *Paepalanthus* Kunth. Eriocaulaceae da Serra do Cipó (Minas Gerais). *Acta Bot. Brasilica* 9, 213-229. doi: 10.1590/S0102-33061995000200003
- Coan, A.I., Scatena, V.L., Giulietti, A.M., 2002. Anatomia de algumas espécies aquáticas de Eriocaulaceae brasileiras. *Acta Bot. Brasilica* 16, 371-384. doi: 10.1590/S0102-33062002000400001
- Coelho, F.F., Neves, A.N.O., Capelo, C., Figueira, J.E.C., 2005. Pseudovivipary in two rupestrian endemic species (*Leiothrix spiralis* and *Leiothrix vivipara*). *Curr. Sci.* 88(8), 1225-1226.
- Coelho, F.F., Capelo, C., Neves, A.C.O., Martins, R.P., Figueira, J.E.C., 2006. Seasonal timing of pseudoviviparous reproduction of *Leiothrix* (Eriocaulaceae) rupestrian species in Southeastern Brazil. *Ann. Bot.* 98, 1189–1195. doi: 10.1093/aob/mcl214

- Coelho, F.F., Capelo, C., Ribeiro, C.L., Figueira, J.E.C., 2008. Reproductive modes in *Leiothrix* (Eriocaulaceae) in South-eastern Brazil: The role of microenvironmental heterogeneity. *Ann. Bot.* 101, 353-360. doi: 10.1093/aob/mcm289
- Echternacht, L., Sano, P.T., Bonillo, C., Cruaud, C., Coulou, A., Dubuisson, J.Y., 2014. Phylogeny and taxonomy of *Syngonanthus* and *Comanthera* (Eriocaulaceae): Evidence from expanded sampling. *Taxon* 63(1), 47-63. doi: 10.12705/631.36
- Elmqvist, T., Cox, P.A., 1996. The evolution of vivipary in flowering plants. *Oikos* 77, 3-9. doi: 10.2307/3545579
- Feder, N., O'Brien, T., 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *Am. J. Bot.* 55, 123-142. doi: 10.2307/2440500
- Font Quer, D.P., 1953. *Diccionario de Botánica*. Editorial Labor S.A., Barcelona.
- Giulietti, A.M., 1978. Os gêneros *Eriocaulon* L. e *Leiothrix* Ruhl. (Eriocaulaceae) na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências, Univ. de São Paulo.
- Giulietti, A.M., 1984. Estudos taxonômicos no gênero *Leiothrix* Ruhl. (Eriocaulaceae). Tese de Livre-Docência - Instituto de Biociências, Univ. de São Paulo.
- Giulietti, A.M., Hensold, N., 1990. Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de Eriocaulaceae. *Acta Bot. Brasilica* 4, 133-158. doi: 10.1590/S0102-33061990000100010
- Giulietti, A.M., Hensold, N., 1991. Nomenclatural changes and range extension in *Leiothrix flavescens* (Bong.) Ruhl. (Eriocaulaceae). *Novon* 1, 45-49. doi: 10.2307/3391718
- Giulietti, A.M., Amaral, M.C.E., Bittrich, V., 1995. Phylogenetic analysis of inter- and infrageneric relationships of *Leiothrix* Ruhland (Eriocaulaceae). *Kew Bull.* 50, 55-71. doi: 10.2307/4114608
- Giulietti, A.M., Scatena, V.L., Cardoso, V.A., 1998. Anatomia de escapos e de folhas e sua aplicação à taxonomia de *Leiothrix flavescens* (Bong.) Ruhl. S.L. (Eriocaulaceae). *Sitientibus* 18, 31-49.
- Giulietti, A.M., Scatena, V.L., Sano, P.T., Parra, L.R., Queiroz, L.P., Harley, R.M., Menezes, N.L., Benko-Yseppon, A.M., Salatino, A., Salatino, M.L., Vilegas, W., Santos, L.C., Ricci, C.V., Bonfim, M.C.P., Miranda, E.B., 2000. Multidisciplinary studies on Neotropical Eriocaulaceae, in:

- Wilson, K.L., Morrison, D.A. (Eds.), *Monocots II: Systematics and Evolution.*, Melbourne, CSIRO, pp. 580–589.
