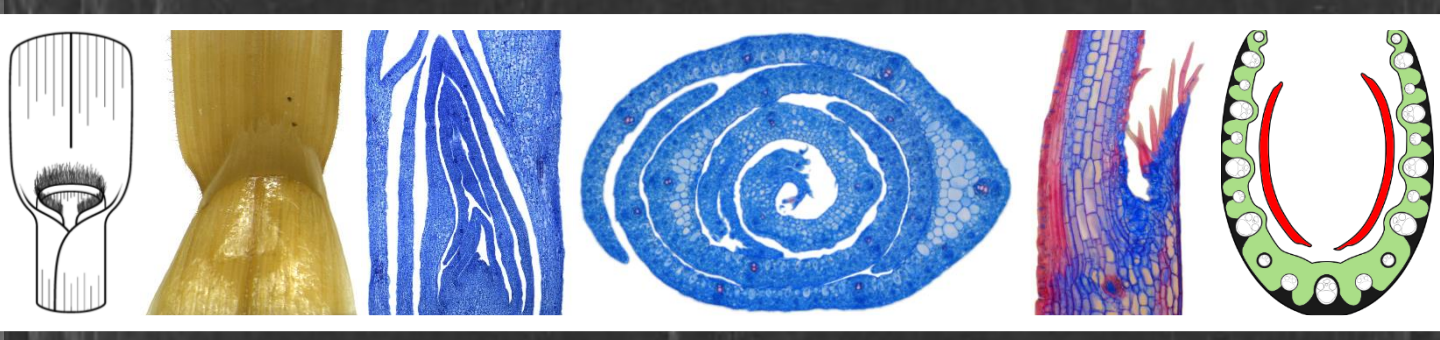


Bruno Edson Chaves

Lígulas em Poaceae: uma abordagem conceitual, filogenética e ontogenética



São Paulo
2022

Bruno Edson Chaves

Lígulas em Poaceae: uma abordagem conceitual,
filogenética e ontogenética

Ligules in Poaceae: a conceptual, phylogenetic and
ontogenetic approach

São Paulo

2022

Bruno Edson Chaves

Lígulas em Poaceae: uma abordagem conceitual,
filogenética e ontogenética

Ligules in Poaceae: a conceptual, phylogenetic and
ontogenetic approach

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências Biológicas, na
Área de Botânica.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Gladys
Flávia de Albuquerque Melo-de-
Pinna

VERSÃO CORRIGIDA

São Paulo

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) no formulário:
'<https://biblioteca.ib.usp.br/ficha-catalografica/src/ficha.php>'

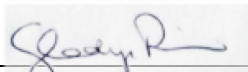
Edson-Chaves, Bruno
Lígulas em Poaceae : uma abordagem conceitual,
filogenética e ontogenética / Bruno Edson-Chaves ;
orientadora Gladys Flávia de Albuquerque Melo-de-
Pinna -- São Paulo, 2022.
137 p.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação
em Botânica.

1. Anatomia foliar. 2. Desenvolvimento foliar .
3. Gramínea. 4. Morfologia. 5. Ontogenia. I. de
Albuquerque Melo-de-Pinna, Gladys Flávia , orient.
II. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Comissão Julgadora:



Prof^a. Dr^a. Gladys Flávia de Albuquerque
Melo-de-Pinna (IB-USP / Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Dalva Graciano Ribeiro (UFG)

Prof. Dr. Christian da Silva (UDESC)

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Gonçalves (UFV)

Dedico esta tese aos meus pais, por sempre acreditarem nos meus sonhos e por todo o apoio durante essa longa caminhada até aqui.

“O Sonho é o que leva a gente para a frente.”

Ariano Suassuna

“O prazer de ensinar e ajudar as pessoas em sua busca de conhecimento vem sempre em primeiro lugar.”

Dr^a Berta Lange de Morretes

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a **Deus** por sempre estar presente me dando força e coragem para enfrentar os desafios em todos os momentos.

À minha orientadora e amiga **Prof^a Dr^a Gladys Flávia A. Melo de Pinna** (Flá), por todo seu entusiasmo, alegria e energia contagiantes, que nunca me deixou desanimar mesmo quando eu parecia “meio perdido”; ao longo desses oito anos de convivência foram tantas conversas, gargalhadas, caminhadas, conselhos, encontros e despedidas devido às minhas viagens... Sua maneira de agir, ver a vida e a ciência, e o amor e encantamento pela Anatomia Vegetal são fontes de grande inspiração para todos que têm a oportunidade de conviver contigo. Muito obrigado por sua generosidade e por ser um grande exemplo de pessoa e profissional. E, claro! Obrigado, sobretudo, por ter me apresentando ao gigantesco e rico mundo da Anatomia do Desenvolvimento e pelos estímulos para ler a literatura clássica.

À **Universidade de São Paulo** e ao **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo** por ser sempre tão acolhedores, pela infraestrutura disponibilizada e pela oportunidade de realizar o doutorado. Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, em face da bolsa concedida.

À prof^a. **Lynn G. Clark** por ter aceito colaborar com este trabalho e disposta a tirar dúvidas sempre que solicitadas, pelas experiências e conhecimentos compartilhados, bem como sugestão de bibliografias.

Ao prof. **Renato de Mello-Silva** (*in memoriam*) por seu entusiasmo e contribuições no estudo das monocotiledôneas e, em especial, com as palavras de apoio e estímulo durante o desenvolvimento inicial deste trabalho.

Aos meus pais, **José Lindenor F. Chaves Barros** e **Maria Socorro B. Edson Chaves**, pelo amor incondicional, incentivo e confiança. Por tantas vezes se doaram para que as coisas que faço e acredito obtivessem sucesso nesse doutorado; mais do que nunca vocês foram fundamentais participando ativamente desse estudo. Vocês são a minha base sem a qual nada desse sonho seria possível. A minha avó **Vicência Bezerra Edson** por ser um exemplo de fé, simplicidade e sabedoria e por sempre torcer por mim. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos **Manuela E. C. Regadas** (Lelinha), **Isabela E. C. Alencar** (Bebel), **Breno E. Chaves**, e cunhados **Daniel R. Pinto**, **João Paulo M. A. Tavares** e **Rafaela J. B. C. Mota** pelas palavras de incentivo, cumplicidade e apoio em todos os momentos da minha vida, especialmente nesses últimos anos.

Aos meus queridos sobrinhos, **Daniel Lucas C. Regadas, João Pedro E. Tavares, Linus E. M. Chaves, João Isaac E. Tavares, Carolinne C. Regadas** (Carolzinha) e **Ian E. M. Chaves**; vocês não têm ideia do quão importantes são para mim; obrigado por todo amor e carinho que tem por esse tio viajante. Novamente peço desculpas pela minha ausência.

À minha namorada **Marina Layara S. Benevides** por todo amor e paciência durante todos estes anos. Você que acompanhou de perto todo o processo acadêmico, desde o ingresso no doutorado até este momento, agradeço-lhe imensamente por seu apoio emocional, espiritual, por suas palavras carinhosas e de estímulo e, sobretudo, pela compreensão nos momentos que necessitei me ausentar.

Ao **Otávio L. M. da Silva** por todas as nossas conversas construtivas sobre filogenia de gramíneas e por toda ajuda e apoio no que concerne à reconstrução do caráter ancestral das lígulas, assim como no auxílio nas leituras e sugestões do texto do primeiro capítulo desta tese.

Aos professores **Gladys Flávia A. Melo de Pinna, Nanuza Luiza de Menezes, Diego Demarco, Marcelo C. Dornelas, Gilberto Ocampo** e **Alexandre V. Palaoro** pelo grande exemplo de profissionais e pelo compartilhamento de valiosos conhecimentos durante as aulas da pós-graduação que certamente me ajudaram na atividade profissional e desenvolvimento pessoal.

Aos professores **Nanuza Luiza de Menezes, Verônica Agyalossy** e **Diego Demarco** do laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade de São Paulo, pelas agradáveis conversas, ânimo e ensinamentos os mais diversos possíveis.

Aos funcionários do IB, em especial à **Noberto Palácios** e **Érika Takamoto** por todo o auxílio nas questões administrativas. As meninas da portaria **Rosinei A. dos Santos** (Rose) e **Elane B. Pimentel** por todos os “bem-vindos de volta” a cada regresso à USP, e pelas conversas sempre amigáveis que me ajudaram em diversas manhãs quando chegava ao Instituto de Botânica. E a todos os participantes dos encontros do **IB-Acolhe** durante os difíceis tempos de pandemia, que compartilharam inúmeras histórias e experiências comigo, além de poder contar com a torcida de todos.

Ao meu amigo **Aldair de França Neto** que muito antes das seleções de doutorado sempre me incentivou a fazer doutorado na USP. Por tantas vezes abriu as portas da sua casa para eu ficar nas minhas temporadas em São Paulo. Agradeço-lhe por todos os almoços, convívio, e por me mostrar um pouco essa rica, fascinante e impressionante cidade que é São Paulo.

Aos agrostólogos do **DetWeb**, em especial ao amigo **Christian Silva** por toda ajuda nas dúvidas que tive na identificação das gramíneas e por sempre compartilhar um pouco seu conhecimento e paixão por esse grupo de plantas tão maravilhoso.

Aos Prof. **Diego Demarco**, **José Hernandes Lopes Filho** e **Paula M. Elbl** que gentilmente aceitaram participar do exame de qualificação e ofereceram importantes sugestões para o andamento deste trabalho. Aos professores **Dalva G. Ribeiro**, **Christian da Silva** e **Ana Paula S. Gonçalves** pelas valiosas e inestimáveis sugestões na ocasião em que estiveram na Banca de defesa da tese.

Aos técnicos do laboratório de Anatomia vegetal do IB-USP, **Gisele Costa** e **Tássia Cristina dos Santos** por toda gentileza e paciência quando me ensinaram algum procedimento no laboratório estando sempre disponíveis a me ajudar, especialmente devido a minha rotina de viagens. E ao **Irwandro Pires** pelo auxílio na Microscopia Eletrônica de Varredura.

À equipe do AnatoEncontros (AE), **Gladys Flávia de A. Melo de Pinna**, **Rafael da Silva Cruz** e **Priscila A. Cortez**, vocês são pessoas inspiradoras que se dedicam imensamente para levar a Anatomia para todos os cantos do país (e do mundo), me estimulando cada vez mais a divulgar e demonstrar como a Anatomia é uma ciência particularmente incrível. Certamente o AE foi (e ainda é) uma parte fundamental desses últimos tempos e ampliou muito meu entendimento do que é fazer pesquisa em Anatomia Vegetal. É muito bom e gratificante poder fazer parte dessa equipe.

Aos colegas da Equipe Melo-de-Pinna, antigos e atuais, em especial ao **Arthur K. Chan**, **Carlos Eduardo V. Raymundo** (Cadu), **Fernanda M. C. Oliveira** (Fê), **Karla M. Vasconcelos**, **Leyde N. N. Santos-Silva**, **Priscila A. Cortez**, **Rafael S. Cruz** (Rafa), **Ricardo S. B. Vita**, **Thaíla V. A. Santos** e **Yasmin V. Hirao**, aos ICs e bolsistas TTT1 e aos demais que convivi nesses quase oito anos de USP cujas discussões como equipe foram fundamentais para esta caminhada até aqui. Agradeço também pelo auxílio durante as prévias da qualificação e da defesa.

À **Fernanda M. C. Oliveira** (Fê), **Leyde N. N. Santos-Silva**, **Karla M. Vasconcelos**, **Pâmela T. Silva** e **Thaíla V. A. Santos**, amigos com os quais compartilhei muitos momentos amigáveis durante o doutorado, pelas conversas “científicas” (e as não-científicas também), por toda a paciência, palavras de incentivo, força, parceria e ajuda.

Ao **Ricardo S. B. Vita** e **Yasmin V. Hirao** agradeço-lhes pela gentileza e profissionalismo de terem apresentado pacientemente o laboratório de Anatomia nas minhas primeiras vindas à São Paulo, por me mostrarem as técnicas (e as várias adaptações necessárias que não ficam nos livros) que estavam acostumados a realizar, ao tempo em que sempre foram muito prestativos.

Aos professores **Gladys Flávia de A. Melo de Pinna**, **Fernanda M. C. Oliveira**, **Ana Claudia Rodrigues**, **Dalva G. Ribeiro**, **Renê G. S. Carneiro** e **Guilherme Q. Freire**, e aos

amigos **Karla M. Vasconcelos, Priscila A. Cortez e Arthur K. Chan** pelas amplas discussões sobre a Anatomia Vegetal no Brasil dos últimos anos, que culminou na mesa-redonda no 71º Congresso Nacional de Botânica.

Aos demais colegas do laboratório de Anatomia Vegetal, **Israel L. Cunha Neto, Caian S. Gerolamo, Luiza T. Costa, Victor Sibinelli, Natalie V. Capelli, María Camila M. Montes** e tantos outros por toda a convivência, incentivo e apoio, e por terem tornado os meus dias de trabalho mais agradáveis e tranquilos. Em especial à **Mariana P. Victório**, com a qual foram muitos dias conversando e cortando material juntos, tanto que até peguei um pouco do sotaque paulistano. Obrigado pelos ensinamentos, conversas sempre muito agradáveis e pela amizade.

Ao **Mário de Pinna** e a **Júlia Pinna** (Ju), obrigado pelas inúmeras vezes que me receberam na família de vocês, sempre com muito carinho, atenção e gentileza; por todas as conversas, risadas e pelos bons momentos que desfrutamos juntos.

À **Priscila Schramm e Henrique Padovan** por sempre me receberem de braços abertos e estarem dispostos a conversar e fazer meus dias mais felizes a cada temporada que ia a São Paulo.

Aos professores do colegiado de Ciências Biológicas da Faculdade de Educação Ciências e Letras de Iguatu, da Universidade Estadual do Ceará (FECLI/UECE), em especial à **Alana Cecília de Menezes Sobreira**, pelo apoio, compreensão durante este tempo de doutorado e por sempre estar disposta a me escutar quando preciso. E a **Môngolla K. Freitas de Abreu** pela amizade, conversas sempre bem-humoradas, parceria e incentivo profissional.

Aos meus monitores da FECLI/UECE, **Paula G. Vicente, Jaiane Maria Silva, Gabrielle Santos, Rayana R. Silva, Flaviana de Carvalho, Lucas S. B. Brito, Carlos Diego F. Souza e Brenda S. M. Vieira** por toda ajuda ao longo desses anos; sem vocês certamente não teria conseguido conciliar as diversas atividades da UECE com o doutorado. Obrigado por sempre me escutarem e partilharem vários momentos de alegrias e tristezas. E aos demais (ex-)alunos de Monografia, Iniciação Científica, Extensão, Iniciação Artística e Permanência Universitária por serem uma fonte de incentivo para me tornar uma pessoa e um profissional cada vez melhor.

Ao meu **pai** (José L. F. C. Barros) e aos amigos **Roberto M. B. Lopes, Thiago V. de Autran Nunes, Thaís C. Tavares, Valéria S. Sampaio, Rafael D. Oliveira, William S. Carmo, Silvia D. C. Fernandes, Francisco Yago E. C. Dias, Ana Lívia C. S. Oliveira, Viviane O. T. Lemos, Gladston R. Carneiro Júnior, Lídia S. Maciel, Leyde N. N. S. Silva,**

Andressa Cabral, Charles Barros e Dauyzio A. Silva por toda ajuda nas coletas, que não foram poucas, cada uma mais inesquecível que a outra e com sua aventura particular.

Aos professores e amigos **Oriel H. Bonilla e Roselita M. S. Mendes**, meus orientadores da graduação, que sempre me incentivaram no campo da Botânica e acreditaram em mim desde o primeiro momento e que nunca deixaram de acompanhar de perto toda essa minha jornada. Por todos os conselhos pessoais e acadêmicos, ao longo de mais de 15 anos, e por sempre torcerem por mim, minha eterna gratidão.

À prof^a **Dalva Graciano Ribeiro** meu agradecimento por todos os ensinamentos durante e após o mestrado, por sua amizade, palavras de incentivo, pelo grande exemplo de dedicação e competência e por toda sua contribuição na área de Anatomia de Poaceae. E claro, por ter me apresentado as gramíneas, esse grupo de plantas tão incrível.

À prof^a. **Delmira da Costa Silva** cujo curso na XXX Reunião Nordestida de Botânica foi fundamental para me apaixonar por esta ciência, e pela sua gentileza em todos os momentos que nos encontramos posteriormente.

Aos amigos de Fortaleza, em especial à, **Manoel Paiva de A. Neto, Míriam Luzia N. M. Sousa, Roberto M. B. Lopes, Águeda S. M. F. Morel, Thiago V. Autran Nunes, Thaís C. Tavares, Renata S. Chikowski e Rafael D. Oliveira**; e aos amigos dos tempos de Brasília **Silvia D. C. Fernandes, Nádia S. Somavilla, Maria Teresa Faria, Izabelly S. Sant'Anna, William S. Carmo e Eliana M. L. Pinheiro** pela amizade sempre sincera e descontraída, palavras de incentivo e força em diversos momentos dessa trajetória. Com toda certeza, vocês contribuíram enormemente para o meu crescimento pessoal e profissional ao longo desses anos.

E às demais pessoas que não consegui colocar nesse texto, mas que estiveram direta ou indiretamente presentes na realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Resumo

Em Poaceae, as língulas são um dos melhores caracteres vegetativos para identificação, variando principalmente quanto à sua posição e morfologia. Todavia, ainda não há um consenso quanto à sua natureza e diversidade em um contexto evolutivo em Poaceae. Assim, o trabalho teve como objetivos: (i) realizar uma revisão para melhor compreender as variações morfológicas, conceituais e de diversidade estrutural das língulas em gramíneas; (ii) compreender a evolução deste caráter em Poaceae; (iii) analisar, sob o ponto de vista morfológico e anatômico, língulas de diferentes morfologias e em diferentes subfamílias; e (iv) avaliar o desenvolvimento de diferentes morfologias das língulas na busca de um melhor entendimento sobre seu conceito/definição. No que concerne à revisão, além da clareza para os termos homoligulado/heteroligulado e vascularizado ou não, podendo ser heterovascularizado, foram identificadas cinco hipóteses para a definição de língulas. Com base nos dados do GrassBase observamos que 92,56% dos representantes da família têm língulas ventrais homoliguladas, 0,96% não exibem língula, 4,73% não apresentam dados na base de dados; 1,75% têm língulas ventrais heteroliguladas. Língulas ventrais membranosas são comuns em Puelioideae e no clado BOP, membranosas-ciliadas em Pharioideae, e língulas ciliadas em Anomochlooideae e clado PACMAD, sendo Panicoideae a subfamília com a maior diversidade morfológica de língulas. Embora as língulas ventrais homoliguladas e ciliadas sejam consideradas estados ancestrais mais prováveis nas Poaceae, várias reversões ocorreram dentro das subfamílias. Já as língulas dorsais são comuns em Puelioideae e Bambusoideae. Para as análises morfológicas e anatômicas, por meio de microscopia óptica e de varredura, foram selecionadas 18 espécies com diferentes tipos de língulas e em diferentes subfamílias; 16 destas foram também analisadas quanto à ontogenia foliar. Onze, das 18 espécies, apresentam alterações na tipologia da língula registrada na literatura. Morfológicamente, o tipo de inserção da língula também revela potencial diagnóstico, com seis diferentes tipos de padrões, dos quais o arco convexo assimétrico foi o tipo mais comum observado. A anatomia de língulas desenvolvidas varia quanto à(o): região abaxial e marginal da língula, número de camadas de parênquima, presença ou ausência de espaços intercelulares no parênquima, presença de esclerênquima e sistema vascular. Os dados de ontogenia revelam que, independentemente do tipo de língula, o desenvolvimento ocorre em três estádios: (i) pré-língula, caracterizado por divisões anticlinais e periclinais da epiderme; (ii) inicial, demarcada estruturalmente por uma constrição na porção superior e divisões anticlinais e periclinais da região subepidérmica; e (iii) tardio, que é a fase de crescimento e individualização da língula que ocorre concomitantemente ao alongamento da bainha. A ausência de primórdio revela que, nas espécies analisadas, a língula mostra-se como uma expansão da porção superior da bainha, o que não descarta o fato de que morfológicamente pode ser considerado como uma estrutura à parte das demais regiões foliares devido ao seu valor diagnóstico. Vale destacar ainda que a ausência da língula em *Streptochaeta spicata* (Anomochlooideae), além de apresentar valor taxonômico, mostra-se com importante implicação evolutiva. Com este estudo das língulas ventrais em Poaceae por meio de diferentes abordagens foi possível obter uma maior clareza sobre sua definição na família, ampliar o conhecimento sobre a diversidade morfológica e anatômica e corrigir certas incongruências observadas na literatura. Todavia, dada a amplitude da temática outros estudos acurados deste caráter ainda se fazem necessários.

Palavras-chaves: Anatomia foliar, base foliar, desenvolvimento foliar, gramínea, morfologia da língula.