- Giulietti, A.M., Andrade, M.J.G., Scatena, V.L., Trovó, M., Coan, A.I., Sano, P.T., Santos, F.A.R., Borges, R.L.B., van Den Berg, C., 2012. Molecular phylogeny, morphology and their implications for the taxonomy of Eriocaulaceae. *Rodriguesia* 63(1), 1-19. doi: 10.1590/S2175-78602012000100001
- Hensold, N., 1988. Morphology and systematics of *Paepalanthus* Subgenus *Xeractis* (Eriocaulaceae). *Am. Soc. Plant Taxonom.* 23, 1-150. doi: 10.2307/25027709
- Herzog, T., 1924. Neues Odamerikanische Eriocaulonaceae. *Fedde Repert. Spec.* 20, 82-88.
- Johansen, D.A., 1940. *Botanical Microtechnique*, Mc Graw Hill Book, New York.
- Kaiser, E., 1880. Verfahren zur Herstellung einer tadellosen Glycerin-Gelatine. *Bot. Zentralb.* 180, 25-26.
- Leiothrix* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB7541>>. (acesso em: 08 de fevereiro de 2019).
- Menezes, N.L., Silva, D.C., Arruda, R.C.O., Melo-de-Pinna, G.F., Cardoso, V.A., Castro, N.M., Scatena, V.L., Scremin-Dias, E., 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. doi: 10.1590/S0001-37652005000200006
- Monteiro-Scanavacca, W.R., Mazzoni, S.C., 1976. Reprodução vegetativa a partir da inflorescência em Eriocaulaceae. *Bol. Botânica Univ. S. Paulo* 4, 61-72. doi: 10.11606/issn.2316-9052.v4i0p61-71
- Monteiro, W.R., Castro, M.M., Giulietti, A.M., 1985. Aspects of leaf structure of some of *Leiothrix* Ruhl. (Eriocaulaceae) from the Serra do Cipó (Minas Gerais, Brazil). *Rev. Brasil. Bot.* 8, 109-125.

- Oriani, A., Scatena, V.L., Sano, P.T., 2005. Anatomia das folhas, brácteas e escapos de *Actinocephalus* (Koern.) Sano (Eriocaulaceae). Rev. Bras. Bot. 28, 229-240. doi: 10.1590/S0100-84042005000200004
- Oliveira, F.M.G., Oriani, A., 2016. Anatomical characterization of vegetative organs and scapes of *Rondonanthus* (Eriocaulaceae, Poales). Braz. J. Bot. 39, 1103-1115. doi: 10.1007/s40415-016-0295-6
- Parra, L.R., Giulietti, A.M., Andrade, M.J.G., van den Berg, C., 2010. Reestablishment and new circumscription of *Comanthera* (Eriocaulaceae). Taxon, 59, 1135-1146. doi: 10.2307/20773983
- Roeser, K.R., 1962. Die Nadel der Schwarzkiefer-Masen-Produkt und Keinstwert der Natur. Microkosmos 61, 33-36.
- Ruhland, W., 1903. Eriocaulaceae, In: Engler, A. (Ed.), Das Pflanzenreich IV, 30. Leipzig: Engelmann, pp. 1-294.
- Scatena, V.L., Rocha, C.L.M., 1995. Anatomia dos órgãos vegetativos e do escapo floral de *Leiothrix crassifolia* (Bong.) Ruhl., Eriocaulaceae, da Serra do Cipó-MG. Acta Bot. Brasilica 9, 195-211. doi: 10.1590/S0102-33061995000200002
- Scatena, V.L., Giulietti, A.M., 1996. The taxonomy and morphological and anatomical differentiation of populations of *Leiothrix crassifolia* (Eriocaulaceae). Plant Syst. Evol. 199, 243-258. doi: 10.1007/BF00984907
- Scatena, V.L., Menezes, N.L., 1996. Anatomia de escapos e folhas de *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae). Rev. Bras. Biol. 56, 317-332.
- Scatena, V.L., Giulietti, A.M., Cardoso, V.A., 1998. Anatomia do escapo floral de espécies brasileiras de *Paepalanthus* subgênero *Platycaulon* (Eriocaulaceae). Acta Bot. Brasilica 2, 121-133. doi: 10.1590/S0102-33061998000200003
- Scatena, V.L., Giulietti, A.M., Cardoso, V.A., 1999a. Anatomia de raízes, escapos e folhas de espécies de *Eriocaulon* L. (Eriocaulaceae). Bol. Bot. Univ. S. Paulo 18, 11-20. doi: 10.11606/issn.2316-9052.v18i0p11-20

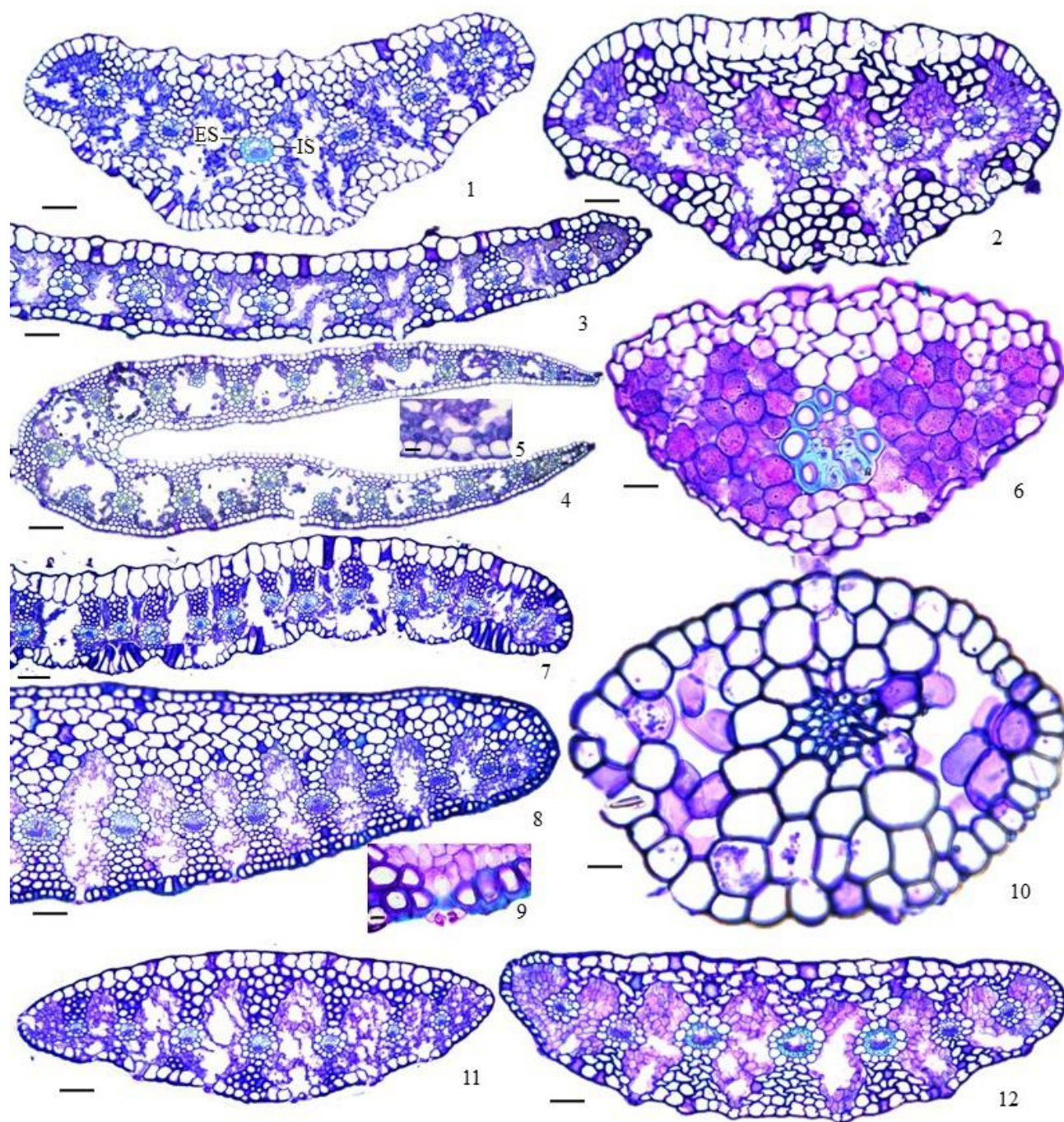
- Scatena, V.L., Cardoso, V.A., Giulietti, A.M., 1999b. Morfoanatomia de espécies de *Blastocaulon* Ruhland (Eriocaulaceae). Acta Bot. Brasilica 13, 29-41. doi: 10.1590/S0102-33061999000100004
- Scatena, V.L., Rosa, M.M., 2001. Morphology and anatomy of the vegetative organs and scapes from *Aphorocaulon* (*Paepalanthus*, Eriocaulaceae). Braz. Arch. Biol. Tecnol. 44, 49-58. doi: 10.1590/S1516-89132001000100007
- Scatena, V.L., Vich, D.V., Parra, L.R., 2004. Anatomia de escapos, folhas e brácteas de *Syngonanthus* sect. *Eulepis* (Bong. ex Koern.) Ruhland (Eriocaulaceae). Acta Bot. Brasilica 18, 825-837. doi: 10.1590/S0102-33062004000400013.