Abstract

In Poaceae, ligules are one of the best vegetative characters for identification, varying especially in their position and morphology. However, there is still no consensus about its nature and diversity in an evolutionary context in Poaceae. Thus, the objectives of this work were: (i) to perform a review to better understand the morphological, conceptual and structural diversity variations of the ligules in grasses; (ii) to understand how this character evolved in Poaceae; (iii) to analyze, under the morphological and anatomical point of view, ligules of different morphologies and different subfamilies; and (iv) to investigate the development of ligules having different morphologies, in order to better understand its concept/definition. Data obtained in the review clarified the terms homoligulated/heteroligulated and vascularized or not, which may also be heterovascularized, five hypotheses have been identified for the definition of ligules. Based on data gathered from GrassBase we observed that 92.56% of the representatives of the grasses, have homoligulated ventral ligules, 0.96% have no ligule, 4.73% have no data in the database; 1.75% have heteroligulated ventral ligules. We also found that membranous ventral ligules are common in Puelioideae and the BOP clade, membranous-ciliated in Pharioideae, and ciliated ligules in Anomochlooideae and PACMAD clade. Panicoideae is diagnosed as the subfamily with the greatest morphological diversity of ligules. Homoligulate and ciliated ventral ligules were reconstructed as plesiomorphic in the Poaceae, several reversals have occurred within subfamilies. Dorsal ligules are common in Puelioideae and Bambusoideae. For morphological and anatomical analyses, by means of light and scanning microscopy, 18 species with various types of ligules and in different subfamilies were selected; 16 of these proceeded to the analyses of leaf ontogeny. 11, of the 18 species, presented types of ligule that differ from information in the literature. Morphologically, the type of ligule insertion was found to be a potential diagnostic character with six different patterns, of which the asymmetrical convex arch was the most common type. The anatomy of developed ligules varied with respect to: abaxial and marginal region of the ligule, number of parenchyma layers, presence or absence of intercellular spaces in the parenchyma, presence of sclerenchyma, and vascular system. Ontogenetic data revealed that, regardless of the type of ligule, development occurs in three stages: (i) pre-ligula, characterized by anticlinal and periclinal divisions of the epidermis; (ii) inicial, structurally demarcated by a constriction in the upper portion and anticlinal and periclinal divisions of the subepidermal region; and (iii) final, which is the phase of growth and individualization of the ligule that occurs concomitantly with the elongation of the sheath. The absence of a primordium reveals that, at least in the species analyzed, the leaflet shows itself as an expansion of the upper portion of the sheath, which does not discard the fact that morphologically it can be considered as a separate structure from the other leaf regions due to its diagnostic value. It is important to emphasize that the absence of the ligule in *Streptochaeta spicata* (Anomochlooideae), besides presenting taxonomic value has important evolutionary implications. This study of the ventral ligules in Poaceae, using different approaches, clarified the definition of this character in the family, improved the knowledge on its morphology and anatomy, and corrected certain inconsistencies observed in the literature. However, given the broadness of the theme, further accurate studies of this character are still necessary.

Key words: leaf anatomy, leaf base, leaf development, grasses, leaf morphology.

Sumário

Resumo	10
Abstract	11
Introdução geral	14
Referências bibliográficas	17
Capítulo 1. The ligule in Poaceae: a historical and evolutionary review	21
Abstract e Resumo	22
1.1 Introduction	23
1.2 Diverse classifications of the ligule in Poaceae	25
1.3 History of the ligule concept in Poaceae	30
1.3.1 Ligule as an extension of the sheath	30
1.3.2 Ligule as a region specific to the grass leaf	33
1.3.3 Ligule as a stipule (or type of stipule)	34
1.3.4 Ligule as an extension of the leaf blade base	37
1.3.5 Ligule as formed by the fusion of different structures	37
1.3.6 Considerations on the historical aspects of the ligule concept	38
1.4 Study of the structural variation of ligules in Poaceae	39
1.4.1 Structural analysis of ventral ligules present in foliage leaves	39
1.4.2 Structural analysis of the dorsal ligules present in foliage leaves	44
1.4.3 Structural analysis of the ligules present in culm leaves	44
1.5 Distribution of ligule types in Poaceae phylogeny	45
1.5.1 Evolution of ventral and dorsal ligules present in foliage leaves	46
1.5.2 Evolution of ventral ligules in culm leaves	48
1.6 Conclusion	49
1.7 Acknowledgments	50
1.8 Funding and/or Conflicts of interests/Competing interests	50
1.9 References	51
1.10 Tables	65
1.11 Figures	69
Capítulo 2. Revisitando a morfologia e anatomia das lígulas de Poaceae	77
Resumo e Abstract	78
2.1 Introdução	79

2.2	Material e métodos	79
2.3	Resultados	81
2.3.1	Morfologia da região ligular	81
2.2.2	Anatomia das língulas desenvolvidas	83
2.4	Discussão	84
2.5	Conclusão	90
2.6	Agradecimentos	91
2.7	Financiamento	91
2.8	Literatura citada	91
2.9	Tabelas	96
2.10	Figuras	99
Capítulo 3. Compreendendo as diferentes variações das língulas ventrais de Poaceae por meio de uma abordagem ontogenética		107
	Resumo e Abstract	108
3.1	Introdução	109
3.2	Material e métodos	111
3.3	Resultados	113
3.4	Discussão	115
3.4.1	Como uma visão holística da ontogenia revela maior entendimento do conceito de língulas em Poaceae	115
3.4.2	Novas implicações sobre o surgimento das língulas em Poaceae com base em dados ontogenéticos de <i>Streptochaeta spicata</i>	120
3.5	Conclusão	122
3.6	Agradecimentos	122
3.7	Financiamento	122
3.8	Literatura citada	123
3.9	Tabelas	128
3.10	Figuras	130
Considerações finais		135
Biografia		137

Introdução Geral

Caracteres morfológicos geralmente fornecem a maior parte da informação usada na identificação de espécies vegetais, a partir de suas estruturas reprodutivas ou vegetativas (Judd *et al.*, 2009). No tocante às estruturas vegetativas, as folhas são as que exibem as mais extensas variedades de formas e estruturas (Vidal & Vidal, 1992).

Neste aspecto, diversos caracteres da lâmina foliar são importantes na taxonomia de determinados grupos como: formato, divisão do limbo, tamanho, tipo de margem, formato do ápice e da margem da lâmina foliar, venação, filotaxia (Bell & Bryan, 2008; Ellis *et al.*, 2009), além de características da base foliar como: presença e arranjo do pecíolo, bainha, estípulas, ócrea, aurículas e lígulas (Arber, 1925; Bell & Bryan, 2008).

O termo lígula é comumente empregado em certos grupos de licófitas (*Selaginella* e *Isoetes*) e em monocotiledôneas (Alismatales, Zingiberales e Poales). Contudo, esta terminologia deve ser usada com cuidado uma vez que não representam estruturas homólogas nesses grupos taxonômicos (Rudall & Buzgo, 2002).

Em Poales este caráter surgiu pelo menos duas vezes, sendo encontrado em seis diferentes famílias: Juncaceae, Cyperaceae, Flagellariaceae, Joinvilleaceae, Ecdeiocoleaceae e Poaceae (Stevens, 2001). Destas famílias, a que apresenta maior variação da estrutura é Poaceae (Metcalf, 1960), distinguindo-se, principalmente, pela: vascularização (Mauseth, 1988), posição (p.ex. dorsais e ventrais) (McClure, 1966; Mitideri, 1992; Longhi-Wagner *et al.*, 2001), morfologia (Neumann, 1938; Metcalf, 1960; Soreng & Davis, 1998; Longhi-Wagner *et al.*, 2001; Clayton *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2016), tamanho (Dahlgren *et al.*, 1985; Klapp, 1987), consistência, indumento, cor, forma e margem (Looman, 1982; Klapp, 1987; Mitidieri, 1992; Clayton *et al.*, 2006; Gandhi *et al.*, 2016; Ibrahim *et al.*, 2016). Devido a esta variação é considerada por muitos autores como um caráter de grande valor taxonômico (Clifford, 1969; Webster & Reyna, 1988; Hubbard, 1992; GPWG *et al.*, 2001; Longhi-Wagner *et al.*, 2001; Michelangeli *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2008), especialmente na distinção entre as tribos (Tzvele, 1989).

Embora mais de um tipo de lígula possa ocorrer nas subfamílias de Poaceae (Watson & Dallwitz, 1992; Longhi-Wagner *et al.*, 2001), Kellogg (2015) cita que lígulas dorsais membranosas predominam entre os membros do clado BOP (Bambusoideae, Oryzoideae e Pooideae), enquanto as ciliadas nas subfamílias do clado PACMAD (Panicoideae, Aristidoideae, Chloridoideae, Micrairoideae, Arundinoideae e Danthonioideae).

Todavia não se sabe como ocorre, de fato, a distribuição das lígulas nas diferentes subfamílias, especialmente referente às lígulas membranosas-ciliadas. Alguns autores sugerem que as lígulas pilosas são resultado da redução de lígulas membranosas ocorrida durante a evolução do caráter no grupo, e que, portanto, as lígulas membranosas-ciliadas seriam um estágio intermediário entre as duas (Metcalf, 1960; Gould, 1968; Hubbard, 1992; Chaffey, 2000).

Historicamente, muitos autores tentaram definir o que é lígula em Poaceae, tendo cinco hipóteses principais: (i) extensão da bainha, (ii) região distinta da bainha e lâmina foliar da folha de gramíneas, (iii) uma estípula, ou tipo de estípula, (iv) extensão da base da lâmina foliar, e (v) uma fusão de diferentes estruturas, como será explorado em mais detalhes no capítulo 1. Todavia, tais definições tomam como ponto de partida principalmente estudos sobre a morfologia de lígulas membranosas.

Anatomicamente, dos três tipos morfológicos de lígulas existentes, as lígulas membranosas foram as que detiveram mais atenção (Arber, 1923; Philipson, 1935; Chaffey, 1982, 1983, 1984, 1985a, 1985b, 1985c, 1985d, 1985e, 1994, 2000; Sylvester *et al.*, 1990; Rudall & Buzgo, 2002; Szabó *et al.*, 2006).

Tal estrutura é descrita por Chaffey (2000) como apresentando um sistema de revestimento constituído por uma epiderme unisseriada, com face adaxial e abaxial distintas; a face adaxial da epiderme apresenta apenas células longas, enquanto a face abaxial é composta por diversos elementos estruturais (p.ex. tricomas do tipo espinho e ganchos). Outras diferenças marcantes entre as duas faces da epiderme, destacadas por este autor, referem-se à espessura da cutícula e da parede tangencial externa, bem como caracteres ultraestruturais.

Uma vez que as lígulas demarcam a junção entre a bainha e a lâmina, sua ocorrência tem sido usada como marcador estrutural nos estudos de desenvolvimento foliar (Rudall & Buzgo, 2002; Foster & Timmermans, 2009). Para Freeling *et al.* (1988) o desenvolvimento da região ligulada, na qual estão presentes lígula e aurícula, envolve uma coordenação precisa de vários processos complexos que ocorrem em diferentes tecidos. Do ponto de vista micromorfológico, o desenvolvimento de lígulas foi estudado para *Zea mays* L.; nesta espécie, uma banda pré-ligular, constituída por uma faixa linear de células quadradas entre a lâmina foliar e a bainha, surge no terceiro plastocrono (P3); posteriormente, as células da banda pré-ligular dividem-se periclinamente e alongam-se para produzir a lígula membranosas (Sylvester *et al.*, 1990). O mesmo processo descrito para *Z. mays* (Panicoideae) foi observado por Fahn (1990) em *Oryza sativa* L. (Oryzoideae), duas espécies que apresentam lígula membranosas. Portanto, faltam

estudos que foquem nas demais morfologias de lígulas e que utilizem diferentes metodologias para compreensão da ontogenia da estrutura.

Do ponto de vista morfoanatômico, o desenvolvimento foliar das angiospermas continua menos compreendido em relação ao de outros órgãos (Cruz, 2013). Das partes da folha, de forma mais específica de folhas de Poaceae, a lígula é a região mais negligenciada diante da grande variedade de tipos morfológicos (Szabó *et al.*, 2006), sendo necessária uma análise mais aprofundada destas estruturas em um contexto anatômico e de desenvolvimento, especialmente das lígulas presentes no clado das comelinídeas (Rudall & Buzgo, 2002), no qual se insere a família.

Estrutura geral da tese

O trabalho está dividido em três capítulos; o primeiro trata de uma revisão que objetiva apresentar as variações estruturais da lígula, bem como a diversidade de conceitos em mais de dois séculos de estudos envolvendo gramíneas. Além disso, traz também a variação na morfologia da lígula nas 12 subfamílias de Poaceae, bem como o entendimento de como ocorreu essa variação por meio da reconstrução de estados ancestrais.

No segundo capítulo são apresentados os aspectos morfológicos e anatômicos de lígulas membranosas, membranosas-ciliadas e ciliadas em 18 espécies de oito subfamílias de Poaceae. Além de um maior entendimento sobre as lígulas das espécies selecionadas do ponto de vista morfológico e anatômicos, procurando ampliar o conhecimento destes caracteres na família.

Por fim, o terceiro capítulo, por meio de uma abordagem ontogenética em 16 espécies de oito subfamílias com diferentes morfologias de lígula, procura conceituar as lígulas em Poaceae, bem como apresentar novas implicações para a história evolutiva deste caráter na família.

Referências Bibliográficas

- ARBER, A. Leaves of the Gramineae. **Botanical Gazette**, v. 76, n. 4, p. 374-388, 1923.
- ARBER, A. **Monocotyledons**: a morphological study. Cambridge: Cambridge University Press, 1925.
- BELL, A. D.; BRYAN, A. **Plant form**: an illustrated to flowering plant morfology. Portlan and London: Timber press, 2008.
- CHAFFEY, N. J. Presence of stomata-like structures in the ligule of *Agrostis gigantea* Roth. **Annals of Botany**, v. 50, n. 5, p. 717-720, 1982.
- CHAFFEY, N. J. Epidermal Structure in the Ligule of Rice (*Oryza sativa* L.). **Annals of Botany**, v. 52, p. 13-21, 1983.
- CHAFFEY, N. J. Epidermal structure in the ligules of four species of the genus *Poa* L. (Poaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 89, n. 4, p. 341–354, 1984.
- CHAFFEY, N. J. Structure and Function in the Grass Ligule: Presence of Veined and Membranous Ligules on the Same Culm of British. **New Phytologist**, v. 101, p. 613-621 1985a.
- CHAFFEY, N. J. Structure and Function in the Grass Ligule: the newly-initiated ligule of *Lolium temulentum* L., a light and electron microscope study. **Annals of Botany**, v. 55, p. 225-534, 1985b.
- CHAFFEY, N. J. Structure and Function in the Grass Ligule: Optical and Electron Microscopy of the Membranous Ligule of *Lolium temulentum* L. **Annals of Botany**, v. 55, p. 65-75, 1985c.
- CHAFFEY, N. J. Structure and function in the grass ligule: the membranous ligule of *Lolium temulentum* L. as a secretory organ. **Protoplasma**, v. 127, p. 128-132, 1985d.
- CHAFFEY, N. J. Structure and Function in the Grass Ligule: Presence of Veined and Membranous Ligules on the Same Culm of British Grasses. **New Phytologist**, v. 101, p. 613-621, 1985e.
- CHAFFEY, N. J. Structure and function of the membranous grass ligule: a comparative study. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 116, p. 53-69, 1994.
- CHAFFEY, N. J. Physiological anatomy and function of the membranous grass ligule. **New Phytologist**, v. 146, p. 5-21, 2000.

- CLAYTON, W. D., VORONTSOVA, M. S., HARMAN, K. T., WILLIAMSON, H. GrassBase - The Online World Grass Flora, 2006 em diante. Disponível em: <<http://www.kew.org/data/grasses-db.html>>. Acesso em 22 Nov. 2021.
- CLIFFORD, H. T. Attribute correlation in the Poaceae (grasses). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 62, p. 59-67, 1969.
- CRUZ, R. **Caracteres morfoanatômicos e ontogenéticos foliares de *Metrodorea* A.St.-Hil. e espécies relacionadas (Rutaceae) sob uma perspectiva filogenética**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Botânica), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil, 2013.
- DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The families of the monocyledons: structure, evolution and taxonomy**. Berlin, Heidelberg, Ney York and Tokyo: Springer-Verlag, 1985.
- DAS, M.; BHATTACHARYA, S.; SINGH, P.; FILGUEIRAS, T. S.; PAL, A. Bamboo Taxonomy and Diversity in the Era of Molecular Markers. **Advances in Botanical Research**, v. 47, p. 225-268, 2008.
- ELLIS, B.; DALY, D. C.; HICKEY, L. J.; JOHNSON, K. R.; MITCHELL, J. D. WILF, P.; WING, S. L. **Manual of leaf architecture**. Ithaca: The New York Botanical Garden press, 2009.
- FAHN, A. **Plant Anatomy**. Oxford: Pergamon Press. 1967.
- FOSTER, T. M.; TIMMERMANS, M. C. P. Axial Patterning of the Maize Leaf. *In*: BENNETZEN, J. L.; HAKE, S. C. (org.). **Handbook of Maize: Its Biology**. 161-178, New York: Springer, 2009.
- FREELING, M.; BONGARD-PIERCE, D. K.; HARBERD, N.; LANE, B.; HAKE, S. Genes involved in the patterns of maize leaf cell division. *In*: Verma, D. P. S.; Goldberg, R. B. (eds.) **Temporal and spatial regulation of plant genes**. New York: Springer-Verlag, 41-62. 1988.
- GANDHI, D.; ALBERT, S.; PANDYA, N. **Handbook on the morphology of common grasses: identification and characterization of caryopses and seedlings**. Oakville: Apple Academic Press. 2016.
- GOULD, F. W. **Grass Systematics**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1968.
- GPWG - Grass Phylogeny Working Group. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 88, n. 3, p. 373-457, 2001.
- HUBBARD, C. E. **Grasses: a guide to their structure, identification, uses and distribution in the British Isles**, ed. 3. London: Penguin Books. 1992.

- IBRAHIM, K. M.; HOSNI, H. A.; PETERSON, P. M. **Grasses of Egypt**. Washington D.C.: Smithsonian Institution Scholarly Press, 2016.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- KELLOGG, E. A. Flowering Plants Monocots: Poaceae. *In.*: KUBITZKI, K. **The families and genera of vascular plants**, 13: 1-416. New York: Springer International. 2015.
- KLAPP, E. **Manual de las gramíneas**, ed. 11. Barcelona: Omega. 1987.
- LONGHI-WAGNER, H. M.; BITTRICH, V.; WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J. Poaceae. *In.*: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M. (coords.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**, 1: 1-291. São Paulo: FAPESP/Hucitec., 2001.
- LOOMAN, J. **Prairie grasses: identified and described by vegetative characters**. Ottawa: Minister of Supply and Services Canada. 1982.
- MAUSETH, J.D. **Plant anatomy**. San Francisco: The Benjamin Cummings Publishing Company, 1988.
- McCLURE, F. A. A Glossary of the Bamboos. **Taxon**, v. 15, n. 6, p. 220-235, 1966.
- METCALFE, C. R. **Anatomy of the monocotyledons: I Gramineae**. New York: Clarendon Press, 1960.
- MICHELANGELI, F. A.; DAVIS, J. I.; STEVENSON, D. W. Phylogenetic relationships among Poaceae and related families as inferred from morphology, inversions in the plastid genome, and sequence data from the mitochondrial and plastid genomes, **American Journal of Botany**, v. 90, n. 1, p. 93–106, 2003.
- MITIDERI, J. **Manual de Gramíneas e leguminosas para pastos tropicais**, ed. 2. São Paulo: Nobel e EdUSP, 1992.
- NEUMANN, H. Zur Kenntniss der Anatomie und ersten Anlage der Gramineenligula. **Beiträge zur biologie der pflanzen**, v. 25, p. 1-22. 1938.
- OLIVEIRA, R. C.; REIS, P. A.; CARDOSO, A. G. T.; RIBEIRO, A. R. O.; BERTO, A. C. V.; PONCIANO, A. I. C.; MOURA, C. O.; VALLS, J. F. M. **Guia de gramíneas do Cerrado**. Brasília: Rede de sementes do cerrado. 2016.
- PHILIPSON, W. R. The development and morphology of the ligule in grasses. **The New Phytologist**, v. 34, n. 4, p. 310-325, 1935.
- RUDALL, P. J.; BUZGO, M. Evolutionary history of the monocot leaf. *In.*: CRONK, C. B. Q.; BATEMAN, R.; HAWKINS, J. [eds.]. **Developmental genetics and plant evolution**. London: Taylor and Francis, 2002.

- SORENG, R. J.; DAVIS, J. I. Phylogenetics and Character Evolution in the Grass Family (Poaceae): Simultaneous Analysis of Morphological and Chloroplast DNA Restriction Site Character Sets. **The Botanical Review**, v. 64, n. 1, 1-85, 1998.
- STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017. 2001 em diante. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em 11 mar. 2022.
- SYLVESTER, A. W.; CANDE, W. Z.; FREELING M. Division and differentiation during normal and liguleless-1 maize leaf development. **Development**, v. 110, p. 985-1000. 1990.
- SZABÓ, Z. K.; PAPP, M.; DARÓCZI, L. Ligule anatomy and morphology of five *Poa* species. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 48, p. 83–88, 2006.
- TZVELEV, N. N. The system of grasses (Poaceae) and their evolution. **The Botanical Review**, v. 55, n. 3, p. 141-203, 1989.
- VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. **Botânica**: organografia. Viçosa: editora UFV, 1992.
- WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The grass genera of the world**, 2 ed. Wallingford, UK: CAB International, 1992.
- WEBSTER, R. D.; REYNA, J. V. Genera of mesoamerican Paniceae (Poaceae: Panicoideae), **Contributions to Botany**, v. 13, n. 2, p. 187-221, 1988.

Capítulo 1

The ligule in Poaceae: a historical and evolutionary review

A lígula em Poaceae: uma revisão histórica e evolutiva

Bruno Edson-Chaves; Otávio L. M. da Silva; Lynn G. Clark; Gladys Flávia de A. Melo-de-Pinna

Abstract

Ligules are classified, predominantly, on their position and morphology, which are still without a consensus as to their nature and diversity in an evolutionary context in Poaceae. Based on a broad review of this structure, we have identified five hypotheses for the definition of ligules, originating between the years 1800 and 1834; some of these hypotheses are still valid today. Our results also demonstrate that 95.28% of the family representatives have homoligulate ventral ligules and 1.75% have heteroligulate ventral ligules, with Panicoideae being the subfamily with the greatest morphological diversity of ligules. Dorsal and culm leaf ligules occur mainly in Puelioideae and Bambusoideae (except in Olyreae), and may occasionally occur in Pooideae, Panicoideae and Chloridoideae. Although homoligulate and ciliate ventral ligules are ancestral states in the Poaceae, several reversals occurred within the subfamilies so that the eciliate membrane type is more common (especially in the BOP clade).

Keywords Ancestral state reconstruction; Gramineae; Leaf base; Monocotyledons; Vegetative morphology.

Resumo

Lígulas são classificadas, predominantemente, por sua posição e morfologia, todavia ainda não há um consenso quanto à sua natureza e diversidade em um contexto evolutivo em Poaceae. Com base em uma ampla revisão desta estrutura, identificamos cinco hipóteses para a definição de lígulas, originadas entre os anos de 1800 e 1834; algumas destas hipóteses ainda são válidas hoje. Nossos resultados também demonstram que 95,28% dos representantes da família têm lígulas ventrais homoliguladas e 1,75% têm lígulas ventrais heteroliguladas, sendo Panicoideae a subfamília com a maior diversidade morfológica de lígulas. As lígulas dorsais e das folhas do colmo ocorrem principalmente em Puelioideae e Bambusoideae (exceto em Olyreae), e podem ocasionalmente ocorrer em Pooideae, Panicoideae e Chloridoideae. Embora as lígulas ventrais homoliguladas e ciliadas sejam consideradas estados ancestrais nas Poaceae, várias reversões ocorreram dentro das subfamílias, de modo que o tipo membranoso é mais comum (especialmente no clado do BOP).

Palavras-chave Reconstrução do estado ancestral; Gramíneas; Base foliar; Monocotiledôneas; Morfologia dos órgãos vegetativos.

1.1 Introduction

Morphological characters provide most of the information used to identify plant species (Judd et al., 2009). Regarding vegetative structures, leaves exhibit the most extensive variations in shape (Vidal & Vidal, 1992), with characteristics of the leaf blade important for the taxonomy of certain groups, such as: shape, division of the leaf blade, size, kind of margin, apex and leaf blade margin shapes, venation and phyllotaxis (Bell & Bryan, 2008; Ellis et al., 2009), in addition to characteristics of the leaf base, such as: presence and arrangement of the sheath, petiole, stipules, hastula, ocrea and ligule (Arber, 1925; Bell & Bryan, 2008).

The term ligule means “small tongue” (Palisot de Beauvois, 1812), a structure that is present at the base of the leaf in several plant groups such as lycophytes (*Selaginella* and *Isoetes*) and many monocotyledons. The term ligule (or ligulate) has also been applied to the corolla in Asteraceae. However, ligules represent distinct structures in each of these taxonomic groups (Hertel, 1974; Oxford, 1996; Bailey, 2003; Beentje, 2016), so the term ligule should be used with care, as it reflects non-homologous structures (Rudall & Buzgo, 2002). Hertel (1974) regrets that the term ligule has been used in a widespread manner, defining it as any membranous, liguliform appendage on the stem, on sterile or fertile leaves, on petals, or even the gamopetalous corolla itself. Eames (1961), Font Quer (1965) and Schultz (1973) apply the term ligule to the rigid growth at the base of the leaf blade of Arecaceae. However, the correct name for this structure in palm trees is hastula (Gonçalves & Lorenzi, 2007; Beentje, 2016), as it can occur on both surfaces of the leaf and is not associated with the sheath (Dahlgren & Clifford, 1982).

In monocotyledons, the ligule is present in Alismatales (Araceae), Asparagales (Asphodelaceae and Amaryllidaceae), Liliales (Melanthiaceae), Commelinales (Pontederiaceae), Zingiberales (Zingiberaceae and Costaceae), Poales (Xyridaceae, Juncaceae, Cyperaceae, Restionaceae, Joinvilleaceae and Poaceae) (Dahlgren & Clifford, 1982) and Arecales (Arecaceae) (Simpson, 2010). According to Font Quer (1965), leaves that have ligules are called ligulate.

In Poales, according to Stevens (2001), this character appeared at least: 1) in the group formed by [Juncaceae + Cyperaceae] and 2) in [Flagellariaceae [[Joinvilleaceae + Ecteiocoleaceae] Poaceae]], six families in total. The author did not comment on the presence of the structure in Xyridaceae and Restionaceae as mentioned by Dahlgren and Clifford (1982). Although Michelangeli et al. (2003) indicated that this character is more striking in the second group mentioned above. It is worth mentioning that, among the species chosen by the authors,

the representatives of Cyperaceae and Juncaceae do not have ligules, and according to Camelbeke & Goetghebeur (1999) and Balslev (1996), this character may or may not be present in species of these families. In this respect, Dahlgren & Clifford (1982) estimate that this character is only present in about 10% of the Cyperaceae genera, including *Fuirena*, *Scirpus*, and some species of *Scleria*. Ligules have also been documented in *Eriophorum*, *Gahnia*, *Schoenus*, *Trichophorum*, a few very small genera (*Actinoschoenus*, *Actinoscirpus*, *Amphiscirpus*, *Gymnoschoenus*, *Mesomelaena*, *Neesenbeckia*, *Oreobolopsis* and *Ptilothrix*), some species of *Tetraria* (Goetghebeur, 1998) and *Carex* (Cusset & Thi-Tuyet, 1965; Hipp, 2008).

Among the families mentioned above, it is worth emphasizing Poaceae, considered the fifth largest family of angiosperms in the world, with 759-769 genera and 11,554-12,120 species (Clayton et al., 2006; The Plant List, 2013; WCSP, 2020). Morphologically, species of this family have leaves that are distichous or rarely spiral, with the sheath commonly open, parallel-veined, and usually with a ligule between the sheath apex and the base of the adaxial surface of the leaf blade (Judd et al., 2009; Kellogg, 2015; Souza & Lorenzi, 2019). The family also has the greatest structural diversity of ligules among those known (Metcalf, 1960; Mitidieri, 1992), which will be explored in detail in this study. Although Chapman (1996) did not give due importance to the ligule character, many authors emphasize its great taxonomic value (Bor, 1940; Sekine, 1959; Clifford, 1969; Moul, 1973; Webster & Reyna, 1988; Hubbard, 1992; Soreng & Davis, 1998; GPWG, 2001; Longhi-Wagner et al. 2001; Bailey, 2003; Michelangeli et al., 2003; Das et al., 2008; Gibson, 2009; Hagenbuch & Lemke, 2015), especially in the distinction between tribes (Tzvelev, 1989). Copple & Pase (1967) highlight the ligule as offering one of the best sets of vegetative characters for identification.

In grasses, as in other Poales, the ligule marks the adaxial intersection between the sheath and the blade (Ferri et al., 1981; Bell & Bryan, 2008), which has been used as a structural marker in leaf development studies (Rudall & Buzgo, 2002; Foster & Timmermans, 2009). Functionally, due to its position on the leaf, Sutherland & Eastwood (1916), Chaffey (1982, 1983) and Pathak et al. (2013) suggest that the ligule plays a passive protective role, as it is in direct contact with the culm, by preventing water and impurities from settling between the leaf sheath and the stem, making it a sealant. Chaffey (1994) describes this idea as “the exclusion hypothesis”, initially proposed in studies from the late 19th and early 20th centuries (Hackel, 1887; Tyler, 1897; Goebel, 1898; Ward, 1901). However, such a function should not be considered for all types of ligules, especially those formed by a set of trichomes (Chaffey, 1985a).

Chaffey (1985b) points out that the ligule is a highly specialized organ, with evidence of it being photosynthetic. Furthermore, in some species, this structure may also have a secretory function (Chaffey, 2000), as well as assist in growth and development of the stem apex (Harris, 2014). The work of Birkby & Peerce (1987) also found that microbial populations (fungi and bacteria) present in the ligules and adjacent regions increased after the emergence of the leaf and declined as the leaf entered senescence, so that the ligular region became, in addition to the aforementioned functions, an important microbial niche. Oliveira et al. (2016) emphasize that a probable function of the ligule would be to protect the bud in the axil of the sheath. Since experimental works on the functions of the ligule in Poaceae have not been found in the literature, all ideas about the function of this structure are speculative.

The ligular region, comprising the ligule, auricle and collar, in interaction with the leaf sheath and blade, is highlighted by Richardson & Hake (2019) as responsible for influencing plant height and leaf angle, which have direct impacts on plant productivity. Nelson & Moore (2020) also point out that the ligule still has an important role in the phenotypic plasticity of grasses. For example, if leaves are in shaded areas, the blade will remain more upright; if exposed to light and with little competition, the cells of the ligule will elongate to position the leaf blade more horizontally, allowing it to capture more light and shade the neighboring plants, increasing competition for light.

Since the ligule is of fundamental importance for Poaceae, a revision of this structure is necessary, considering all of its complexity and diversity of forms, underemphasized in the literature. This study also seeks to present the variety of existing concepts for the structure in a historical context, in addition to describing the phylogenetic distribution of the ligule in the different subfamilies of Poaceae and to discuss evolutionary aspects of the ligule within grasses.

1.2 Diverse classifications of the ligule in Poaceae

As for the review of ligule's morphological classifications and their understanding in a historical context, which will be discussed in topics II and III, a search was made in different databases, such as: (i) Google scholar (<https://scholar.google.com.br/>); (ii) Periódicos da CAPES (www.periodicos.capes.gov.br); (iii) Internet Archive (<https://archive.org/>); (iv) Gallica (<https://gallica.bnf.fr/>); and (v) Biodiversity Heritage Library (<https://www.biodiversitylibrary.org/>), in addition to the consultation of printed books available in the libraries of the University of Sao Paulo, University of Brasilia and personal collection of the authors. We searched for references between 1800 and 2020 containing

information on ligules in Poaceae (Gramineae) in English, French, Spanish, Portuguese, German, Italian, Russian and Japanese. Among the references used are: textbooks (books of Plant Systematics, plant morphology, glossaries/dictionaries and didactic texts), floras, or experimental works of anatomy or specific reviews.

In Poaceae, ligules have been classified in different ways, most notably related to their position/location, morphology, size or vascularity (Klapp, 1987; Clayton et al., 2006). They can be ventral, or internal (as suggested by McClure, 1966), when they occur facing the adaxial side of the leaf (Figures 1a-1h) ; or dorsal (“external ligule”) when they consist of a defined line of trichomes, long or short, or more rarely a ciliate membrane that occurs in the collar region, located on the abaxial side of the leaf opposite the ventral ligule (Mitideri, 1992; Longhi-Wagner et al., 2001) (Figures 1i-1l). Depending on the study, the definitions of ventral and dorsal ligule can be confusing. Although Rudall & Buzgo (2002) assume that these two structures are homologous, they describe the ligular structure facing the adaxial side of the leaf as a dorsal ligule, while the ligular structure facing the abaxial side is called a contraligule (tongue, false ligule, lingular or pseudoligule).

Although the term contraligule is used by some authors (Dahlgren et al. 1985; Watson & Dallwitz, 1992; GPWG, 2001) for Poaceae, Longhi-Wagner et al. (2001) recommend the use of the term “external ligule” when referring to the dorsal ligule (a concept that we adopt here), since the term contraligule has a different meaning in Cyperaceae. In this other family, contraligula is described as a membranous, ligule-like structure “being a (\pm triangular) outgrowth on top the leaf sheath on the opposite side of the leaf blade” (Camelbeke & Goetghebeur, 1999, p. 77).

Another important point is that when the position of the ligule is not mentioned (either ventral/internal/adaxial or dorsal/external/abaxial), it is implied that it refers to the ventral ligule, since this is the most common position in the group, a common practice in Poaceae taxonomy that will also be used in this review. Lastly, based on the assumption that contraligule is a term that should be applied only to Cyperaceae, we also understand that this term is not synonymous with pseudoligule as accepted by Rudall & Buzgo (2002). According to some authors (Freckmann, 1967; Gould & Clark, 1978; Thomas, 2008; Leitner & Sherfinski, 2012), the pseudoligule is more properly applied to a pilose portion of the blade base, often formed by macrotrichomes that can occur between the ligule and the blade. This structure may have a different length, and is apparently more distinctive when associated with short ligule (Thomas, 2008).

Ventral and dorsal ligules may be present or absent. When present, they can be membranous, formed of hairs, or mixed (Neumann, 1938). Subsequently, Metcalfe (1960) defined them as membranous (laminar), membranous-ciliate or reduced to a pilose margin, the latter of which can also be called ciliate (Oliveira et al., 2016).

Sekine (1959), while studying 57 species from 42 Japanese Poaceae genera, identified 11 patterns of ligule variation, which he identified as patterns A to K. However, when looking at the descriptions and images we can see that types A to H are variations in the shape and size of the membranous ligules (e.g., long and cylindrical, triangular, acute apex, semicircular, semicircular and oval, truncated long, truncated short, tapered in the center and at the ends), thus the 11 types described by Sekine could be reduced to 4 forms: membranous, membranous-ciliate, ciliate and absent, approaching Metcalfe's (1960) proposal. Copple & Pase (1967) distinguish the ligules as membranous, truncate-ciliate (membranous with a ciliate margin), hairy or collar-like, and even though a detailed description of each type of ligule is not provided, the images presented resemble the types proposed by Metcalfe (1960), the collar-like type representing species without ligules (absent).

Membranous-ciliate ligules have come into question by some authors. Soreng and Davis (1998) and Bresinsky et al. (2012), for example, reduce the types proposed by stating that ligules are membranous (with or without fringe of hairs) or fringe of hairs only, and do not consider membranous-ciliate ligules as a separate type. Hagenbuch & Lemke (2015) follow this same classification (membranous or pilose), but give further detail on the membranous ligules, stating that they may vary according to the shape of the apex (acute, obtuse or truncate) and the margin (entire, erose, lacerate, ciliate, or ciliolate), being decurrent with or adnate to the sheath.

Longhi-Wagner et al. (2001), as well as Metcalfe (1960), maintain the name of three morphological types of ligules in Poaceae, indicating that the family has membranous, membranous-ciliate and ciliate ligules, as well as possibly being absent in some species. Fish et al. (2015), in turn, describe three types: unfringed membrane, fringed membrane and a fringe of hairs, with gradations between the three types, especially the last two. Clayton et al. (2006), on the other hand, presents a classification proposal in which he subdivides the membranous-ciliate ligules into two types, so that the ligules are described as: a) eciliate membrane (EM), without apical hairs; b) ciliolate membrane (CiM), with membrane and short apical hairs; c) ciliate membrane (CM), with membrane and long hairs; d) fringe of hairs (FH), i.e., a fringe of trichomes whose membrane is absent (Figures 1a-1h). This classification is followed by Ibrahim et al. (2016).

Observing the different classifications of the morphologies of the ligules, we note that these may indicate that the ligules present from two (Soreng & Davis, 1998; Bresinsky et al., 2012) to five character states (Clayton et al., 2006), and that it was apparently categorized in an arbitrary manner. Since it is apparently shown as a variation of a single theme and, in a way, of a morphological continuum that involves different proportions between membrane and trichome lengths (transitions from different states) it is necessary ontogenetic studies for a better establishment of these classifications and from there to revisit and rethink with a new look the classification for the morphology of the Poaceae ligules. Until then, given the variation of existing classifications one should always inform which author/work is following.

Given the variation within membranous ligules (Figures 1a-1d), some authors such as Dahlgren et al. (1985) still divide them as short or long, however, they do not define what constitutes a short or long ligule, or whether this parameter is based on an absolute measurement or comparison with another structure to determine relative length. For Klapp (1987), the size of the ligules is an important characteristic that applies to all types of ligule, and can be classified as: a) (very) short, when it is very narrow, noticeable only when observing the region from an oblique direction and moving the leaf blade away from the viewer; b) short to medium, when it is noticeable but its height is less than the width (region of the base of the leaf blade); c) long, when it is very evident, such that the height is equal (or almost equal) to the width; d) very long, when the height is much greater than the width (Figure 1). Armstrong (1917) mentions that the determination of length must be made from the upper leaf ligules, as in some grasses, the ligules of the upper leaves differ in size from those of the lower leaves of the same culm.

Nevertheless, the size of the ligule for taxonomic criteria must be used with care, as it is considered plastic. Gonzalo et al. (2013) state that this parameter can vary even within the same plant. This is possibly due to the natural wear of the structure, which makes its size somewhat inconsistent, as described by Phillips (1962). Considering that Looman (1982) mentions that the length of the ligule may vary within a species, we suggest that, if this criterion is used, the position of the leaf to be measured is standardized, and more than one leaf at the same stage of development should be measured. Given that the size issue is not well resolved, the classification proposed by Clayton et al. (2006) is more appropriate and better describes the structural variation of ligules.

Regarding the vascularization of ligules, Mauseth (1988) highlights that for a long time, ligules were classified into two categories: vascularized and non-vascularized. The latter is called the general (Thi-Tuyet, 1963) or membranous (Chaffey, 1985a) ligule. The

vascularization of ligules of certain species was reported by Belzung (1900), Thi Tuyet Hoa (1963), and Chaffey (1994), among others. In the case of vascularized ligules, Colomb (1887) describes a vascular plexus in which certain bundles of the leaf blade depart for the ligule and others for the sheath. A given species may have two types of ligule in terms of vascularization, and in this case the plant is called heteroligulate (Chaffey, 1994). Accordingly, Goebel (1898) indicates that only the ligules of the most developed leaves, present in the lower part of the culm, have vascularization.

On the other hand, Chaffey (1984; 1985a) indicates that, in general, ligules of the lower part of the culm are not vascularized or have almost imperceptible vascularization, and those of the upper part of the culm (flag leaf or the penultimate leaf) are vascularized. Chaffey (1985a) adds that the occurrence of ligules with different vascularization patterns is not always uniformly expressed among individuals of the same species, possibly due to ploidy effects. However, all cited studies about ligule vascularization were focused on species with membranous ligules. So, are there really no species in the other types with vascularized ligules? When comparing the structure of the sheath, ligule and leaf blade of 49 grass species with membranous ligules, Chaffey (1994) describes the ligule as a non-vascularized structure, a concept that was later adopted by Rudall & Buzgo (2002). Yet, when considering this definition, what would be the vascularized structures that occupy the same morphological position of the ligules? These inconsistencies lead us to think that the issue of ligule vascularization is not yet resolved, and that further studies should be carried out.

Another issue to be raised in this regard is the use of the term heteroligulate for plants that have both vascularized and non-vascularized ligules. Perhaps this term is not the most appropriate, since heteroligulate implies that there are different types/morphology of ligules and not something related to vascularization. Thus, the term “ligular dimorphism as to vascularization” is more suitable for plants that have vascularized and non-vascularized ligules in the same species.

We propose that the term heteroligulate should refer only to these two situations: (i) different types of ligule on the same leaf type (foliage leaf) or (ii) different types of ligule on different leaf types (foliage leaf or culm leaf) on the same or different individuals. In turn, we recommend that species that have only one type of ligule morphology be called homoligulate.

Therefore, we recommend that when dealing with this term, it is specified which level of heteroligulate morphology the author(s) of the study is(are) using. The same applies to the term homoligulate, which can refer to the leaf, an individual plant, a species or a genus. We will give

further details about these aspects in the section on structural variations of the ligules in Poaceae.

Other classifications based on features such as consistency, indument, color, abaxial indument, shape and margin of the ligule are less common, but are proposed by several authors (Looman, 1982; Klapp, 1987; Mitidieri, 1992; Clayton et al., 2006; Gandhi et al., 2016; Ibrahim et al., 2016). However, as for the use of these other classifications, already in 1962, Phillips points out that the criteria of shape and margin apply only to membranous ligules, but due to becoming cracked or worn in older leaves, care must be taken and, if examined, only young leaves should be used for the description. The need to examine these features on young and fresh leaves is also highlighted by Hagenbuch & Lemke (2015), since ligules tend to wither and deform over time.

1.3 History of the ligule concept in Poaceae

Since the 19th century (or perhaps before that), many authors have tried to define the ligule in grasses. In our review, we synthesize information from a range of references including philosophical essays, definitions from glossaries/dictionaries of technical terms in botany, experimental studies from morphological and/or anatomical analyses and morphological definitions found in floras and/or revisions for the Poaceae family, in addition to specific reviews on the knowledge of the ligule, stipule and other leaf base structures. We found in the literature five hypotheses (Figure 2), discussed below.

1.3.1 Ligule as an extension of the sheath

Illiger (1800) described various terminologies used in the natural sciences and reports the ligule as a leaf-like membrane that arises from the inner part of the sheath where it separates from the leaf (*“Blatthäutchen, Ligula, ein hervorftegender häutiger durchfichtiger blattähnlicher Fortsatz, der aus dem Fortiatze der innern Haut der Scheide da entstanden ift, wo die Scheide vom Blatte fich trennt”*, p. 355). In this context, leaf refers to the leaf blade. Following this thought, Voigt (1808) describes the ligule as a part of the sheath. Eaton (1828) was one of the first to mention that “lig’ula” refers to a membrane or stipule located at the top of the leaf sheath in grasses. When describing the parts of grass leaves, this author divides them into leaf blade and sheath, the latter ending in a ligule, implying that the ligule is the distal part of the sheath (*“Blätter: ungestielt, lineal- und bandförmig, nie getheilt; Scheide: meist haarig,*

endigend in ein Blatthäutchen”, p. 6). The sheath ending in a ligule was also defended by Becker (1828) and Kunth (1834).