- Scatena, V.L., Giulietti, A.M., Borba, E.L., van den Berg, C., 2005. Anatomy of Brazilian Eriocaulaceae: correlation with taxonomy and habitat using multivariate analyses. Plant Syst. Evol. 253, 1-22. doi: 10.1007/s00606-004-0295-z
- Silveira, A.A., 1928. Floralia Montium. Imprensa Official, Belo Horizonte.
- Splett, S., Barthlott, W., Stutzel, T., Barros, M.A.G., 1993. Leaf anatomy of brazilian Eriocaulaceae and its diagnostic significance. Flora 188, 399-411. doi: 10.1016/S0367-2530(17)32290-9
- Tomlinson, P.B., 1969. Commelinales – Zingiberales, in: Metcalfe, C.R. (Ed.), Anatomy of the Monocotyledons III. Clarendon Press, Oxford, pp. 1-446.
- Trovó, M., Stutzel, T., Scatena, V.L., Sano, P.T., 2010. Morphology and anatomy of inflorescence and inflorescence axis in *Paepalanthus* sect. *Diphyomene* Ruhland (Eriocaulaceae, Poales) and its taxonomic implications. Flora 205, 242-250. doi: 10.1016/j.flora.2009.02.005
- Trovó, M., Andrade, M.J.G., Sano, P.T., Ribeiro, P.L., van den Berg, C., 2013. Molecular phylogenetics and biogeography of Neotropical Paepalanthoideae with emphasis on Brazilian *Paepalanthus* (Eriocaulaceae). Bot. J. Linn. Soc. 171, 225-243. doi: 10.1111/j.1095-8339.2012.01310.x