Later, this concept was adopted by Parnell (1842), indicating the presence of the ligule at the top of the sheath (“*of upper sheath*”, p. 81 and other places in the text). Döll (1843) and Garcke (1848) suggest that the ligule emerges as an inner membrane of the sheath, a concept also adopted by Klinggräff (1848) indicating that the ligule arises from the inner part of the sheath (“*aus der innern haut der scheide hervorgegangen*”, p. 459).

Hallier & Ludwing (1866) state that the ligule is a delicate epidermal extension at the point of separation between the sheath and the leaf blade, and because it is an epidermal projection it should not be confused with stipules (“*Häufig bildet sich an der Trennungsstelle von Scheide und Spreite ein zarter, flügelartiger Fortsatz der Oberhaut, welcher mit dem besonderen Namen Blatthäutchen (ligula) bezeichnet wird und als blosses Oberhautgebilde durchaus nicht mit den Nebenblättern (stipulae) zu verwechseln ist*”, p. 49). The idea of the ligule as a projection of the epidermis is also emphasized by Dupon (1819), who describes the ligule as formed by an extension of the epidermis of the inner face of the sheath (“*formée par a prolongement de l'épiderme de la interne de la gaine face*”, p.242). For Thi-Tuyet & Cusset (1964), this proposal by Dupon characterizes the ligule as a trichome. However, when analyzing studies that describe the anatomy of the membranous ligule of other Poaceae representatives in cross section, we find the presence of a mesophyll. Since this type of tissue is not characteristic of trichomes, it is evident that membranous ligules, and possibly the ciliate-membranous type, do not present the characteristics of a trichome.

Lowe (1858), Maly (1863), Martens & Kemmler (1865), Gmelin (1867), Plues (1867), Boswell (1877), Hallier (1878), Saporta & Marion (1885) and Hackel (1887) also indicate that the ligule originates at the top of the sheath. Among these authors, Saporta and Marion argue that the ligules are extensions of the sheath, since the process of formation of the leaf blade that faces the dorsal region of the sheath (not terminal) allows the sheath to persist above the insertion of the leaf blade in a structure called “ligule”.

Sachs (1874) describes the ligule as a membranous outgrowth (“*excroissance membraneuse*”, p. 262) located on the inner face of the leaf, which develops from the sheath. Some authors cited by Thi-Tuyet & Cusset (1964) (e.g., R. Chodat and C. L. Gatin) follow this same line of thought, describing it as an emergence that develops from the sheath. Later, the definition of Sachs was revived by Fernandes (1972).

Pax (1890) defines the ventral ligule as a continuation of the leaf sheath, further highlighting that the dorsal ligules divide into scales almost to the base and that these, therefore, would morphologically have a structure similar to trichomes.

Still in the 19th century, the hypothesis that the ligule comes from the sheath was defended by several authors in the 1890s, such as: Müller (1890), Crozier (1892), Lamson-Scribner (1892), Real (1896), Hooker (1897), Ascherson & Graebner (1898), Berg & Schmidt (1899), Jackson (1900) and Belzung (1900). Real (1896), for example, says that “*the sheaths while growing often split open opposite the base of the blade and often terminate within the blade in a scarious or ciliate appendage, the ligule*” (p. 2), implying a corroboration with the previously cited authors.

In the first half of the 20th century, Wünsche (1901), Vogler (1903), Denise (1906), Gordon (1907), Francis (1912), Britton & Brown (1913), Armstrong (1917), Willey (1918), Earle (1919), Ponzo (1931) and Philipson (1935) keep following this line of thought. Among these authors, it is worth mentioning that: Britton & Brown (1913) indicate that the ligule “*is borne at the orifice of the sheath*”; Earle (1919), who although he does not directly state that the ligule arises from the top of the sheath or even that it is an extension of it, describes the ligule as one of the useful characteristics of the sheath for descriptive purposes; in the review by Ponzo (1931), the author excludes the possibility of the ligule as an axillary sheath or adnate stipule, indicating that the ligule it constitutes a vertical extension of the sheath towards the Leaf Blade, assuming an axillary position; and Philipson (1935) described the ligule as an extension of the sheath, formed from the growth of the median region and cells of the adaxial side of the epidermis. For this author, this structure is unique and has no homology with ligular structures of any other family. Kuhlmann (1948), on the other hand, describes the ligule as a membranous or papyraceous transverse layer in the inner and apical part of the sheath.

The work of Roth (1949), in turn, when discussing the history of leaf blade development, with emphasis on the stipule and ligule, states that the ligule could not be the result of a fusion of stipules, as mentioned by some authors (explained later in this text), because it originates from a uniform ventral protuberance that appears as an extension of the sheath.

Possibly, these ideas influenced the definitions proposed by other authors of the 20th and 21st century, such as: Etter (1951), Holttum (1958), Thi-Tuyet (1963), McClure (1966), Moul (1973), Dahlgren et al. (1985), Klapp (1987), Mitidieri (1992), Chapman (1996) and Judd et al. (1999, 2009). Among these authors, two should be highlighted: (i) Thi-Tuyet (1963) begins his text commenting that the ligule forms a kind of languette on the ventral portion of the leaf blade, at the junction point of the sheath and leaf blade (“*la ligule forme une sorte de languette à la*

ventrale du limbe, au point de jonction de la gaine et du limbe”, p. 204), however, after observation of the vascularization of *Oryza sativa* L., *Oryza barthii* A.Chev., *Oryza breviligulata* A.Chev. & Roehr. (syn. *Oryza barthii* A.Chev.), *Stipa juncea* L. (cited as *Stypa juncea* L. by Thi-Tuyet) and *Ammophila arenaria* (L.), the study states with some caution (because an ontogenetic analysis was not carried out) that vascularized ligules appear to be an extension of the sheath, with the bundles being continuous between them; (ii) in the first edition of Judd et al. in 1999, the authors describe the leaves of grasses as consisting of a sheath, ligule and blade, suggesting that it would be a *sui generis* organ, which remains in the third edition of this work (Judd et al. 2009). However, in the glossary accompanying the third edition, the ligule is described as a projection at the apex of a leaf sheath, therefore this concept contradicts what is suggested in the text.

In the 21st century, other authors such as Sugden (2001), Gonçalves & Lorenzi (2007), Harper et al. (2007), Grassano (2009), Pereira & Putzke (2010), Jessop et al. (2011), Munhoz et al. (2011), Verma (2011), Fontaneli et al. (2012), Ibrahim & Peterson (2014), Beentje (2016) and Ibrahim et al. (2016) state that the ligule is an extension (or projection) of the sheath. Veldkamp et al. (2019) describes it as an “*upward extension of the uppermost portion of the sheath on its inner side*” (p. 220). Finally, Melo-de-Pinna & Cruz (2020), when describing the ligules of monocotyledons, mention that such a structure is associated with the upper and abaxial side of the sheath. However, we believe that the authors may be referring to the ligule present on the adaxial side, as this confusion may have occurred due to the concept of position by Rudall & Buzgo (2002), in which the abaxial side is related to the dorsal ligule, as discussed in the previous section.

1.3.2 Ligule as a distinct region of the blade and sheath in grasses

For Linnaeus (1809), the ligule is a peculiar structure in grasses, an idea that is corroborated by Palisot de Beauvois (1812) who mentions that the leaf of grasses is composed of three distinct parts: the sheath, ligule and leaf blade; characterizing it, therefore, as a unique organ of grasses. This idea is also present by the studies of Dumortier (1823), Le Gall (1852), De Moor (1854), Remi (1861), Goebel (1898) and Stapf (1898).

Lutz (1900) and Hegi (1922), as with some of their predecessors, also describe the Poaceae leaf as being divided into three parts. On the other hand, Schmeil (1911) and Achariyar & Mudaliyar (1921) posit that the leaf of grasses is divided in two parts: sheath and blade, and between these there is a peculiar and very variable structure, called the ligule. Regardless of

whether it is described as an extra part of the grass leaf or as a structure in and of itself, the idea that the ligule is unique to grasses is also highlighted by Arber (1923), Bor (1940), Vickery (1961), Koechlin (1962), Thi-Tuyet & Cusset (1964), Yarlert (1965), Gould (1968), Leithead et al. (1971), Sauer & Chmelitschek (1976), Pohl (1980), Brakley & Hamer (1982), Vickery et al. (1986), Gibbs Russel et al. (1990), Chaffey (2000), Duistermaat (2005), Darke (2007), Sylvester & Smith (2009), Pathak et al. (2013) and Hagenbuch & Lemke (2015).

Finally, given the concepts addressed by Richardson & Hake (2019), we can include their study as also following the hypothesis that the ligule is a grass-specific structure. For these authors, during the initial stages the typical development of Poaceae leaves is specified by three regions: “*the ring-shaped meristem/organ boundaries (which go on to become the boundaries between the leaf whorls), the intra-whorl boundaries (the boundary between the sheath margins) and a within-organ boundary (the boundary between the sheath and blade where the ligule and auricle form)*” (p. 6).

Nelson & Moore (2020) emphasize that in grasses, the phytomer is composed of a leaf, internode, node and axillary bud, of which the leaf comprises three parts: (i) leaf blade, (ii) ligule (and collar), and (iii) sheath. The plastochron is the time interval between the development of sequential primordia in the meristematic region, while the phyllochron is the time interval between sequential leaves, generally determined by the appearance of the ligule (and the collar). As the plastochron is shorter than the phyllochron there is a gradual accumulation of primordia associated with the stem apex. According to these authors, this fact is important especially in periods of drought because the accumulated primordia can elongate to form the leaves and assist in the plant’s recovery.

Despite many gaps between studies that defend this point of view and those with numerous later definitions (Figure 2), this hypothesis spans more than 210 years after Linnaeus's initial proposition. The question of whether it is a grass-specific organ can cause a certain amount of conflict since, as previously mentioned, a ligule-like structure at the leaf base may occur in other groups of monocotyledons.

1.3.3 Ligule as a stipule (or type of stipule)

The concept of the ligule as a type of stipule was used by Bischoff (1834) and Regel (1843). Jussieu (1842) and Baillon (1882) compare ligule to stipule, the latter of which describes it as compared to the stipule (“*on l’a quelquefois comparé à la stipule*”, p. 108). Jessen (1863) suggests that the ligule and sheath would correspond to stipules. Kützing (1851)

and Moyen (1871), although not directly stating that the ligule is a type of stipule, include the definition of the term within the stipule section in their books. In Duchatre (1868), the definition of the ligule can be found right after the author's comments on stipular metamorphosis, which leads one to believe that the ligule is a type of stipule that has undergone metamorphosis. Durieau de Maisonneuve (1859), when examining *Carex* (Cyperaceae), states that the ligule present in Cyperaceae has the same structure as grass ligules, considered to be an axillary stipule (synonym of intrapeciolar stipule) that occurs at the top of the sheath. Saint Pierre (1870) describes it as an intrapeciolar stipule that manifests itself at the base of the leaf blade [“*La ligule des Graminées est, pour moi, une stipule intrapéliolaire qui ne se manifeste qu'au niveau de l'extrémité delà gaine (on pétiole engainant), c'est-à-dire à la base du limbe*”, p. 1249].

Youmans (1873) defines the ligule as a scale-like stipule, while Le Maout and Decaisne (1876) describe it as an auxiliary stipule located between the sheath and the leaf blade. Colomb (1887) points out that the ligule is divided into three regions: (i) a lateral region, in which marginal bundles of the sheath are inserted; (ii) a stipular region, which has bundles that divide, some innervating the ligule and others the leaf blade; and (iii) an axillary region, which is parenchymatous and joins the two stipular regions. If the ligule has all three regions it is called an axillary ligule, if it has only the stipular and axillary regions, it is an axillary stipule, and if it has only the axillary region then it is a stipule. The presence of three regions, one of them with bundles exclusively from the sheath, caused Thi-Tuyet & Cusset (1964) to interpret Colomb as arguing that the ligules were an extension of the sheath, which is a mistake. For Colomb the stipules and the ligules are organs of the same nature, the stipule being a portion of the axillary ligule (“*les stipules et la ligule sont donc des organes de même nature, [...] la stipule étant une portion de ligule axillaire*”, p. 75-76).

Vasey (1889), on the other hand, although he states that the grass leaf has three regions, in which the ligule would be distinct from the sheath and blade, also argues that the ligule is a stipule. Lubbock (1890; 1895) reports ligules as grass stipules as well as ligule-like structures in other monocotyledons, but states that the stipules of monocotyledons differ from those found in dicotyledons. For Karsten (1895) the sheath is often accompanied by an upward-facing stipule (“*an ihrer grenze mit der schmalen blattfläche bildet die scheide einen abgerundeten oder zweiöhrigen schwielenrand, und ist hier oft mit einem nach oben gerichteten, dünnhäutigen, nebenblattf, aber meist nervenlosen, ausgen*”, p.363), indicating that the ligule would be similar to a stipule. These authors do not specify whether the stipule type is adnate or axillary.

During the late 19th and early 20th centuries, some authors also converge on the thought that the ligule is a stipule, as for example Tyler (1897), when describing stipule formation, mentions that there are three forms of development: “*that in which the several portions of the primitive leaf have developed together into a simple unappendaged blade, that in which a sheathing petiole is formed with or without a ligule or ochrea, and that in which stipules properly so-called are present*” (p. 29). Čelakovský (1897) considers the ligule as adnate stipules; and Thomé (1903) mentions that grass ligules can be interpreted as a stipule (“*Auch das Blatthäutchen der Gräser [...] ist als Nebenblatt aufgefasst worden*”, p. 11).

Ascherson & Graebner (1907), when describing the ligules of Potamogetonaceae, extrapolate their theory to the other monocotyledons, changing the initial idea proposed by the same authors in a previous work (Ascherson & Graebner, 1898). In this study from the beginning of the 20th century, they mention that in *Potamogeton* the stipules can be lateral, adnate or axillary, and in the latter two cases, these are called ligules. In phylogenetic terms the lateral stipules would be older, followed by the derived ligular types of adnate and axillary stipules.

Sinnott & Bailey (1914), studying nodal anatomy with a focus on the morphology of dicotyledonous stipules, comment on grass ligules, highlighting the complexity of this structure in Poaceae and other monocotyledons. In this study, they discuss the stipule as an integral part of the leaf base, and assert that the leaf base structures present in monocotyledons (e.g., ligules, sheaths, *Smilax* tendrils and Potamogetonaceae “stipules”) differ from the stipules found in dicotyledons due to position and the anatomical characteristics of the node, but they are all homologous to each other. Given that the authors do not describe the development of the structures and consider only that the morphological pattern of the two structures is identical, it is accepted that the level of homology to which the authors refer to is primary homology. We infer that the study implies that the ligule can be considered a type of stipule.

The idea of the grass ligule as adnate stipules was again defended by Domin (1911) and Worsdell (1916), while Arber (1925) defines the ligules as axillary stipules. Since for Eames (1961) a ligule is a stipule, he states that the term stipule should be used in place of ligule, although the term ligule has already been established. The stipulate nature of the ligule, recapitulating the concepts of A. Aber and W.G. Wordesel, was also defended by Font Quer (1965), Schultz (1973) and Vidal & Vidal (1992), the first of which also mentioned that, in some cases, these are adnate stipules and in others axillary stipules.

On the other hand, Philipson (1935) does not accept the stipulate nature of the ligule since its position (between the sheath and the leaf blade) is not consistent with being a stipule. If it

were a stipule, or derived from fused stipules, the ligule should be at the base of the sheath and not at the apex. Philipson (1935), as indicated in the previous section, states that the ligule is an extension of the sheath. It is worth mentioning that stipules are determined very early in the process of leaf development, separating from the flanks of leaf beginnings possibly after the determination of the proximal-distal axis (Townsend & Sinha, 2012). Thus, in order to be considered a stipule, the ligule must have a leaf primordium, which was not clearly demonstrated in the aforementioned studies.

1.3.4 Ligule as an extension of the leaf blade base

According to Mertens & Koch (1823), the ligule is located internally at the base of the leaf and at the edge of the sheath (*“welches inwendig an der Basis des Blattes und am Rande der Scheide steht”*, p.13). Wimmer (1857) and Schmidt (1857), on the other hand, indicate that the ligule arises at the base of the leaf blade surface. Lindley and Moore (1866), following this idea, describe it as a membranous structure that occurs at the base of the blade in grasses. Such ideas may have influenced Körnicke & Werner (1885), Van Thiegem (1891), Beal (1896), Buchenau (1919), Dayton (1931), Pohl (1954), Thi-Tuyet (1963), Sergievskaya (1969), Oxford (1996), Bradley & Fishel (2010), Zanotti et al. (2012), Souza et al. (2013), Gandhi et al. (2016), Pantoja (2016) and Peterson et al. (2020), who all also defend this point of view, noting that the ligule, as an extension of the base of the leaf blade, is common in many monocotyledons, especially grasses.

1.3.5 Ligule as formed by the fusion of different structures

Kunth (1833) argues that the ligule is a structure with a mixed identity, whose upper part is formed by the stipule connate to the petiole at the bottom. Hausmann (1832) proposes that ligules are formed by stipules, located at the base of the leaf blade and at the apex of the sheath (*“welches aus der spitze der zwischen dem blaststiel befindlichen, mit der innern oberfläche der scheide verwachsenen nebenblätter gebildet ist”*, p. 953). Saint-Hilaire (1841) considers the ligule to be a fusion between the sheath and free axillary stipules at the apex, excluding the hypothesis that it would be derived from the fusion of two lateral stipules. A new type of mixed definition was proposed by Majumdar (1956), who describes it as a structure composed of stipules and the leaf sheath margin.

1.3.6 Considerations on the historical aspects of the ligule concept

Of the five hypotheses that attempt to define the ligule in Poaceae (Figure 2), those with the most citations are: (i) sheath extension, with 68 citations, (ii) specific region of the grass leaf, with 33 citations, and (iii) stipule (or type of stipule), with 28 citations. Many of the analyzed studies are books on systematics, morphology, glossaries or educational texts regarding Poaceae (69 citations), or floras and taxonomic studies in Poaceae (59 citations). We note, therefore, that all the main ligule definitions were initially proposed in the 18th and 19th centuries and in textbooks (plant taxonomy or morphology), without a thorough study to understand the origin of the structure. Although some definitions have fallen into disuse, even in the 20th and 21st century many of these hypotheses continue to be cited without proper attention to understanding the concept of the ligule (Figure 2).

Few studies with an anatomical focus or specific reviews try to understand leaf base structures (22 citations), as summarized in Figure 2. Among the studies with this focus, ten mention that the ligule is a stipule (or type of stipule). However, the most recent experimental work that defends this point of view is Worsdell (1916), although this is the third most cited hypothesis that was defended by only a few authors from the second half of the 20th century on. In the last 50 years, only the works of Chaffey (2000), Sylvester & Smith (2009), Richardson & Hake (2019) and Nelson & Moore (2020) argue that the ligules are a peculiar structure of grasses (*sui generis* organ), and the review by Melo-de-Pinna & Cruz (2020), which cites ligules as an extension of the leaf sheath, can be included in this category. It is worth noting that these two hypotheses are not mutually exclusive.

Another point that should be highlighted is that all these definitions take membranous ligules as the main example, with scarce comment on the other types. This record shows that the definition of the term ligule has been, and continues to be, the subject of discussion by several researchers over more than 200 years, so that there are several concepts in use in botanical terminology regarding this structure in Poaceae.

Although recent molecular biology studies highlight the role of having certain genes in the ligule formation process (Becraft et al., 1990; Foster & Timmermans, 2009; Townsley & Sinha, 2012; Lewis et al., 2014; Richardson & Hake, 2019) and some ontogenetic work (Thi-Tuyet, 1967; Sylvester et al., 1990) has already been performed, given the morphological variety of ligules, the existing studies are still incipient to refute or not some of the hypotheses raised in this work. Thus, the ontogenetic development of ligules in Poaceae is still open for investigation, from a structural point of view, and it is necessary to initially verify whether the

different ligule morphologies are homologous, to later Verify which of the concepts presented would be more appropriate.

1.4 Study of the structural variation of ligules in Poaceae

To verify the distribution of different types of ligule in the Poaceae, we used the data available in Grassbase (Clayton et al., 2006) and the DELTA interactive key (<http://delta-intkey.com/>) provided by Dallwitz et al. (2000). These databases were used because they are the main references in the description of species of the family and there are data regarding the types of ligule for almost all species. The validity of each species name was also verified in the World Checklist of Selected Plant Families (<https://wcsp.science.kew.org/home.do> - WCSP, 2020). We scored 769 genera and 12,120 species, recording the four morphological types of ligules recognized in the literature: EM, CiM, CM and FH. In some species the ligule may be absent or there are no data recorded in the databases.

According to Clayton et al. (2006), the vegetative characteristics of Poaceae can be divided into habit, underground structures, culm and leaf structures. Leaf structures can be divided into three types/groups: culm leaf, foliage leaf (bamboo branch leaf or chlorophyll-bearing), both with a sheath and laminar portion (McClure, 1966; Clayton et al., 2006), and rhizome leaf that has a sheath only (McClure, 1966; Wang, 2017). In the aerial portion of the plant, when only one type of leaf appears in the species, they are simply called leaves (or less commonly, foliage leaf), consisting of leaf sheath and leaf blade. When more than one type of leaf appears in the species, there are culm leaves, consisting of a culm leaf sheath and culm leaf blade; and foliage leaves formed by a leaf sheath and leaf blade. Foliage leaves are photosynthetic, while culm leaves are often deciduous or they dry out, even though they may be photosynthetic when young.

The analyses that follow are based on the data referring to the variation of the ligule in the foliage leaf and the culm leaf. It is important to highlight that when dealing with heteroligulate or homoligulate leaves, we are referring to the same type of leaf (foliage leaf or culm leaf).

1.4.1 Structural analysis of ventral ligules present in foliage leaves

The data show that in 6,665 (54.99% of the total) of the listed species an eciliate membranous ligule is present; 2,424 (20.0%) have a membranous-ciliate ligule (1,806 have a

ciliolate membranous ligule and 618 have a ciliate membranous ligule); 2,514 (20.74%) have a ciliate ligule; and only 158 (1.30%) do not exhibit the ligule. In the databases consulted there are no data on 574 (4.74%) species, due to the lack of updates of the morphological descriptions, especially GrassBase, in relation to the descriptions of new species mentioned in the WCSP (Table 1).

For the data presented, we note that the sum of the percentages slightly exceeds 100%, because 11,368 (93.80%) of the species are homoligulate, with emphasis on the EM and FH types, which are the most common ones. In our view, the absent ligule should not be categorized as heteroligulate, because when the ligule appears it can only be of one type. The heteroligulate condition occurs in 176 (1.45%) of the species, and in this group the EM + CiM category stands out with 121 representatives (about 1.00% of the species of the family). The presence of heteroligulate individuals may have occurred due to synonymizations of different species (with different types of ligules), which could be different varieties or subspecies of the same species, or even cryptospecies. Another point to be highlighted is that there are no species of a monospecific genus that are heteroligulate. Just as in homoligulate species, there are certain heteroligulate species whose ligule may be absent in some leaves and/or individuals (due to questions of synonymization of names). The distribution of the ligule types in the homoligulate and heteroligulate groups is shown in Table 1.

The absence of the ventral ligule caught the attention of Thi-Tuyet (1968), while studying the anatomy of the ligular region of four species of *Echinochloa*, of which two have absent ligules [*E. crus-galli* (L.) P.Beauv. and *E. lelievrei* (A.Chev.) Berhaut syn. *Echinochloa stagnina* (Retz.) P.Beauv.]. He noted that in species with and without a ligule show homology in the early stages of development in the region between the sheath and the limbus. Nevertheless, in subsequent development in species with a ligule there is trichome formation, and in species without ligules there is no trichome formation. Given the existence of a ligular base occurring through epidermal and subepidermal divisions but without a ligule visible at the morphological level, Thi-Tuyet (1968) names this ligular type the latent ligule. If this is extrapolated to the family level, this could be interpreted as a great reduction of the ligule rather than its complete absence. The study of the evolution of the ligule in Poaceae will be discussed in the next section.

Regarding the distribution of ligule types in genera, to facilitate understanding, we decided to separate genera on the following scale: very large (over 200 spp.), large (101-200 spp.), medium (51-100 spp.), small (11-50 spp.) and very small (1 to 10 spp.). The generic size

distribution associated with the variation of ligule morphology within different genera is shown in Table 2.

Gibson (2009) reports that the type of ligule is usually uniform within a genus, which is confirmed in the present study, where 73.21% of the genera have only one type of ligule. Although it is common for more than one morphology of ligule to be present in the same genus, one of the types tends to be predominant; that is, more than 75% of the species have the same type of ligule. Among very large genera, only one (*Agrostis*) has uniform ligules with an EM type ligule. *Calamagrostis*, *Digitaria*, *Elymus*, *Paspalum* and *Poa* are predominantly of the EM type; and *Aristida*, *Eragrostis* and *Sporobolus* are predominantly of the FH type. In very large genera, only *Festuca*, *Panicum* and *Stipa* do not have a predominant type of ligule (Table 2).

In the category of large genera, *Bromus* and *Puccinellia* have only the EM type of ligule. Six large genera have a predominance of ligule type: *Bambusa*, *Chusquea*, *Muhlenbergia* and *Nassella* (all EM) and *Cenchrus* and *Isachne* (both FH). Only two genera (*Andropogon* and *Setaria*) do not have a predominant ligule type (Table 2).

The medium-sized *Pentameris*, *Rytidosperma* and *Stipagrostis* have the FH ligule type. Genera with a predominant ligule type include *Anthoxanthum*, *Cymbopogon*, *Dendrocalamus*, *Deyeuxia*, *Fargesia*, *Hyparrhenia*, *Ischaemum*, *Koeleria*, *Leymus*, *Melica*, *Trisetum* and *Yushania* (EM), *Merostachys* (CiM), and *Triodia* and *Urochloa* (FH) (Table 2).

As for the small genera 33 have only one type of ligule (19 of the EM type, one – *Tripsacum* – of the CiM type and 13 of the FH type); and 41 have some predominant morphology (30 of the EM type; 6 of the CiM type; one – *Hemarthria* – of the CM type; and 4 – *Brachiaria*, *Coelachne*, *Eriochloa* and *Tridens* – of the FH type) (Table 2).

Of the 459 very small genera with only one type of ligule, 245 are monospecific, and of the remainder, 107 have the EM type, 23 with the CiM type, 8 with the CM type and 58 with the FH type. In the groups with a predominant morphology there are 15 genera with the EM type, 10 genera with the CiM type, one (*Oplismenus*) with the CM type ligule, and seven (*Alloteropsis*, *Astrebla*, *Geochloa*, *Jouvea*, *Kellochloa*, *Oncorachis*, *Tragus*, *Uniola*, *Willkommia* and *Zoysia*) with the FH type ligule. It is also worth mentioning that in 10 very small genera (*Didymogonyx*, *Ekmanochloa*, *Glaziophyton*, *Hubbardia*, *Mniochloa*, *Neostapfia*, *Orcuttia*, *Piresiella*, *Steyermarkochloa* and *Tuctoria*) the ligule is absent, and in four genera (*Festucopsis*, *Parafestuca*, *Peridictyon* and *Yersinochloa*), all of which are monospecific, there is no information on the type of ligule (Table 2).

We observe that it is common for very small genera to have only one type of ligule morphology (79.27% of the genera in these categories), and in the other size categories, the

presence of more than one type of ligular morphology is frequent, with some genera with a predominant ligule type. Genera with this profile are rarer than genera that have only one type of ligule; this is due to the large number of genera with only one type of ligule in the "very small" category (see Table 2).

We found that in 53 genera there is great variation in the ventral ligule, which exhibits four or five character states for the morphology of the ligule (Table 3). Such genera are distributed mainly in the Panicoideae (27 genera), Chloridoideae (9 genera) and Bambusoideae (7 genera), which are the subfamilies that have the most genera. In Pooideae, although it is the largest subfamily of Poaceae, the genera show little variation in the ligule; homoligulate genera or genera with a strong predominance of one ligule type are common, except for *Deschampsia*, *Festuca*, and *Oryzopsis*.

These data reinforce the taxonomic value of the ligule, which helps to identify genera, as is the case with genera that have only one morphological type, or even to identify species, especially in genera with more than one morphological type. We also observed that Panicoideae is the subfamily with genera encompassing the greatest variation of ligule types, which may serve as a model to study the variation of this character within the family, in addition to reinforcing the ligule as taxonomically significant for the subfamily (Table 3).

Webster (1992), analyzing 102 genera of Paniceae (Panicoideae), identified 39 distinctive features that determine generic classification in this tribe, of which 36 characteristics related to the reproductive part (inflorescence, flowers, glumes, rachillae etc.) and three related to general aspects of the plant: (i) plant sexuality (hermaphroditic, dioecious, etc.), (ii) culm branching pattern and (iii) ligule. Due to the morphological variation of the ligule in the tribe, the author also emphasizes that this character is essential for the identification of 50% of the studied genera, appearing as one of the few vegetative characteristics used as distinctive in Paniceae.

When considering the distribution of the types of ligules in the subfamilies (Figure 3), we observed that, in general, more than one type of ligule occurs in the grass subfamilies, confirming data presented by Watson & Dallwitz (1992) and Longhi-Wagner et al. (2001). However, the data presented in this study show that in Anomochlooideae, the sister subfamily of the other Poaceae (Soreng, 2015; 2017; Saarela et al., 2018) and the smallest subfamily (with only four species), and Danthonioideae (with 289 species and belonging to the PACMAD clade), only ciliate ligules are recorded.

We noticed that, unlike Anomochlooideae, the ciliate ligule does not appear in Pharoideae and Puelioideae (the other two early-diverging lineages). Pharoideae is the only

subfamily in which there is a predominance of ligules of the CiM type, present in 58.33% of their representatives.

The BOP clade includes taxa with predominantly EM ligules, and in all three subfamilies this character state occurs in more than 50% of their representatives. In Pooideae (largest subfamily of Poaceae) and Oryzoideae, this feature exceeds 75% of their representatives.

In the PACMAD clade, the FH type ligule is the predominant type, especially in the Micrairoideae, Aristidoideae and Danthonioideae. In this clade, Panicoideae and Arundinoideae are the subfamilies with the highest percentage of species with a membranous-ciliate ligule. Panicoideae and Chloridoideae are those with the highest percentage of species with a membranous ligule and with the greatest variation between different types of ligule, reinforcing the data presented in Table 3.

Although these data should be interpreted with caution, because the difference in richness among the subfamilies is quite large; the data presented corroborate Kellogg (2015), who indicates that the ventral membranous ligules predominate among members of the BOP clade (Bambusoideae, Oryzoideae and Pooideae), while those that are ciliate predominate in all subfamilies of the PACMAD clade. However, the mentioned study does not demonstrate which types of ligules occur in groups that do not belong to these clades (Anomochlooideae, Pharoideae and Puelioideae), does not quantify the frequency of ligule types in the subfamilies and does not comment on the membranous-ciliate type. As for membranous-ciliate ligules, from data available in the literature, it was observed that CiM type ligules occur more frequently than CM ligules, except in the Micrairoideae.

Panicoideae has the largest number of species with an absent ligule (73); however, due to its high number of species, this character state represents only 2.08% of the species in this subfamily. Thus, in percentage terms, Puelioideae and Micrairoideae are the subfamilies that have the greatest proportion of representatives without ligules (Figure 3). This occurs because these subfamilies have few representatives; the first has 11 species and only one without a ligule (*Puelia schumanniana* Pilg.), and the second has 183 species, 15 of which do not have ligules.

The subfamilies with the largest number of species with missing data are Bambusoideae, Pooideae and Panicoideae, which are the most diverse subfamilies. Yet, in proportion to the total number of representatives, the subfamilies with the most missing data are Bambusoideae, Micrairoideae and Pooideae. Even with these missing data, little would change in the variation profile of the ligule types in the subfamilies, but this reinforces the need to know more about the vegetative morphology of Poaceae, especially the ligules.

1.4.2 Structural analysis of the dorsal ligules present in foliage leaves

According to GrassBase (Clayton et al., 2006), the presence of dorsal ligules is recorded in 577 species of Poaceae. Such species are distributed in five subfamilies: Puelioideae (five species of *Puelia*), Pooideae [*Barkworthia stillmanii* (Bol.) Romasch., PM Peterson & Soreng, *Poa acicularifolia* Buchanan and *Poa maniototo* Petrie], Panicoideae [*Andropogon gayanus* Kunth, *Baptorhachis foliacea* (Clayton) Clayton, *Gynerium sagittatum* (Aubl.) P.Beauv. and *Ocellochloa rudis* (Nees) Zuloaga & Morrone], Chloridoideae (*Enteropogon minutus* Lazarides) and Bambusoideae (564 species / 32.17% of the representatives of this subfamily). Kellogg (2015) indicates that the dorsal ligule is present in practically all woody bamboos, which would explain why this character is marked in Bambusoideae.

Dorsal ligules have an important taxonomic value especially in Puelioideae, which can be used to separate the genera *Guaduella* (which dorsal ligules are absent) and *Puelia*, and in Bambusoideae, the group that has the largest number of species with dorsal ligule, which can be used to separate genera and/or species. However, in the GrassBase database, only presence or absence of this feature is recorded, with no mention of the type. In Ponzo's review (1931), he highlights the dorsal ligules of Bambuseae, indicating that they are part of the extensions of the abaxial cells of the sheath, and that they have an identical value to the ventral ligules. This occurs because the collar, which surrounds the base of the pseudopetiole, ends and joins the two marginal ends of the ligule. Nevertheless, the origin of the dorsal and ventral ligule could be different. In fact, is the origin of the dorsal ligule similar to the origin of the ventral ligule or not?

1.4.3 Structural analysis of the ligules present in culm leaves

We note that only 1,447 (11.76%) species of Poaceae have records of culm ligules. The low percentage shown is justified by two points: (i) there are relatively few species that have culm leaves; (ii) not all species that have culm leaves have descriptions of the ligule morphology. Of the species with these descriptions, 551 are homoligulate, mainly of the EM type, 21 have a ligule but without specifying the type and 855 are heteroligulate, mainly of the EM + CiM + CM type (Table 4). According to the researched databases, there were no species with ciliate ligules in the culm leaves.

Considering the distribution of ligule types in the subfamilies (Figure 4), we observed that culm leaves and thus their ligules are present in only four subfamilies, occurring in all 11

species of Puelioideae and 1,430 species of Bambusoideae, representing 81.53% of the species of this subfamily. In addition, ligule in culm leaves occurs in three species of Pooideae (*Poa cuspidata* Nutt., *Poa pringlei* Scribn. and *Poa siphonoglossa* Hack.) and two species of Panicoideae [*Gilglochloa indurata* Pilg. and *Steyermarkochloa angustifolia* (Spreng.) Judz.].

In Bambusoideae, the subfamily with the largest number of representatives with culm leaves, the membranous ligule type was the most common (we consider membranous ligules those whose apices are whole, toothed, lacerate or fimbriate as indicated by Gandhi et al. 2016), occurring in 1,128 species (64.38%) of this subfamily.

Finally, it is worth noting that all studies of the ligule, whether from the morphological and/or anatomical point of view, refer to the ligules present in foliage leaves. The lack of information regarding culm leaves shows that more studies about the morphology and anatomy of this leaf type are needed. The data presented here can serve as a basis for future studies of this nature. In this regard, the lack of investigation of culm leaf ligules impedes our understanding of the evolutionary patterns in these two subfamilies.

1.5 Distribution of ligule types in Poaceae phylogeny

To verify ligule evolution in the Poaceae phylogeny, we used data from Saarela et al. (2018). This study was selected because it is the most recent phylogeny for the family, is based on plastome data, and contains a great diversity of representatives (250 species) from all grass subfamilies. The names present in the trees were adjusted according to their validity in the World Checklist of Selected Plants Families (<https://wmsp.science.kew.org/home.do> - WCSP, 2020).

Phylogeny reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) method at the RAxML version 8.2.10 software (Stamatakis, 2014). We used the aligned matrix X from Saarela et al. (2018), with a total length of 78,714 sites, containing the complete plastome for the representatives included, with gapped sites stripped and not removing positively selected sites. For the reconstruction, we selected the GTR+G+I evolution model and employed 1000 bootstrap replicates for assessment of clade support. The resulting tree was then compared to the Figures presented by Saarela et al. (2018) to ascertain the results and then underwent a reconstruction of ancestral character states with seven morphological types (Table 5), according to the GrassBase data (Clayton et al., 2006), gathered for section IV of this study. The reconstruction of ancestral characters was performed using the Mesquite v.3.2 software (Maddison & Maddison, 2009) using the Maximum Likelihood (ML) method, with all states

treated as unordered and adopting the Markov k-state 1 parameter model (Mk1). The table containing the morphological data used for the 250 sampled species can be found in Supplementary File 1.

1.5.1 Evolution of ventral and dorsal ligules present in foliage leaves

Regarding ventral ligules (Figures 5-7), it was inferred that the common ancestor of all Poaceae most likely has homoligulate and ciliate ligules (FH), as observed in Anomochlooideae. Other morphological types did not have a single origin within the family, being, therefore, a result of parallel evolution or reversals. The first inferred change was in the CiM (ciliolate membrane) character, at the ancestor of the clade Pharoideae + (Puelioideae + (BOP + PACMAD)). Within Pharoideae, it was inferred that the membranous ligules of *Pharus latifolius* represent a parallelism in relation to those observed in the ancestor of the BOP + PACMAD clade (see below).

Puelia olyrififormis has a membranous-ciliate ligule and is the only representative of Puelioideae present in the phylogeny. Although this kind of ligule is not the predominant one in the subfamily (Figure 3), it is possible that the membranous type is a derived state within the group.

It was inferred that the ancestor of the BOP clade most likely has membranous homoligulate ligules (Figure 5), representing a character state change in this clade (CiM > EM), which is preserved among the ancestors of the three subfamilies of this clade. Within Oryzoideae, CiM type ligules were inferred as independent and parallel reversals in Ehrharteae (*Microlaena stipoides*) and Phyllorachideae (*Humbertochloa bambusiuscula*); in Oryzeae-Zizaniinae we observed a change from the homoligulate to the heteroligulate kind in *Chikusichloa aquatica*, with the co-occurrence of both CiM and CM ligules being uncommon in the tribe, which predominantly displays only exclusively membranous ligules (homoligulate).

A similar scenario was inferred for Bambusoideae, with EM > CiM reversions recovered in several occasional and not closely related cases within all tribes (e.g., *Hsuehochloa calcarea*, *Pleioblastus maculatus*, *Buergersiochloa bambusoides* and *Olmeca reflexa*). A notable clade within Arundinarieae, however, is the one composed of the genera *Bashania*, *Fargesia* and *Phyllostachys*. In this clade, the reversion to the CiM kind is conserved in most of the taxa, with later transitions from CiM to the CM type within *Phyllostachys* (*P. aurea* and *P. sulphurea*) and a reversion of the CiM to the MS type in *Fargesia* (*F. nitida*). In this scenario,

it is possible that a gradual change occurred in this group from membranous to ciliate membranous ligules bearing short cilia, and later presenting long cilia, with occasional reversals to membranous ligules, as inferred in *Fargesia nitida*. And similar to Oryzoideae, the heteroligulate type seldom occurs, in the Bambuseae-Bambusinae (*Bambusa emeiensis*). In Pooideae (Figure 6), reversions to a CiM type ligule (*Diarrhena obovata*) or their absence (*Agrostis gigantea*) are rare, as it is expected since 89.1% of the species have a membranous trait and no change from homoligulate to heteroligulate ligules was inferred.

Unlike the BOP clade, the ancestor of PACMAD clade most likely has homoligulate ciliate ligules with several reversals occurring within the different subfamilies and tribes. Panicoideae shows major evolutionary changes in this character, as expected since it exhibits great heterogeneity, as seen in Figure 3. It also differs from other subfamilies in that it is inferred membranous ligules as most likely ancestral state in some tribes or subtribes represented in the phylogeny (e.g. Thysanolaeneae, Centotheceae, Andropogoneae and Otachyriinae and Paspalinae in Paspaleae); however, Paniceae differs from the other tribes in that it has reversals to CiM type ligules (Panicinae) or they are absent (*Echinochloa* - Boivinellinae). In addition, it is the only tribe with representatives bearing the CM type ligule, which may be heteroligulate in *Megathyrus maximus* (CM and CiM) and *Alloteropsis semialata* (CM and FH) as a reversal of ciliate ligules, or in a homoligulate form as a reversal of CiM (*Panicum capillare*) or FH type ligules (*Oplismenus hirtellus*). It is worth noting that *Panicum* was recovered as polyphyletic in the study by Saarela et al. (2018).

For the other subfamilies of the PACMAD clade, the ciliate ligule was inferred as the most likely ancestral state and the other types as derived, with emphasis on the subtribe Eleusininae (Cynodonteae - Chloridoideae), in which a change to CiM type ligules is inferred and, therefore, FH type ligules in *Leptochloa pluriflora* represent a reversal within the subtribe.

We created diagrams to understand how transitions between different character states occur in Poaceae (Figure 8A), and, more specifically, in the BOP and PACMAD clades (Figures 8B-C), from 60 nodes of the tree (Figures 5-7) that changed in character state either at the level of subfamilies and/or on the level of tribe and genus.

Observing the diagram for all Poaceae (Figure 8A), we can still see that several types of transitions are common; however, no changes from the membranous-ciliate states (CiM or CM) to the absent type are observed. This could mean that the absent type may be a reduction of the ciliate state, which gradually lost the trichomes and has no apparent ligule or, in a membranous type (e.g. EM > Absent of *Agrostis gigantea*), that the signal for ligule formation was lost. Both the various transitions and the transitions of EM > Absent and FH > Absent reinforce the

fact that there is no linearity between changes in character states. We also understand that there are few or no transitions whose ancestor are the CM or absent states (except for the CM > CiM transition in *Hakonechloa macra*), which would indicate that these character states are derived and more recent in the family and which would also explain their low representation in Poaceae (Figure 3).

Some authors suggest that ciliate ligules are the result of the evolutionary reduction of membranous ligules in the group, and that, therefore, membranous-ciliate ligules would be an intermediate stage between the two (Metcalf, 1960; Gould, 1968; Hubbard, 1992; Chaffey, 2000). However, as a basis for the reconstruction of the ancestral character state and in the character transition diagrams, we observed that membranous ligules are a reduction of the ciliate trait occurring predominantly in the BOP clade and in certain Panicoideae tribes. That is, although the ancestral grass possibly had a ciliate ligule, this character state was modified to a membranous ligule, with reversions to the ciliate state occurring several times, especially in the PACMAD clade; in the BOP clade the membranous state is predominant, and reversals occur to the membranous-ciliate type. In Poaceae, unlike what occurs in other monocotyledonous families, the characteristic of a missing ligule is derived, which can occur in practically all subfamilies, originating from membranous ligules in the BOP clade and ciliate ligules in the PACMAD clade.