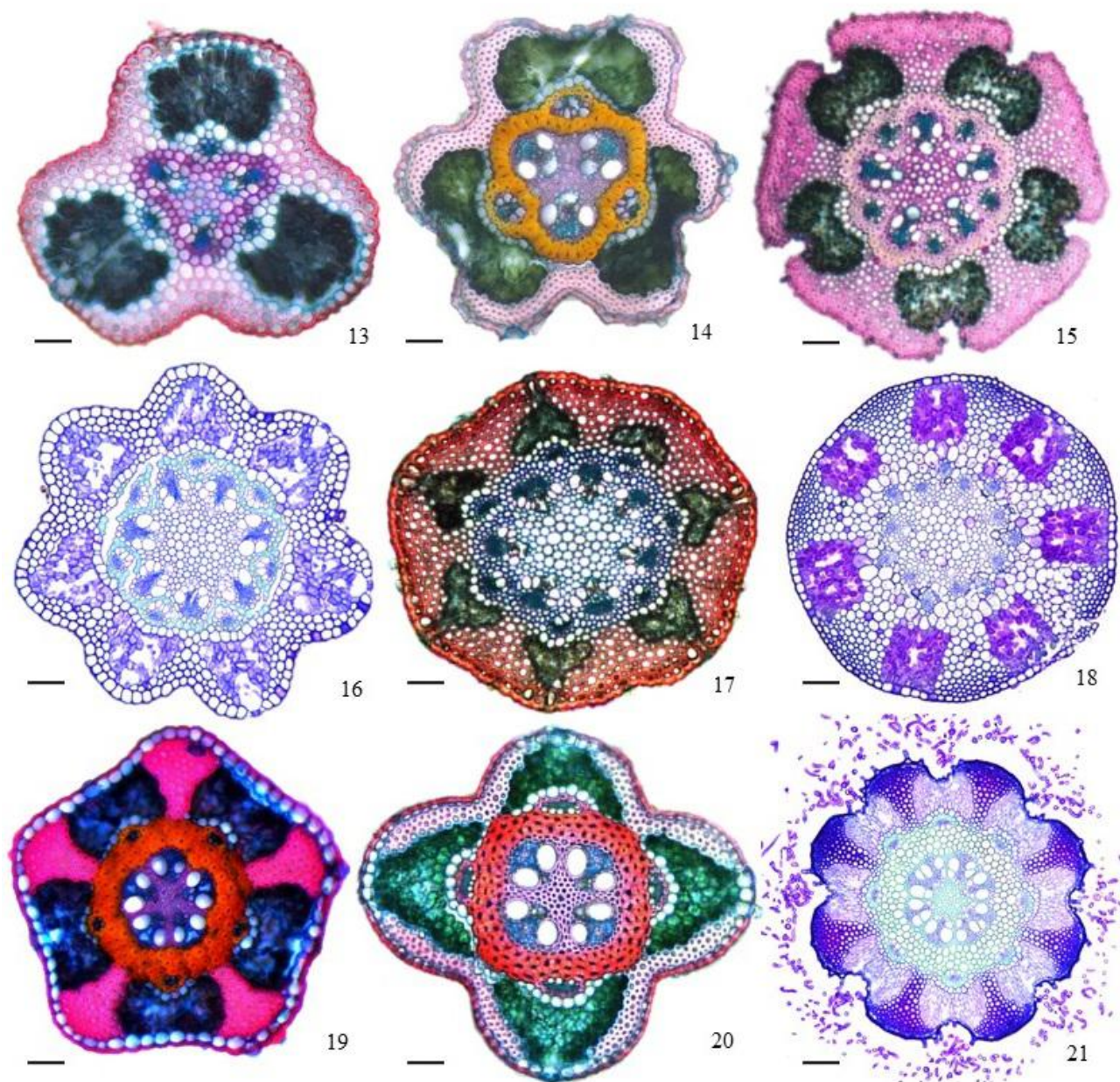
Legends

Figures 1-12: Aspects of the leaf anatomy. Transverse sections of species of *Leiothrix*. 1. *L. curvifolia* var. *plantago*; 2. *L. curvifolia* var. *curvifolia*; 3. *L. flavescens*; 4. *L. distichoclada*; 5. Detail of *L. distichoclada*, epidermis with stomata on the same level as epidermal cells; 6. *L. argentea*; 7. *L. spiralis*; 8. *L. sclerophylla*; 9. Detail of *L. sclerophylla*, epidermis with stomata lie above the level of the epidermal cells; 10. *L. fluitans*; 11. *L. luxurians*; 12. *L. flagellaris*. Scales: 15 μm (Figs. 5, 9); 25 μm (Figs. 6, 10); 50 μm (Figs. 1-2, 11-12); 100 μm (Figs. 3, 7-8), 150 μm (Fig. 4). (ES= external sheath ; IS= internal sheath).

Figuras 13-21: Aspects of the scape anatomy. Transverse sections of species of *Leiothrix*. 13. *L. angustifolia*; 14. *L. fulgida*; 15. *L. argentea*; 16. *L. longipes*; 17. *L. sclerophylla*; 18. *L. L. fluitans*; 19. *L. arrecta*; 20. *L. flagellaris*; 21. *L. luxurians*. Scales: 25 μm (Figs. 13- 15, 19-20), 50 μm (Figs. 16); 100 μm (Figs. 17-18, 21).