Finally, the Poaceae ancestor does not have dorsal ligules (Figure 9), with this characteristic arising independently in Puelioideae and within Arundinarieae and Bambuseae (Bambusoideae), with emphasis on the multiple instances within Bambuseae, and multiple reversal events also being inferred for the absence of dorsal ligules within Bambusoideae.

1.5.2 Evolution of ventral ligules in culm leaves

As seen in section IV, culm leaves are characteristic of Puelioideae and Bambusoideae, although they can occasionally occur in other subfamilies. The ancestor of Poaceae most likely had no culm leaves and this characteristic possibly appeared at least four times during the evolution of the family.

In the reconstruction of the ancestral character of the ligules present in culm leaves (Figure 9), we observed that in Puelioideae this characteristic presents itself as heteroligulate with EM, CiM and CM ligules. The ancestor of Bambusoideae most likely also presented culm ligules, occurring a reversion in Olyreae, where this trait is absent. The ancestor of Arundinarieae and Bambuseae is inferred as homoligulate with reversion to heteroligulate in

some clades (e.g. Bambusinae, Guaduinae, some Chusqueinae, and Arundinarieae) or even with the ligule absent in Bambuseae (Greslaninae and some Chusqueinae). CM type ligules are more common in culm leaves than in foliage leaves, commonly occurring in heteroligulate or in a homoligulate form in certain Arundinarieae clade.

1.6 Conclusion

The ligule, which can occur in the ventral or dorsal portion of the leaves (foliage leaves) or in the culm leaves, is a structure of the leaf base with important taxonomic value for the description of tribes, genera, species and/or varieties in Poaceae. It has four types of morphology well described in the literature: eciliate membrane (EM); ciliolate membrane (CiM); ciliate membrane (CM); and a fringe of hairs (FH), however, the CiM and CM types are now described as membranous-ciliate types. In addition, a number of other morphological characteristics (e.g., consistency, color, abaxial indument, apex incision and shape of apex) are used to distinguish species.

The discussion about the definition of the ligule dates back to the end of the 18th century and the beginning of the 19th century (e.g., Illiger, Linnaeus, Mertens and Koch, Kunth and Bischoff). The earliest hypotheses regard the ligules as an extension of the leaf sheath or an organ specific to the grass leaf. Over the centuries these are still the most defended hypotheses even by experimental studies and/or reviews on structures of the leaf base published as recently as 2019 and 2020. However, there is still discussion about the best definition of what the ligule is, with more studies needed in this regard, especially focusing on the development of the structure in different groups and with different morphologies, since ligule studies to date mainly focus on membranous ligules.

We observed that the type/structure of the ventral ligule in foliage leaves appears well documented in databases; however, there are gaps in several classifications regarding ligule morphology. Due to the variety of species and the importance of Poaceae, it is paramount to keep an updated and complete database with morphological descriptions. This continued renewal of GrassBase data and the concern of researchers to include this information in their research may generate new evolutionary interpretations of the ligule character in the future. Among the aspects that should be observed more closely are: (i) the presence of membranous ligules in *Didymogonyx* (although described as absent in GrassBase it has membranous ligules 0.1-0.4 mm long), (ii) the presence of culm leaves in Puelioideae, (iii) the presence of culm leaves in specific groups such as Olyreae-Bambusoideae (especially *Olyra latifolia* and

Taquara micrantha), *Lasiacis* - Panicoideae and *Muhlenbergia dumosa* - Chloridoideae, and (iv) the presence of ligules in culm leaves in of *Streptogyna americana* (Oryzoideae), which field observations show have the structure but which are not described in the database.

Our data indicate that EM ligules are the most common, especially in the BOP clade, with FH ligules more common in Anomochlooideae and in the PACMAD clade. In Pharoideae, the CiM type ligule is more common, and in the family as a whole, CM type ligules are rarer and occur only in 621 species. Dorsal ligules in foliage leaves and ventral culm leaf ligules are more common in Puelioideae and Bambusoideae, but may occur in some other subfamilies in an isolated manner.

With regard to the foliage leaves, the ancestor of Poaceae most likely has homoligulate and ciliate ventral ligules; however, we inferred a reversion to membranous ligules (predominantly in the BOP clade) with point reversals in the group. The PACMAD clade maintains the ancestral characteristic with reversions to the membranous type, especially in Panicoideae. Ligules of the CiM and CM type may have originated from EM or FH type ligules depending on the clade. The absence of ventral ligule is derived in the group. As dorsal ligules in foliage leaves and ventral ligules of culm leaves were not inferred as states for the ancestor of Poaceae, we conclude that they undergone reversions mainly in Puelioideae and Bambusoideae (except in Olyreae). As for culm leaf ligules, they are predominantly heteroligulate, with the CM type more common in culm leaves than in foliage leaves.

1.7 Acknowledgments

This paper is dedicated to the memory of Renato de Mello-Silva for his enthusiasm in the development of this research and his contributions to the systematics of Monocotyledons.

1.8 Funding and/or Conflicts of interests/Competing interests

This study was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Process 2019/15195-8 to GFMP); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Productivity Grant Process 303962/2019-4 to GFMP and 170871/2017-7 to BEC). Furthermore, the authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose

1.9 References

- Acharyar, R. B. K. R. & C. T. 1921. Mudaliyar. A handbook of some south Indian grasses. Government Press, Madras.
- Arber, A. 1923. Leaves of the Gramineae. *Botanical Gazette* 76 (4): 374-388.
- . 1925. *Monocotyledons: a morphological study*. University Press, Cambridge.
- Armstrong, S. F. 1917. *British grasses and their employment in agriculture*. University Press, Cambridge.
- Ascherson, P. & P. Graebner. 1898. *Synopsis der Mitteleuropäischen Flora*, vol. 2. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Ascherson, P. & P. Graebner. 1907. Potamogetonaceae. *In.*: Engler, A. *Das Pflanzenreich: Regni vegetabilis conspectus*, 4(2): 1-184. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Bailey, J. 2003. *The Facts on file dictionary of Botany*, Checkmarks Books, New York.
- Baillon, H. 1882. *Cours élémentaire de Botanique*. Librairie Hachette, Paris.
- Balslev, H. 1996. *Flora Neotropica: Juncaceae*. The New York Botanical Garden, New York.
- Beal, W. J. 1896. *Grasses of North America*, vol. 2. Henry Holt and Company, New York.
- Becker, J. 1828. *Flora der Gegend um Frankfurt am Main*. Ludwing Reinherz, Frankfurt.
- Becraft, P. W., D. K. Bongard-Pierce, A. W. Sylvester, R. S. Poethig & M. Freeling. 1990. The liguleless-1 Gene Acts Tissue Specifically in Maize Leaf Development. *Developmental Biology* 141: 220-232.
- Beentje, H. 2016. *The Kew plant glossary: an illustrated dictionary of plant terms*, ed. 2. Royal Botanical Gardens, Kew.
- Bell, A, D & A. Bryan. 2008. *Plant form: an illustrated guide to flowering plant morphology*. Timber Press, London.
- Belzung, E. 1900. *Anatomie et physiologie végétales*. Ancienne Librairie Germer Baillièrre et Félix Alcan, Paris.
- Berg, O.C. & C. F. Schmidt. 1899. *Atlas der offizinellen Pflanzen – band III*, ed. 2. Arthur Felix, Leipzig.
- Birkby, K.M. & T. F. Preece. 1987. The ligules of green leaves of cock's-foot grass, *Dactylis glomerata* L., are a micro-habitat for bacteria and fungi. *Journal of Applied Bacteriology* 63 (6): 505–511
- Bischoff, G. W. 1834. *Lehrbuch der Botanik*. E. Schweizerbart, Stuttgart.
- Bor, N. L. 1940. *Flora of Assam*. Vol. 5. Gramineae, Prabasi Press, Caucutá.

- Boswell, J. T. 1877. English botany; or, coloured figures of British plants, vol. 11: Gramina, ed. 3. George Bell & Sons, London.
- Brackley, G. & R. Harmer. 1982. A key to common grasses of northeastern Nevada. U.S. Department of Agriculture, Soil Conservation Service, Elko, Nevada.
- Bradley, K. W. & F. Fishel. 2010. Integrated Pest Management: identifying grass seedlings. University of Missouri extension. Columbia.
- Bresinsky, A., C. Körner, J. Kadereit, G. Neuhaus & U. Sonnewald. 2012. Tratado de Botânica de Strasburguer, ed. 36. Artmed, Porto Alegre.
- Britton, N. L. & A. Brown. 1913. An Illustrated Flora of the Northern United States, Canada and the British Possessions, vol. 1, ed. 2. Charles Scribner's Sons, New York.
- Buchenau, F. 1919. Flora von Bremen und Oldenburg, ed. 8. M. Heinsius Nachfolger, Leipzig.
- Camelbeke, K. & P. Goetghebeur. 1999. The Ligule, a New Diagnostic Character in *Scleria* (Cyperaceae). Systematics and Geography of Plants 68 (1/2): 73-84.
- Čelakovský, L. J. 1897. Ueber die Homologien des Grasembryos. Botanische Zeitung 55: 141-174.
- Chaffey, N. J. 1982. Presence of Stomata-like Structures in the Ligule of *Agrostis gigantea* Roth. Annals of Botany 50 (5): 717-720.
- . 1983. Epidermal Structure in the Ligule of Rice (*Oryza sativa* L.). Annals of Botany 52: 13-21.
- . 1984. Epidermal structure in the ligules of four species of the genus *Poa* L. (Poaceae), Botanical Journal of the Linnean Society 89 (4): 341–354.
- . 1985a. Structure and Function in the Grass Ligule: Presence of Veined and Membranous Ligules on the Same Culm of British. New Phytologist 101 (4): 613-621
- . 1985b. Structure and Function in the Grass Ligule: Optical and Electron Microscopy of the Membranous Ligule of *Lolium temulentum* L. Annals of Botany 55: 65-75.
- . 1994. Structure and function of the membranous grass ligule: a comparative study. Botanical Journal of the Linnean Society 116: 53-69.
- . 2000. Physiological anatomy and function of the membranous grass ligule. New Phytologist, 146: 5-21.
- Chapman, G. P. 1996. The Biology of Grasses. CAB international, Wallingford.
- Clayton, W.D., M. S. Vorontsova, K. T. Harman, & H. Williamson. 2006 onwards. GrassBase - The Online World Grass Flora. Available in <<http://www.kew.org/data/grasses-db.html>>. Access on 17 Ago 2019.

- Clifford, H. T. 1969. Attribute correlation in the Poaceae (grasses), *Botanical Journal of the Linnean Society* 62: 59-67.
- Copple R. F. & C. P. Pase. 1967. A Vegetative Key to Some Common Arizona Range Grasses. Forest Service, U. S. Department of Agriculture, Fort Collins.
- Crozier, A. A. 1892. A dictionary of botanical terms. Henry Holt and company, New York.
- Cusset, G. & M. H. T. Thi-Tuyet. 1965 La ligule de la feuille végétative des Carex, *Bulletin de la Société Botanique de France*, 112:1-2.
- Dahlgren, R. M. T. & H. T. Clifford. 1982. The monocotyledons: a comparative study. Academic Press, London.
- , ——— & P. F. Yeo. 1985. The families of the monocotyledons: structure, evolution and taxonomy. Springer-Verlag, Berlin.
- Dallwitz, M. J., T. A. Paine & E. J. Zurcher, E. J. 2000 Onwards. Principles of interactive keys. Available in <<http://delta-intkey.com>>. Access on 02 Nov 2019.
- Darke, R. (2007). The encyclopedia of grasses for livable landscapes. Timber Press, Portland, Oregon.
- Das, M., S. Bhattacharya, P. Singh, T. S. Filgueiras & A. Pal. 2008. Bamboo Taxonomy and Diversity in the Era of Molecular Markers. *Advances in Botanical Research* 47: 225-268.
- Dayton, W. A. 1931. Glossary of botanical terms commonly used in range research. United States Department of Agriculture, Washington D. C.
- De Moor, V. P. G. 1854. *Traité des Graminées céréales et fourragères que l'on rencontre en Belgique*. H. Tarlier, Bruxelles.
- Denise, D. M. 1906. Famille 130: Graminées. *In.*: Coste, L. H. *Flore descriptive et Illustrée de la France*. 3: 520-674, Librairie des sciences naturelles, Paris.
- Döll, J. Ch. 1843. *Rheinische Flora*. Brönnner, Frankfurt.
- Domin, K. 1911. Morphologische und phylogenetische studien über die stipularbildungen. *Annales du jardin botanique de Buitenzorg* 24: 117-136
- Duchartre, P. E. S. 1868. *Rapport sur les progrès de la botanique physiologique*. Imprimerie impériale, Paris.
- Duistermaat, H. 2005. Field Guide to the Grasses of Singapore (Excluding the Bamboos). *The Gardens' Bulletin Singapore* 57(Suppl.): 1-177.
- Dumortier, B. C. 1823. *Observations sur les gramnéés de la flore Belgique*. Casterman, Tournay.
- Dupon, M. 1819. Observations sur la gaine des feuilles des graminés. *Journal de physique, de chime et d'histoire naturelle* 89: 241-247.

- Durieu de Maisonneuve, M. 1859. Étude taxonomique de la ligule dans le genre *Carex*. Bulletin de la Société botanique de France 6: 621-636.
- Eames, A. J. 1961. Morphology of the Angiosperms. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Earle, F. S. 1919. Varieties of sugar cane in Porto Rico. The Journal of the Department of Agriculture and Labor of Porto Rico, 3(2): 15-55.
- Eaton, A. 1828. Botanical grammar and dictionary, ed. 4. Websters and Skinners, Albany.
- Ellis, B., D. C. Daly, L. J. Hickey, K. R. Johnson, J. D. Mitchell, P. Wilf, P. & S. L. Wing. 2009. Manual of leaf architecture. The New York Botanical Garden press, Ithaca.
- Etter, A. G. 1951. How Kentucky Bluegrass Grows. Annals of the Missouri Botanical Garden 38 (3): 293-375.
- Fernandes, R. B. 1972. Vocabulário de termos botânicos. Anuário da Sociedade Broteriana 38: 181-292.
- Ferri, M. G., N. L. Menezes & W. S. Monteiro. 1981. Glossário ilustrado de Botânica. Nobel, São Paulo.
- Fish, L., A. C. Mashau, M. J. Moeaha & M. T. Nembudani. 2015. Identification guide to Southern African Grass: an identification manual with Keys, descriptions and distributions. Strelitzia 36, South African National Biodiversity Institute, Pretoria.
- Font Quer, P. 1965. Diccionario de Botánica. Editorial Labor, Barcelona.
- Fontaneli, R. S., H. P. Santos, & R. S. Fontaneli. 2012. Morfologia de gramíneas forrageiras. In.: Fontaneli, R. S., H. P. Santos & R. S. Fontaneli. (eds.). Forrageiras para Integração Lavoura-Pecuária-Floresta na Região Sul-brasileira, ed. 2. 2: 51-58, Embrapa Trigo, Passo Fundo.
- Foster, T. M. & M. C. P. Timmermans. 2009. Axial Patterning of the Maize Leaf. In.: Bennetzen, J. L. & S. C. Hake (org.). Handbook of Maize: Its Biology. 161-178, Springer, New York.
- Francis, M. E. 1912. The book of grasses: an illustrated guide to the common grasses, and the most common of the rushes and sedges. Doubleday, Page & Company, New York.
- Freckmann, R. W. 1967. Taxonomic studies in *Panicum* subgenus *Dichantherium*. PhD. Dissertation, Iowa State University, Ames, Iowa, USA.
- Gandhi, D., S. Albert & N. Pandya. 2016. Handbook on the morphology of common grasses: identification and characterization of caryopses and seedlings. Apple Academic Press, Oakville.
- Garcke, A. 1848. Flora von Halle mit näherer Berücksichtigung der Umgegend von Weissenfels, Naumburg, Freiburg, Bibra, Nebra, Querfurt, Allstedt, Artern, Eisleben,

- Hettstedt, Sandersleben, Aschersleben, Stassfurt, Bernburg, Köthen, Dessau, Oranienbaum, Bitterfeld und Delitzsch. Erster Theil, Halle.
- Gibbs Russell, G. E., L. Watson, M. Koekemoer, L. Smook, N. P. Barker, H. M. Anderson & M. J. Dallwitz. 1990. Grasses of southern Africa. Memoirs of the Botanical Survey of South Africa, No. 58. Botanical Research Institute, Pretoria.
- Gibson, D. J. 2009. Grasses and Grassland Ecology. Oxford University Press, Nova York.
- Gmelin, P. 1867. Die natürlichen Pflanzenfamilien nach ihren Gegenseitigen Verwandtschaften. Schweizerbart, Stuttgart.
- Goebel, K. 1898. Organographie der pflanzen: insbesondere der archegoniaten und samenpflanzen. Verlag Von Gustav Fischer, Jena.
- Goetghebeur, P. Cyperaceae. In: Kubitzki, K. The Families and Genera of Vascular Plants: IV Flowering Plants Monocotyledons - Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). Springer, Berlin.
- Gonzalo, R., C. Aedo & M. A. García. 2013. Taxonomic Revision of the Eurasian *Stipa* Subsections *Stipa* and *Tirsae* (Poaceae). Systematic Botany 38 (2): 344-378.
- Gonçalves, E. G. & H. Lorenzi, 2007. Morfologia vegetal: organografia e dicionário ilustrado de morfologia de plantas vasculares. Instituto Platarum de Estudos da Flora, São Paulo.
- Gordon, W. J. 1907. Manual of British Grasses. Simpkin, Marshall, Hamilton, Kent & Co., London.
- Gould, F. W. 1968. Grass Systematics. McGraw-Hill Book Company, New York.
- & C. A. Clark. 1978. *Dichanthelium* (Poaceae) in the United States and Canada. Annals of the Missouri Botanical Garden 65 (4): 1088-1132.
- GPWG - Grass Phylogeny Working Group. 2001. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). Annals of the Missouri Botanical Garden 88 (3): 373-457.
- Grassano, N. 2009. Biologia dei cereali autunno-vernini. In: Tedone, L. (ed.). Quaderno colture erbacee: cereali, foraggere industriali, 2: 25-41. Editore Settore Biblioteca - Centro di Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura Basile Caramia di Locorotondo, Bari.
- Hackel, E. 1887. Gramineae (echte Gräser). In: Engler, A. & K. Prantl. Die natürlichen Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigeren Arten insbesondere den Nutzpflanzen bearbeitet unter Mitwirkung zahlreicher hervorragender Fachgelehrten. 2: 1-97, Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Hagenbuch, K. W. & D. E. Lemke. 2015. Grasses of the Texas hill country: vegetative key and descriptions. Phytoneuron 4:1-93.
- Hallier, E. 1878. Schule der Systematischen Botanik. Wilh. Gottl. Korn., Breslau.

- & H. Ludwing. 1866. Dr. Clamor Marquart's pharmazeutische Naturgeschichte und Waarenkunde. Kunze's Nachfolger, Mainz.
- Harper, C. A., G. E. Bates, M. P. Hansbrough, M. J. Gudlin, J. P. Gruchy & P. D. Keyser. 2007. Native Warm-Season Grasses: identification, establishment and management for wildlife and forage production in the mid-south a manual for natural resource professionals and other land managers. University of Tennessee Extension, Institute of Agriculture, Knoxville.
- Harris, S. A. 2014. Grasses. Reaktion books, London.
- Hausmann, F. F. 1832. Flora von Tirol. Wagner'schen Buchhaudlung, Innsbruck.
- Hegi, G. 1922. Alpenflora: die verbreitetsten Alpenpflanzen von Bayern, Österreich und der Schweiz. J. F. Lehmann, München.
- Hertel, R. J. G. 1974. Uma interpretação filogenética da ligula. *Acta Biológica Paranaense* 3 (1, 2, 3, e 4): 55-74.
- Hipp, A. L. 2008. Field guide to Wisconsin sedges: an introduction to the genus *Carex* (Cyperaceae). University of Wisconsin Arboretum and the University of Wisconsin, Madison.
- Holtum, R. E. 1958. The Bamboos of the Malay Peninsula. *The Gardens' Bulletin Singapore* 16: 1-135.
- Hooker, J. D. 1897. *Flora of British India*. L. Reeve & Co., London.
- Hubbard, C. E. 1992. Grasses: a guide to their structure, identification, uses and distribution in the British Isles, ed. 3. Penguin Books, London.
- Ibrahim, K. M. & P. M. Peterson. 2014. *Grasses of Washington, D.C.* Smithsonian Institution Scholarly Press, Washington D.C.
- , H. A. Hosni, & P. M. Peterson. 2016. *Grasses of Egypt*. Smithsonian Institution Scholarly Press, Washington D.C.
- Illiger, J.C.W. 1800. Versuch einer systematischen vollständigen Terminologie für das Thierreich und Pflanzenreich. C. K. Fleckeisen, Helmstädt.
- Jackson, B. D. 1900. *A glossary of botanic terms with their derivation and accent*. Duckworth & Co, London.
- Jessen, C. F. W. 1863. *Deutschlands Gräser und Getreidearten*. T. O. Weigel, Leipzig.
- Jessop, J. P., H. R. Toelken & J. Kellermann. 2011. Glossary of Botanical Terms. *In*: Kellermann, J. (ed.). *Flora of South Australia*, ed. 5. 1-24. Government of South Australia, Department for Environment and Water, Adelaide.

- Judd, W. S., C. S. Campbell, E. A. Kellogg & P. F. Stevens. 1999. *Plant Systematics: a phylogenetics approach*. Sinauer Associates, Sunderland.
- , ———, ——— & ———. 2009. *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*, ed. 3. Artmed, Porto Alegre.
- Jussieu, M. A. 1842. *Cours élémentaire d'histoire naturelle*, 4^a partie: organes et fonctions de la végétation. Langlois et Leclercq, Paris.
- Karsten, H. 1895. *Flora von Deutschland, Oesterreich und der Schweiz*, vol. 1, ed. 2. Köhler, Berlin.
- Kellogg, E. A. 2015. Flowering Plants Monocots: Poaceae. *In.*: Kubitzki, K. *The families and genera of vascular plants*, 13: 1-416. Springer International, New York.
- Klapp, E. 1987. *Manual de las gramíneas*, ed. 11. Omega, Barcelona.
- Klinggräff, C. J. 1848. *Flora von Preussen*. Baumann, Marienwerder.
- Koechlin, J. 1962. Famille des Graminées. *In.*: Aubréville, A. (ed.). *Flore du Gabon*. 5:3-292. Muséum National D'histoire Naturelle, Laboratoire de Phanérogamic, Paris.
- Körnicker, F. & H. Werner. 1885. *Handbuch des Getreidebaues*, vol. 1. Verlagshandlung für Landwirtschaft, Gartenbau und Forstwesen, Berlin.
- Kuhlmann, J. G. 1948. *Botânica*, parte XI: gramíneas (1^o fascículo), ed. 2. Ministério da agricultura, Imprensa nacional, Rio de Janeiro.
- Kunth, K. S. 1833. *Enumeratio plantarum*. J. G. Cottae., Stutgardiae et Tubingae.
- . 1834. *Anleitung zur Kenntniss sämmtlicher in der Pharmacopoea Borussica aufgeführten officinellen Gewächse nach natürlichen Familien*. Duncker und Humblot, Berlin.
- Kützing, F. T. 1851. *Grudzüge der philosophischen Botanik*, vol. 1. F. A. Brockhaus, Leipzig.
- Lamson-Scribner, F. 1892. Grasses of Tennessee – part I. *Bulletin of the agricultural experiment station of the university of Tennessee*. 5(2): 29-129.
- Le Gall, M. 1852. *Flore du Morbihan*. J. M. Galles, Vannes.
- Le Maout, E. & J. Decaisne. 1876. *Traité général de botanique descriptive et analytique*, ed. 2. Firmin Didot et cie, Paris.
- Colomb, M. G. 1887. *Recherches sur les stipules*. *Annales des Sciences Naturelles: Botanique*. 7(6): 1-76.
- Leithead, H. L., L. L. Yarlett & T. N. Shiflet. 1971. 100 Native forage grasses in 11 southern states. U.S. Department of Agriculture, Soil Conservation Service, Washington, D. C.
- Leitner, L. & K. Sherfinski. 2012. Key to the vascular plant species, native and naturalized, of the Southeastern Wisconsin region. Available in <

<https://www.sewrpc.org/SEWRPC/NaturalResources/PlantIdentificationGuides.htm>>.

Access on 23 May 2020.

- Lewis, M. W., N. Bolduc, K. Hake, Y. Htike, A. Hay, H. Candela, S. Hake. 2014. Gene regulatory interactions at lateral organ boundaries in maize. *Development* 141: 4590-4597.
- Lindley, J. & T. Moore. 1866. *The treasury of Botany: a popular dictionary of vegetable kingdom, part. 2.* Longmans, Green, and Co., London.
- Linnaeus, C. 1809. *Philosophia Botanica*, ed. 4. Sprengel, Halae ad Salam.
- Longhi-Wagner, H. M., V. Bittrich, M. G. L. Wanderley & G. J. Shepherd. 2001. Poaceae. *In*: Wanderley, M. G. L., G. J. Shepherd & A. M. Giulietti (coords.). *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*, 1: 1-291. FAPESP/Hucitec, São Paulo.
- Looman, J. 1982. *Prairie grasses: identified and described by vegetative characters.* Minister of Supply and Services Canada, Ottawa.
- Lowe, E. J. 1958. *A natural history of British grass.* Groombridge, London.
- Lubbock, J. 1890. On stipules, their forms and functions. *Journal of the Linnean Society of Botany* 28: 217-243.
- . 1895. On stipules, their forms and functions – part II. *Journal of the Linnean Society of Botany* 30: 463-532.
- Lutz, K. G. 1900. Echte Gräser, Gramineae. *In*: Sturms, J. (ed.). *Flora von Deutschland*. 3: 5-230., Verlag, Stuttgart.
- Majumdar, G. P. 1956. Stipules, stipels, ligules and leaf-sheath. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B* 43: 9–22.
- Maly, J. k. 1863. *Systematische Beschreibung der in Österreich wildwachsenden und kultivirten Medicinal-Pflanzen: Für Ärzte und Apotheker.* Wilhelm Braumüller, Wien.
- Martens, G. & C. A. Kemmler. 1865. *Flora von Württemberg und Hohenzollern.* Osiander'schen Buchhandlung, Tübingen.
- Mauseth, J. D. 1988. *Plant anatomy.* The Benjamin Cummings Publishing Company, San Francisco.
- McClure, F. A. 1966. A Glossary of the Bamboos. *Taxon*, 15(6): 220-235.
- Melo-de-Pinna, G. F. A. & R. Cruz. 2020. Leaf development in vascular plants. *In*: Demarco, D. *Plant Ontogeny: studies, analyses and evolutionary implications*, 4: 83-105. Nova Science Publishers, Hauppauge, New York.
- Mertens, F. C. & W. D. J. Koch. 1823. *Deutschlands Flora*, vol. 1. Friedrich Wilmans, Frankfurt.

- Metcalf, C. R. 1960. *Anatomy of the monocotyledons: I Gramineae*. Clarendon Press, New York.
- Michelangeli, F. A., J. I. Davis & D. W. Stevenson. 2003. Phylogenetic relationships among Poaceae and related families as inferred from morphology, inversions in the plastid genome, and sequence data from the mitochondrial and plastid genomes, *American Journal of Botany* 90 (1): 93–106.
- Mitideri, J. 1992. *Manual de Gramíneas e leguminosas para pastos tropicais*, ed. 2. Nobel e EdUSP, São Paulo.
- Moul, E. T. 1973. *Marine Flora and Fauna of the Northeastern United States: higher plants of the Marine Fringe*, vol. 384. US Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, Seattle.
- Moyen, L. J. 1871. *Cours élémentaire de botanique et flore du Canada*. Geo. E. Desbarats, Imprimeur-editeur, Montréal.
- Müller, C. 1890. *Medicinalflora: Eine Einführung in die allgemeine und angewandte Morphologie und Systematik der Pflanzen*. Julius Springer, Berlin.
- Munhoz, C. B. R., C. U. O. Eugênio & R. C. Oliveira. 2011. *Vereda: guia de campo*. Rede de sementes do cerrado, Brasília.
- Nelson, C. J. & K. J. Moore. 2020. *Grass Morphology*. In: Moore, K. J., M. Collins, C. J. Nelson & D. D. Redfearn. *Forages: The Science of Grassland Agriculture*, 2 ed. 7. 2: 23-49. John Wiley & Sons Ltd, Croydon.
- Neumann, H. 1938. Zur Kenntniss der Anatomie und ersten Anlage der Gramineenligula. *Beiträge zur biologie der pflanzen* 25, 1-22.
- Oliveira, R. C., P. A. Reis, A. G. T. Cardoso, A. R. O. Ribeiro, A. C. V. Berto, A. I. C. Ponciano, C. O. Moura & J. F. M. Valls. 2016. *Guia de gramíneas do Cerrado*. Rede de sementes do cerrado, Brasília.
- Oxford. 1996. *Dictionary of Biology*, ed. 3. Oxford University Press, Oxford.
- Palisot de Beauvois, A. M. F. J. 1812. *Essai d'une nouvelle Agrostographie*. Fain, Paris.
- Pantoja, S. 2016. *Sistemática vegetal: primeiros passos*. Technical Books, Rio de Janeiro.
- Parnell, R. 1842. *The grasses of Scotland*. William Blackwood and Sons, Edinburgh.
- Pathak, S., S. Kar & P. Singh. 2013. Ligules as aid to Identification of Grasses. *Pleione* 7(1): 241-246.
- Pax, F. 1890. *Allgemeine Morphologie der pflanzen mit besonderer berücksichtigung der blüthenmorphologie*. Ferdinand Enke, Stuttgart.
- Pereira, A. B. & J. Putzke. 2010. *Dicionário Brasileiro de Botânica*. CRV, Curitiba.

- Peterson P. M., H. A. Hasnaa & E. K. Shamsou. 2020. A key to the grasses (Poaceae) of Egypt. *Webbia - Journal of Plant Taxonomy and Geography* 75(2): 329-353.
- Philipson, W. R. 1935. The development and morphology of the ligule in grasses. *The New Phytologist*, 34 (4): 310-325.
- Phillips, C. E. 1962. Some Grasses of the Northeast: A key to their identification by vegetative characters. University of Delaware, Agricultural Experiment Station, Newark, Delaware.
- Plues, M. 1867. British grasses: an introduction to the study of the graminees of Great Britain and Ireland. Reeve and Co. London.
- Pohl, R. W. 1954. How to know the grasses. W. C. Brown Co., Dubuque.
- . 1980. Family #15, Gramineae. *In*: Burguer, W. (ed.). *Flora Costaricensis*. Fieldiana Botany, New Series 4: 1-608. Field Museum of Natural History, Chicago.
- Ponzo, A. 1931. Sulla ligula delle Monocotiledoni, *Giornale botanico italiano*, 38 (3): 515-533.
- Real, W. J. 1896. Grasses os North America, vol. 2. Henry Holt and company, New York.
- Regel, E. 1843. Beobachtungen über den Ursprung und Zweck der Stipeln. *Linnaea* 17: 193-23.
- Remi, E. A. 1861. Essai d'une nouvelle classification de la famille des graminées. Germer Baillière, Paris.
- Richardson, A. E. & S. Hake. 2019. Drawing a Line: Grasses and Boundaries. *Plants* 8 (4): 1-20.
- Roth, I. 1949. Zur entwicklungsgeschichte des blattes, mit besonderer berücksichtigung von stipular - und ligularbildungen. *Planta*, 37(3): 299-336.
- Rudall, P. J. & M. Buzgo. 2002. Evolucionary history of the monocot leaf. *In*: Cronk, Q. C. B., R. M. Bateman & J. A. Hawkins. *Developmental genetics and plant evolution*, 23: 431-458. Taylor & Francis, London.
- Saarela, J. M., S. V. Burke, W. P. Wysocki, M. D. Barrett, L. G. Clark, J. M. Craine, P. M. Peterson, R J. Soreng, M. S. Vorontsova & M. R. Duvall. 2018. A 250 plastome phylogeny of the grass family (Poaceae): topological support under different data partitions *PeerJ* 6, 1-71.
- Sachs, J. 1874. *Traité de Botanique conforme a l'état présent de la Science*. Libraire F. Savy, Paris.
- Saint- Hilaire, A. 1841. *La morphologie végétale: expliquée par des figures*. Libraire-Éditeur, Paris.
- Saint-Pierre, E. G. 1870. *Nouveau dictionnaire de botanique*. J. B. Baillière et Fils, Paris.

- Saporta, G. & A. F. Marion. 1885. L'évolution de Règne végétal: les phanérogames. Ancienne Librairie Germer Baillière, Paris.
- Sauer, W. & H. Chmelitschek. 1976. Beitrage zur kenntnis ausdauernder wildhafer: die gattung *Avenula* (Dumort.) Dumort. in den ostalpen. Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München 12: 513-608.
- Schmeil, O. 1911. Lehrbuch der Botanik: für höhere Lehranstalten und die hand des Lehrers, sowie für alle Freunde der Natur. Verlag von Quelle & Meyer, Leipzig.
- Schmidt, J. A. 1857. Flora von Heidelberg. Academische Verlagshandlung von J. C. B. Mohr, Heidelberg.
- Schultz, A. R. 1973. Dicionário de Botânica. Globo, Porto Alegre.
- Sekine, Y. 1959. Ligule patterns of the Poaceae. Journal of Japanese Botany 34 (5): 129-134.
- Sergievskaya, L. P. 1969. ФЛОРА ЗАБАЙКАЛЬЯ: Gramineae. ИЗДАТЕЛЬСТВО ТОМСКОГО УНИВЕРСИТЕТА, Томск.
- Simpson, M. G. 2010. Plant Systematics, ed. 2. Elsevier, Amsterdam.
- Sinnott, E. W. & I. W. Bailey. 1914. Investigations on the phylogeny of the Angiosperms 3: Nodal anatomy and the morphology of Stipules. American Journal of Botany 1(9): 441-453.
- Soreng, R. J. & J. I. Davis. 1998. Phylogenetics and Character Evolution in the Grass Family (Poaceae): Simultaneous Analysis of Morphological and Chloroplast DNA Restriction Site Character Sets. The Botanical Review 64 (1): 1-85.
- , P. M. Peterson, K. Romaschenko, D. Davidse, F. O. Zuloaga, E. J. Judziewicz, T. S. Filgueiras, J. I. Davis & O. Morrone. 2015. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). Journal of Systematics and Evolution 53 (2): 117–137.
- , ———, ———, ———, J. K. Teisher, L. G. Clark, P. Barberá, L. J. Gillespie & F. O. Zuloaga. 2017. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II: An update and a comparison of two 2015 classifications. Journal of Systematics and Evolution 55 (4): 259-290.
- Souza, V. C & H. Lorenzi. 2019. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG IV. Instituto Plantarum, São Paulo.
- , T. B. Flores & H. Lorenzi. 2013. Introdução à Botânica: morfologia. Instituto Plantarum, São Paulo.
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetics analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 30 (9): 1312–1313.

- Stapf, O. 1898. Gramineae. *In.*: Thiselton-Dyer, W. T. (ed.) *Flora Capensis*. 7:310-750, Lovell Reeve, London.
- Stevens, P. F. 2001 (onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017. Available in <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Access on 02 Feb 2020.
- Sugden, A. 2001. *Diccionario ilustrado de la botanica: con equivalencias en inglés y un amplio índice español-inglés, inglés-español*, ed. 3. Editorial Everest, Madrid.
- Sutherland, G. K. & A. Eastwood. 1916. The Physiological Anatomy of *Spartina Townsendii*. *Annals of Botany*, 30: 333-351.
- Sylvester, A. W. & L. Smith. (2009). Cell Biology of Maize Leaf Development. *In.*: Bennetzen, J. L. & S. C. Hake (ed.). *Handbook of Maize: its biology*. 10: 179-204, Springer, New York.
- The Plant List. 2013. A working list of all plant species. Available in <<http://www.theplantlist.org/>>. Access on 15 Jan 2020.
- Thi-Tuyet, M. H. T. 1963. Sur l'existence de deux catégories histologiques de ligules «nerviées» chez les Graminées. *Bulletin de la Société Botanique de France* 110(5-6): 204-209.
- . 1968. La notion de ligule latente, *Bulletin de la Société Botanique de France*, 115(1-2): 63-76.
- & G. Cusset. 1964. L'ontogénie de la ligule nerviée d'*Oryza sativa* L.; sa valeur morphologique, *Bulletin de la Société Botanique de France*, 111: 5-6, 262-273.
- Thomas, J. R. 2008. A morphological investigation of *Dichantherium* section *Lanuginosa* (Poaceae). MsC. Thesis, Faculty of Miami University, Oxford, Ohio, USA.
- Thomé, O. W. 1903. *Flora von Deutschland, osterreich und der Schweiz*, vol. 1. Friedrich von Zetzseh-witz, Gera.
- Townsley, B. T. & N. R. Sinha. 2012. A new development: evolving concepts in leaf ontogeny. *Annual Review of Plant Biology*, 2012. 63:535–62
- Tyler, A. A. 1897. The Nature and Origin of Stipules. *Annals of the New York Academy of Sciences* 10: 1-49.
- Tzvelev, N. N. 1989. The system of grasses (Poaceae) and their evolution. *The Botanical Review* 55 (3): 141-203.
- Van Tieghem, P. 1891. *Traité du Botanique*, ed. 2. Librairie F. Savy, Paris.

- Vassey, G. 1889. The agricultural grasses and forage plants of the United States: and such foreign kinds as have been introduced. U. S. Department of Agriculture, Washington D.C.
- Veldkamp, J. F., H. Duistermaat, K. M. Wong & D. J. Middleton. 2019. Poaceae (Gramineae). *In.*: Middleton, D. J., J. Leong-Škornicková & S. Lindsay (eds.). Flora of Singapore: Poales, vol. 7, 219–501. National Parks Board Singapore.
- Verma, B. K. 2011. Introduction to Taxonomy of Angiosperms. PHI Learning Private Limited, New Delhi.
- Vickery, J. W. 1961. Gramineae. *In.*: Anderson, R. H. (ed.). Flora of New South Wales. 19(1): 1-124. V. C. N. Blight, Sydney.
- , S.W.L. Jacobs & J. Everett. 1986. Taxonomic studies in *Stipa* (Poaceae) in Australia. *TELOPEA* 3(1): 1-132.
- Vidal, W. N. & Vidal, M. R. R. 1992. Botânica organografia, ed. 3. Imprensa Universitária UFV, Viçosa.
- Vogler, A. C. 1903. Grundlehren der kulturtechnik, vol. 1, part 1, ed. 3. Verlagsbuchhandlung Paul Parey, Berlin.
- Voigt, F. S. 1808. System der Botanik. Akademische Buchhandlung, Jena.
- Wang, S. 2017. Bamboo sheath—A modified branch based on the anatomical observations. *Scientific Reports* 7: 1-8
- Ward, H. M. 1901. Grasses: a handbook for use in the field and laboratory. Cambridge University Press, Cambridge.
- Watson, L. & M. J. Dallwitz. 1992. The grass genera of the world, 2 ed. CAB International, Wallingford, UK.
- WCSP. 2020. World Checklist of Selected Plant Families. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Available in <<http://wmsp.science.kew.org/>>. Access on 07 Sep 2020.
- Webster, R. D. 1992. Character significance and generic similarities in the Paniceae (Poaceae: Panicoideae). *Sida* 15 (2): 185-213.
- & J. V. Reyna, J. V. 1988. Genera of mesoamerican Paniceae (Poaceae: Panicoideae), *Contributions to Botany* 13 (2): 187-221.
- Willey, F. The Vegetative Organs of Some Perennial Grasses. *Proceedings of the Iowa Academy of Science*, 25(1): 341-367.
- Wimmer's, F. 1857. Flora von Schlesien, ed. 3. Ferdinand Hirt's, Breslau.
- Worsdell, W. C. 1916. The Morphology of the Monocotyledonous Embryo and of that of the Grass in particular. *Annals of Botany* 30: 509-524.

- Wünsche, O. 1901. Anleitung zum Botanisieren und zur Anlegung von Pflanzensammlungen, ed. 4. Verlagsbuchhandlung Paul Parey, Berlin.
- Yarllert, L. L. 1965. Important Native Grasses for Range Conservation in Florida. U. S. Department of Agriculture, Soil Conservation Service, Gainesville, Florida.
- Youmans, E. A. 1873. The first book of botany: designed to cultivate the observing powers of children. D. Appleton and Company, New York.
- Zanotti, E., G. Gorno & G. Paletti, 2012. Le piante selvatiche commestibili: Con note sulle loro proprietà medicinali e ricette di cucina, I quaderni del Parco, vol. 9. Parco Oglio Nord, Orzinuovi.

Table 1 Distribution of ventral ligule types of foliage leaves in 11,547 species of Poaceae (574 species present unknown data). N - Number of species per category. % - Percentage of species by category considering the total universe of analyzed species (12,120).

Homologulate species			Heterologulate species		
Category	N	%	Category	N	%
Eciliate membrane (EM)	6,509	53.70	EM + CiM	121	1.00
Ciliolate membrane (CiM)	1,655	13.66	EM + CM	10	0.08
Ciliate membrane (CM)	587	4.84	EM + FH	8	0.07
Fringe of hairs (FH)	2,467	20.35	CiM + CM	14	0.12
Absent	116	0.96	CiM + FH	10	0.08
EM + absent	12	0.10	CM + FH	7	0.06
CiM + absent	1	0.01	EM + CiM + FH	1	0.01
CM + absent	0	0.00	EM + FH + absent	4	0.03
FH + absent	21	0.17	CiM + FH + absent	1	0.01
			CM + FH + absent	3	0.02

Table 2 Variation of ligule types in Poaceae genera. The separation was made by size category [very large (over 200 spp.), large (101-200 spp.), medium (51-100 spp.), small (11-50 spp.) and very small (1 to 10 spp.)] and generic group. Parenthesis - indicates number of monospecific genera.