Figuras 22-38: Aspects of leaf and scape anatomy in species of *Leiothrix*. Figs. 22-24. Detail of epidermis and mesophyll: 22. *L. distichoclada*-simple substomatal chamber; 23. *L. spiralis*-specialized "u"-shaped substomatal chamber; 24. *L. sclerophylla*- specialized "i"-shaped substomatal chamber; Figs. 25-26. Detail of specialized substomatal chamber in longitudinal section: 25. *L. spiralis*-specialized "u"-shaped substomatal chamber; 26. *L. sclerophylla*- specialized "i"-shaped substomatal chamber; Figs. 27-30. Detail of leaf blade and margin: 27. *L. rufula*; 28. *L. sclerophylla*; 29. *L. spiralis*; 30. *L. vivipara*; Figs. 31-34. Detail of scape epidermis, cortex and central cylinder: 31. *L. fluitans*; 32. *L. longipes*; 33. *L. argentea*; 34. *L. prolifera*; Figs. 35-38. Detail of scape vascular cylinder: 35. *L. flagellaris*; 36. *L. fluitans*; 37. *L. curvifolia* var. *plantago*; 38. *L. flagellaris*. Scales: 15 μm (Figs. 22-23, 25-26, 33), 25 μm (Figs. 24, 38), 50 μm (Figs. 27-34, 36-37). (AP= aquiferous parenchyma; CO= collenchyma; CP= chlorophyllous parenchyma; ES= external sheath ; IS= internal sheath; SC= sclerenchyma).







Tables

Table 1. Taxa of *Leiothrix* studied anatomically, arranged in the subgeneric classification of Ruhland (1903). Legend: BA – Espinhaço Range, Chapada Diamantina, Bahia; MG – Espinhaço Range, Serra do Espinhaço, Minas Gerais; RES – restingas from Bahia to Rio Grande do Sul; SG – Serra Geral, São Paulo to Santa Catarina; MI – Itatiaia Massif, in the board of Minas Gerais, Rio de Janeiro and São Paulo.

Ruhland (1903)	Species	Distribution	Collector and collector's number
<i>Leiothrix</i> subg. <i>Calyccephalus</i>	<i>Leiothrix angustifolia</i> (Körn.) Ruhland	BA	Giulietti et al. CFCR 6966; Giulietti 2155; Giulietti 1358; Mascarenhas et al. 381
	<i>L. argentea</i> Silveira	MG	Giulietti et al. CFCR 4660; Kawasaki 1040; Mascarenhas et al. 403
	<i>L. crassifolia</i> (Bong.) Ruhland	MG	Scatena and Rocha, 1995; Scatena and Giulietti, 1996
	<i>L. curvifolia</i> (Bong.) Ruhland	MG	Rapini et al. 528; Ribeiro 207; Andrino et al. 82
	<i>L. curvifolia</i> var. <i>lanuginosa</i> (Bong.) Ruhland	MG	Andrade 553; Mascarenhas et al. 396
	<i>L. curvifolia</i> var. <i>mucronata</i> (Bong.) Ruhland	MG	Hensold 801; Coelho 12
	<i>L. curvifolia</i> var. <i>plantago</i> (Mart.) Ruhland	MG	Joly s.n. SPF 31489; Furlan et al., CFCR 2594; Isejima et al., CFCR 5543
	<i>L. distichoclada</i> Herzog	BA	Mascarenhas et al. 331; Mascarenhas et al. 370,
	<i>L. echinocephala</i> Ruhland	MG	Giulietti et al. CFCR 1881; Hensold 648; Mascarenhas et al. 401
	<i>L. flavescens</i> (Bong.) Ruhland	BA/MG/RES/SG	Mascarenhas et al. 330; Mascarenhas et al. 357
	<i>L. fulgida</i> Ruhland	MG	Mello-Silva et al. 4376; Andrade 512; Costa et al. 1378
	<i>L. hirsuta</i> (Wikstr.) Ruhland	BA/RES	Souza 984; Queiroz 13100; Miranda 4565, Mascarenhas et al. 386
<i>Leiothrix</i> subg. <i>Rheocaulon</i>	<i>L. rufula</i> (A.St.-Hil.) Ruhland	BA/RES	Pirani et al. CFCR 1658; Cardoso 1048; Queiroz 13142
	<i>L. schlechtendalii</i> (Körn.) Ruhland	BA	Harley 55609; Freitas 36; Ribeiro 11
	<i>L. fluitans</i> (Mart.) Ruhland	MG	Giulietti 5051; Rosa 1; Rosa 10
	<i>L. argyroderma</i> Ruhland	MI	Santos 25
	<i>L. beckii</i> (Szyszyl.) Ruhland	MI	Brade 20219
	<i>L. sclerophylla</i> Silveira	MG	Giulietti 2610
	<i>L. spiralis</i> (Bong.) Ruhland	MG	Semir CFSC 3903
	<i>L. arrecta</i> Ruhland	MG	Joly s.n. SPF 31520; Hensold 254
	<i>L. flagellaris</i> (Giull.) Ruhland	MG	Trovó 356; Mascarenhas et al. 349; Mascarenhas et al. 361
	<i>L. longipes</i> Silveira	MG	Semir and Sazima CFSC 5059
	<i>L. luxurians</i> (Körn.) Ruhland	MG	Mascarenhas et al. 351
	<i>L. prolifera</i> (Bong.) Ruhland	MG	Giulietti et al. CFCR 1815
<i>Leiothrix</i> subg. <i>Stephanophyllum</i>	<i>L. propinqua</i> (Körn.) Ruhland	MG	Giulietti 2612; Costa 312
	<i>L. spargula</i> Ruhland	MG	Giulietti 2613
	<i>L. vivipara</i> (Bong.) Ruhland	MG	Hensold 608; Sauthier 108

Table 2. Anatomical characteristics of the leaves and scapes of *Leiothrix* taxa according to the subgenera of Ruhland (1903). 1= *L. fluitans* (*L. subg. Rheocaulon*); 2= *L. argyroderma*; 3= *L. beckii*; 4= *L. sclerophylla*; 5= *L. spiralis* (*L. subg. Eleutherandra*); 6= *L. crassifolia*; 7= *L. fulgida*; 8= *L. argentea*; 9= *L. echinocephala*; 10= *L. curvifolia*; 11= *L. curvifolia* var. *lanuginosa*; 12= *L. curvifolia* var. *mucronata*; 13= *L. curvifolia* var. *plantago*; 14= *L. flavescescens*; 15= *L. angustifolia*; 16= *L. distichoclada*; 17= *L. hirsuta*; 18= *L. rufula*; 19= *L. schleichtendalii* (*L. subg. Calycocephalus*); 20= *L. longipes*; 21= *L. arrecta*; 22= *L. flagellaris*; 23= *L. luxurians*; 24= *L. prolifera*; 25= *L. propinqua*; 26= *L. spargula*; 27= *L. vivipara* (*L. subg. Stephanophyllum*). (0) Absence; (1) Presence.

Characters	Species																										
Leaves	1''	2*	3*	4*	5*	6'	7'	8'	9'	10'	11'	12'	13'	14'	15'	16'	17'	18'	19'	20°	21°	22°	23°	24°	25°	26°	27°
Epidermal cells with thin walls	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Epidermal cells with external periclinal walls thicker than internal walls	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Epidermal cells with homogeneous wall thickening at the margins	0	1*	1*	1*	1*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Substomatal chamber specialized	0	1*	1*	1*	1*	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Substomatal chamber simple	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Margin with chlorophyllous parenchyma below the epidermis	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
Margin with collenchyma below the epidermis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Margin with sclerenchyma below the epidermis	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Margin with aquiferous parenchyma below the epidermis	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hypodermis present	0	1*	0	1*	0	1'	1'	1'	1'	1'	1'	1'	1'	0	0	1'	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
Hypodermis composed of collenchyma	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
Hypodermis composed of sclerenchyma	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
Hypodermis composed of aquiferous parenchyma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Sheath extensions of smaller vascular bundles facing both leaf surfaces	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1
Sheath extensions of smaller vascular bundles facing adaxial surface	0	0	1	0	0	1'	1'	1'	1'	1'	1'	1'	1'	0	0	0	1'	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
Sheath extensions of smaller vascular bundles facing abaxial surface	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sheath extension of vascular bundles composed only of collenchyma	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1'	1'	1'	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1
Sheath extension of vascular bundles composed only of sclerenchyma	0	1*	1*	1*	1*	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
Sheath extension of vascular bundles composed of collenchyma and sclerenchyma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1'	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Mesophyll containing a single vascular bundle	1''	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mesophyll containing three vascular bundles	0	0	0	0	0	0	0	1'	1'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mesophyll containing up to seven vascular bundles	0	0	0	0	0	0	1'	0	0	1'	1'	1'	1'	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Mesophyll containing more than seven vascular bundles	0	1*	1*	1*	1*	1	0	0	0	0	0	0	0	1'	1'	1'	1'	1'	1'	1'	1	0	1	1	1	1	1
Scapes																											
Triangular in cross section with 3 ribs	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Tetragonal in cross section with 4 ribs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
Pentagonal in cross section with 5 ribs	0	0	0	0	0	0	0	1'	1'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Cylindric in cross section without ribs	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Cylindric in cross section with 5 ribs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cylindric in cross section with 6 ribs	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cylindric in cross section with 7 ribs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Cylindric in cross section with 8 ribs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Cylindric in cross section with 4 to 8 ribs	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Epidermal cells with external periclinal wall thicker than internal wall	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Epidermal cells with walls entirely thickened	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Ribs consisting of collenchyma and chlorophyllous parenchyma	1''	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Ribs consisting of collenchyma, sclerenchyma and chlorophyllous parenchyma	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Ribs consisting of sclerenchyma and chlorophyllous parenchyma	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
Pericycle 1- or 2-layered, star-shaped	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1°	0	0	0	0	0	0	0
Pericycle many-layered, cylindric	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1°	1°	1°	1°	1°	1°	1°
Pericycle of thin-walled cells	1''	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pericycle of thick-walled cells	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1°	0	0	0	0	0	0	0
Pericycle of thick-walled lignified cells	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1°	1°	1°	1°	1°	1°	1°
Medulla of thin-walled parenchyma cells	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Medulla of thick-walled parenchyma cells	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Medulla with sclerenchymatous cells	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As características morfológicas e anatômicas das sementes, folhas e escapos de *Leiostrix* trouxeram à luz novos conhecimentos da taxonomia do grupo, bem como auxiliaram na compreensão da relação das estruturas com o ambiente em que essas plantas crescem;
- As características das flores estaminadas e pistiladas de *Leiostrix* são comuns às demais espécies de Paepalanthoideae já estudadas, estabelecendo padrão para a subfamília;
- As flores estaminadas de *Leiostrix* com corola gamopétala apresentam desenvolvimento congênito na porção basal e pós-genital nas porções mediana e apical. Futuros estudos focados no desenvolvimento das flores de outros grupos de Eriocaulaceae poderão confirmar se essa variação é comum na família ou se acontece apenas neste gênero;
- As diferenças na altura da ramificação do estilete (ramos nectaríferos e estigmáticos) em *Leiostrix* ocorrem através de processos heterocrônicos, também existentes em outras Angiospermas. Acredita-se que as características resultantes dessa heterocronia estejam associadas com os processos de polinização do grupo.
- O desenvolvimento das flores pistiladas de *Leiostrix* permitiu concluir que as diferentes alturas dos ramos nectaríferos e estigmáticos no estilete resultam do crescimento diferencial dos carpelos;
- Futuros estudos sobre a biologia da polinização de *Leiostrix* poderão ajudar a entender se as diferenças encontradas nas flores estaminadas e pistiladas estão relacionadas com a especificidade de agentes polinizadores e/ou com diferentes processos de polinização;
- O tegumento das sementes de *Leiostrix* apresenta ou não estrias, que quando presentes são anelares, conectadas e cruciformes. Essas formas, juntamente com seu padrão de distribuição, mais a forma das células do envoltório e de suas paredes, bem como a forma das sementes, do hilo e da micrópila, auxiliam na identificação das espécies.
- Estudos futuros com desenvolvimento das sementes de *Leiostrix* podem auxiliar na compreensão sobre a presença ou ausência das estrias no envoltório, assim como os diferentes padrões de distribuição das mesmas;

- O desenvolvimento pós-seminal de *Leiothrix* é semelhante às demais Eriocaulaceae, demonstrando que existe um padrão para a família: germinação rápida, ocorrendo através da protusão do eixo embrionário e o surgimento da raiz adventícia após o desenvolvimento da primeira folha;
- A anatomia das folhas e dos escapos de *Leiothrix* demonstrou claramente que suas estruturas estão relacionadas com o ambiente. Algumas estruturas diferenciam os subgêneros descritos por Ruhland (1903), enquanto outras diferem os subgêneros reconhecidos por Giulietti (2020).