	Very large	Large	Medium	Small	Very small	Total
Only one ligule type						
1 type of ligule	1	2	4	37	459 (245)	503
1 type + absent	-	-	1	4	8	13
Two or more ligule type						
2 types of ligule	1	-	10	42	75	128
3 types of ligule	1	2	7	23	14	47
4 types of ligule	2	2	2	15	2	23
2 types + absent	1	-	1	5	4	11
3 types + absent	3	3	1	6	3	16
4 types + absent	3	1	5	5	-	14
Absent	-	-	-	-	10 (5)	10
Without data	-	-	-	-	4 (4)	4
Total	12	10	31	137	579 (254)	769

Table 3 Genera with the greatest variation in the ligule (which exhibits four or five character states for the morphology of the ligule). The separation was made by size category and generic group. A = Bambusoideae; B = Chloridoideae; C = Micrairoideae; D = Panicoideae; E = Pooideae; F = Puelioideae.

Category	Very large	Large	Medium	Small	Very small
4 types of ligule	<i>Digitaria</i> ^D	<i>Cenchrus</i> ^D	<i>Austrostipa</i>	<i>Arthraxon</i> ^D	<i>Germainia</i>
	<i>Paspalum</i> ^D	<i>Muhlenbergi</i> ^E	<i>Bouteloua</i> ^C	<i>Capillipedium</i> ^D	<i>Homolepis</i> ^D
		<i>a</i> ^B		<i>Chrysopogon</i> ^D	
				<i>Coleataenia</i> ^D	
				<i>Enteropogon</i> ^B	
				<i>Eriochrysis</i> ^D	
				<i>Eulalia</i> ^D	
				<i>Gymnopogon</i> ^B	
				<i>Helictotrichon</i> ^E	
				<i>Iseilema</i> ^D	
				<i>Leptochloa</i> ^B	
				<i>Ocellochloa</i> ^D	
				<i>Polytoca</i> ^D	
				<i>Saccharum</i> ^D	
	3 types + absent				<i>Trichantheium</i> ^D
<i>Festuca</i> ^E		<i>Chusquea</i> ^A	<i>Fargesia</i> ^A	<i>Apochloa</i> ^D	<i>Puelia</i> ^F
<i>Poa</i> ^E		<i>Isachne</i> ^C		<i>Aulonemia</i> ^A	<i>Rugoloo</i> ^D
<i>Stipa</i> ^E		<i>Nassella</i> ^E		<i>Indocalamus</i> ^A	<i>Stapfochloa</i> ^B
				<i>Raddia</i> ^A	
				<i>Rhipidoeladum</i> ^A	
4 types + absent				<i>Sacciolepis</i> ^D	
	<i>Eragrostis</i> ^B	<i>Setaria</i> ^D	<i>Arundinella</i> ^D	<i>Acroceras</i> ^D	-
	<i>Panicum</i> ^D		<i>Axonopus</i> ^D	<i>Brachiaria</i> ^D	
	<i>Sporobolus</i> ^B		<i>Chloris</i> ^B	<i>Ichnanthus</i> ^D	
			<i>Dichantheium</i> ^D	<i>Micraira</i> ^C	
			<i>Raddiella</i> ^A	<i>Raddiella</i> ^A	
		<i>Tripogon</i> ^B			

Table 4 Distribution of ventral ligule types of culm leaves in the 12,510 species of Poaceae (610 species with unknown data). N. Species number by category. % - Percentage of species by category considering the total universe of analyzed species (12,120).

Homoligulate species			Heteroligulate species		
Category	N	%	Category	N	%
Eciliate membrane (EM)	297	2.45	EM + CiM	26	0.21
Ciliolate membrane (CiM)	159	1.31	EM + CM	13	0.11
Ciliate membrane (CM)	115	0.95	EM + FH	0	0.00
Fringe of hairs (FH)	0	0.00	CiM + CM	6	0.05
Present, without data	21	0.17	CiM + FH	0	0.00
Absent	10063	83.03	CM + FH	0	0.00
			EM + CiM + CM	810	6.68

Table 5 Morphological features used in the reconstruction of the ancestral character of Poaceae ligules and the codification of their respective character states. Abbreviations: EM. Eciliate membrane; CiM. Ciliolate membrane; CM. ciliate membrane; FH. Fringe of hairs.

Observed trait	Character	Character state and coding
Ventral ligule in foliage leaves	Presence of trait	Absent (0) or present (1)
	Species trait variations	Homoligulate (0) and heteroligulate (1)
	Ligule morphology	Absent (0), EM (1), CiM (2), CM (3), FH (4), present but without information (5) and without data (6)
Dorsal ligule in foliage leaves	Presence of trait	Absent (0) and present (1)
Ventral ligule in culm leaves	Presence of trait	Absent (0) and present (1)
	Species trait variations	Homoligulate (0) and heteroligulate (1)
	Ligule morphology	Absent (0), EM (1), CiM (2), CM (3), FH (4), present but without information (5) and without data (6)

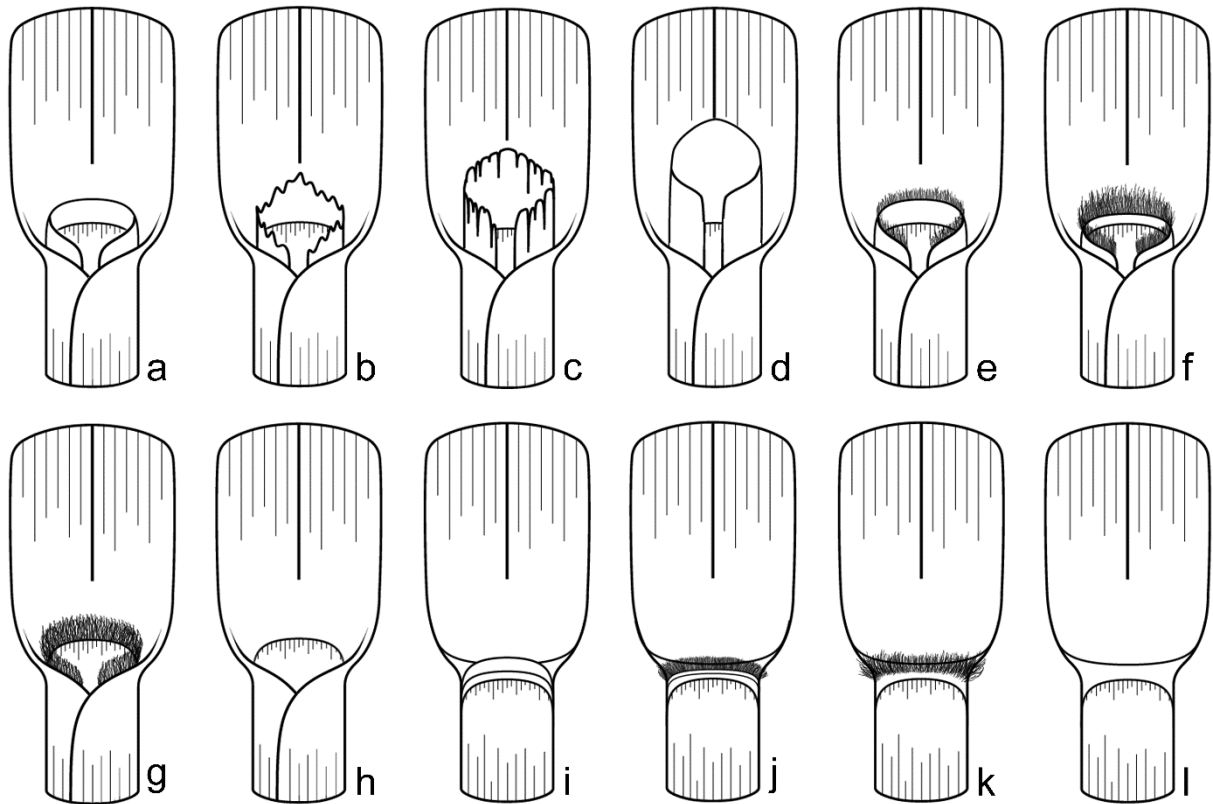


Fig. 1 Schematic representation of the morphological variety of the main types of ligules present in Poaceae. a-g. Different morphologies of the ventral ligule: eciliate membrane – EM (a-d) and some of its morphological variations, short ligule with a truncate apex (a), short ligule with an erose apex (b) medium ligule with a lacerate apex (c) and long ligule with whole and acute apex (d); ciliolate membrane - CiM (e), ciliate membrane - CM (f) and fringe of hairs - FH (g). h. Ventral ligule absent. The types of ventral ligula presented here, follow the proposal of Clayton et al. (2006). i-k. Detail of the collar region, with different morphologies of the dorsal ligule: stiff rim with no cilia (i), membranous-ciliate (j) and a fringe of hairs (k). Dorsal ligule absent (l). Illustrations by B. Edson-Chaves

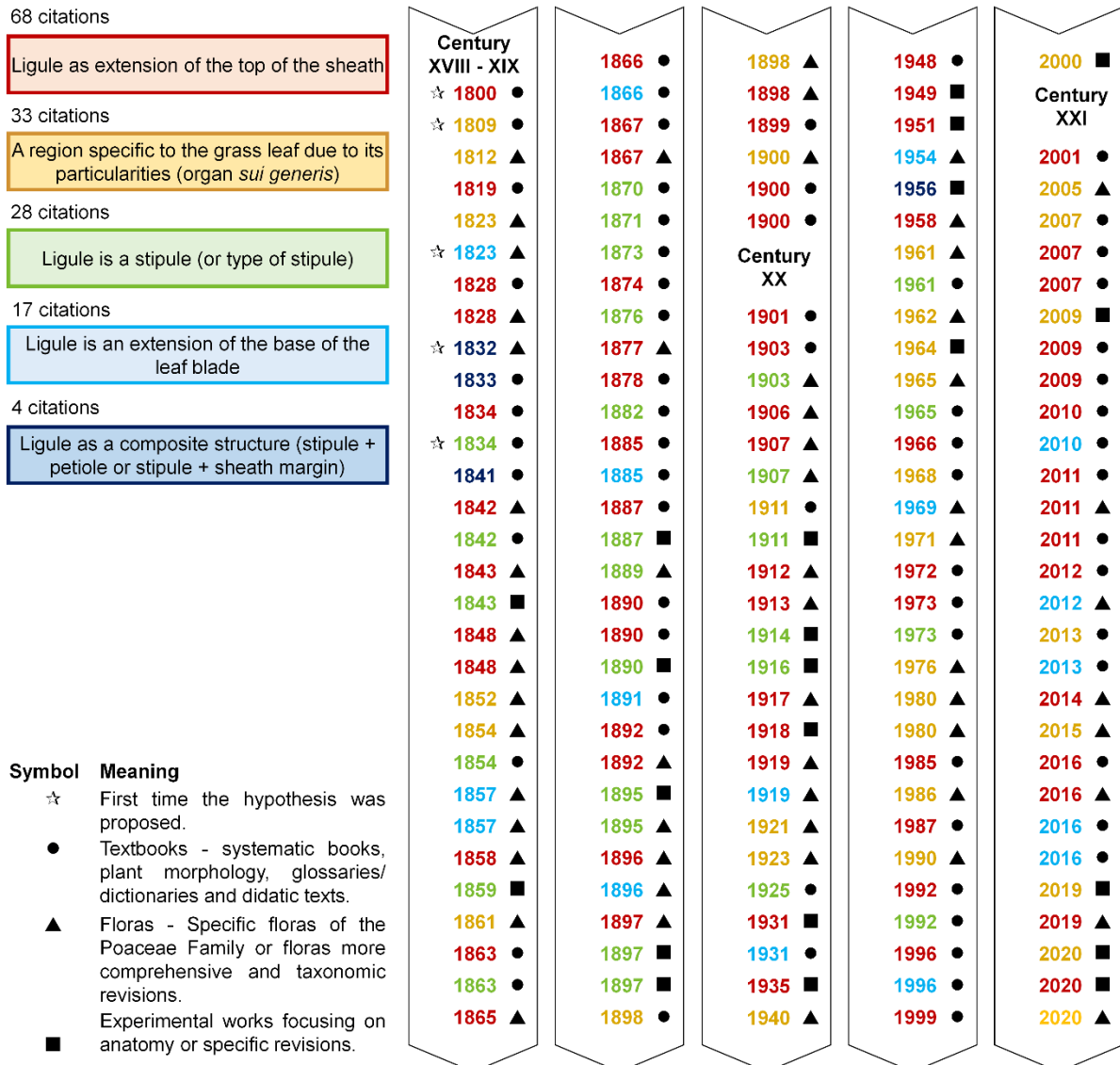


Fig. 2 Main hypotheses regarding the definition of the ligule from the 18th to 21st centuries. Colors indicate what hypothesis the publication of each year is referring to (see citations in text). The stars indicate the first time that each hypothesis was proposed. Illustrations by B. Edson-Chaves

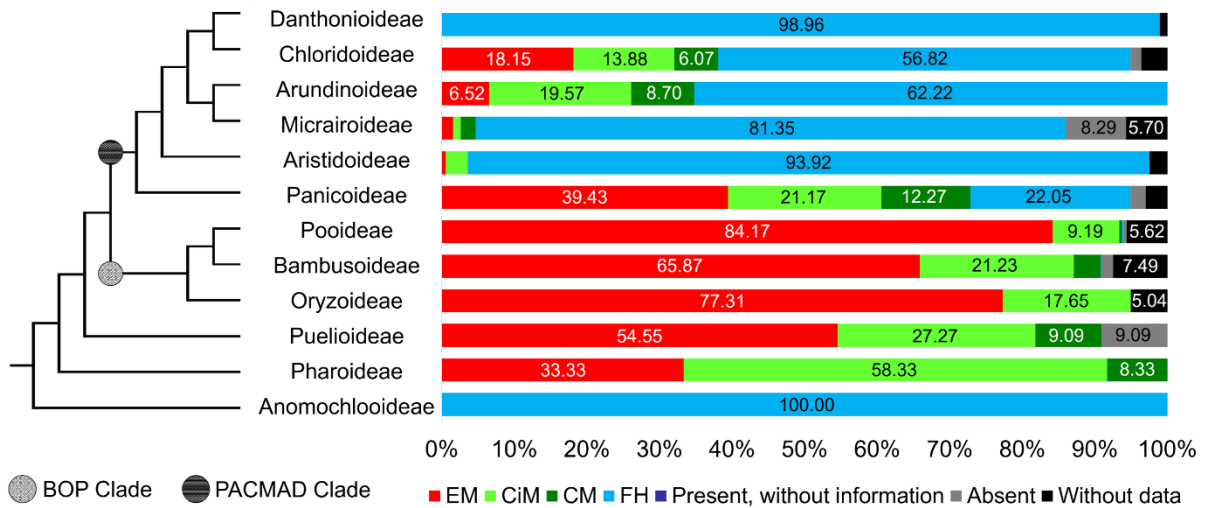


Fig. 3 Distribution of ligule types in foliage leaves and branching in Poaceae subfamilies. Data below 5% representation were not shown. EM - Ligule an eciliate membrane; CiM - Ligule a ciliate membrane; CM - Ligule a ciliate membrane; FH - Ligule a fringe of hairs. The phylogeny follows Saarela et al. (2018). Illustrations by B. Edson-Chaves

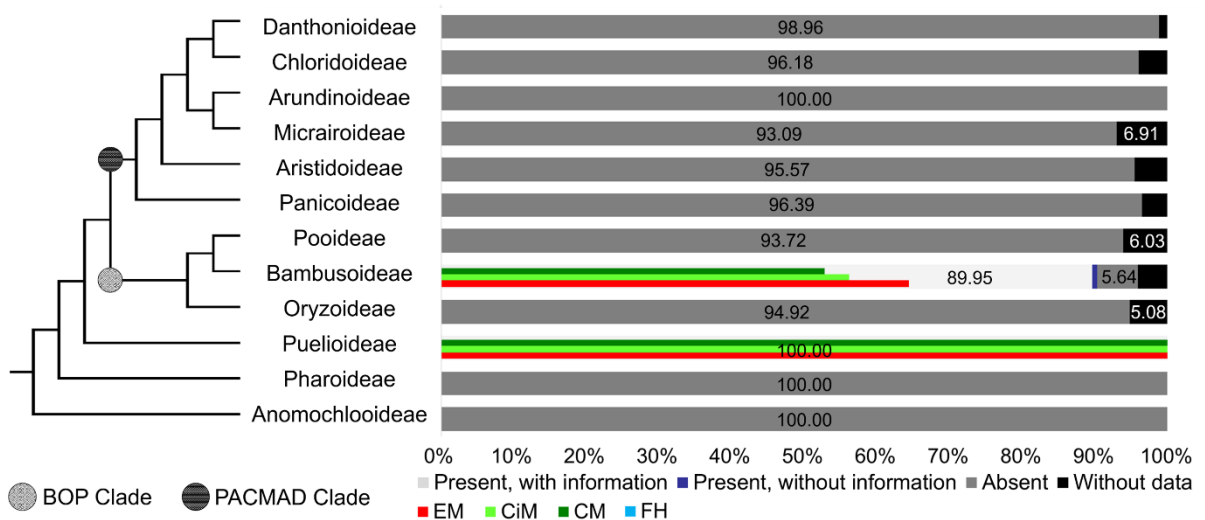


Fig. 4 Distribution of ligule types in culm leaves in Poaceae subfamilies. Since in Grassbase the morphology of the ligule in culm leaves is not explicitly presented, the ligules with a full, toothed, lacerate or fimbriate apex were considered as an EM ligule, apically ciliolate as a CiM ligule, and ciliolate and apically ciliate as a CM ligule. Data below 5% of representation were not shown. EM - Ligule an eciliate membrane; CiM - Ligule a ciliate membrane; CM - Ligule a ciliate membrane; FH - Ligule a fringe of hairs. The phylogeny follows Saarela et al. (2018). Illustrations by B. Edson-Chaves

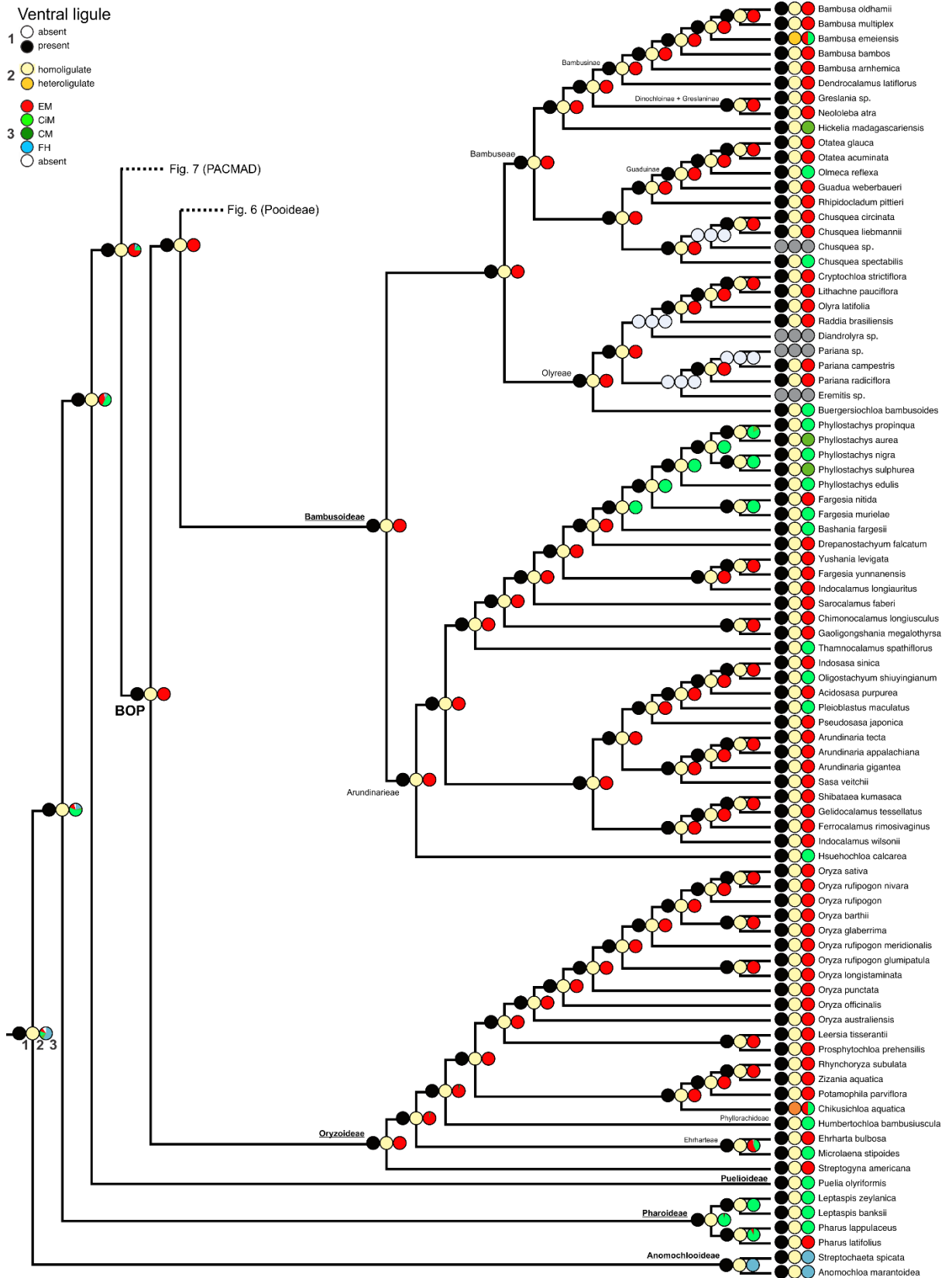


Fig. 5 Ancestral character of the ventral ligule of foliage leaves are inferred for Anomochlooideae, Pharoideae, Puelioideae, Oryzoideae (BOP clade) and Bambusoideae (BOP clade), using Maximum Likelihood (ML). Color codes for character states are shown in the upper left corner.

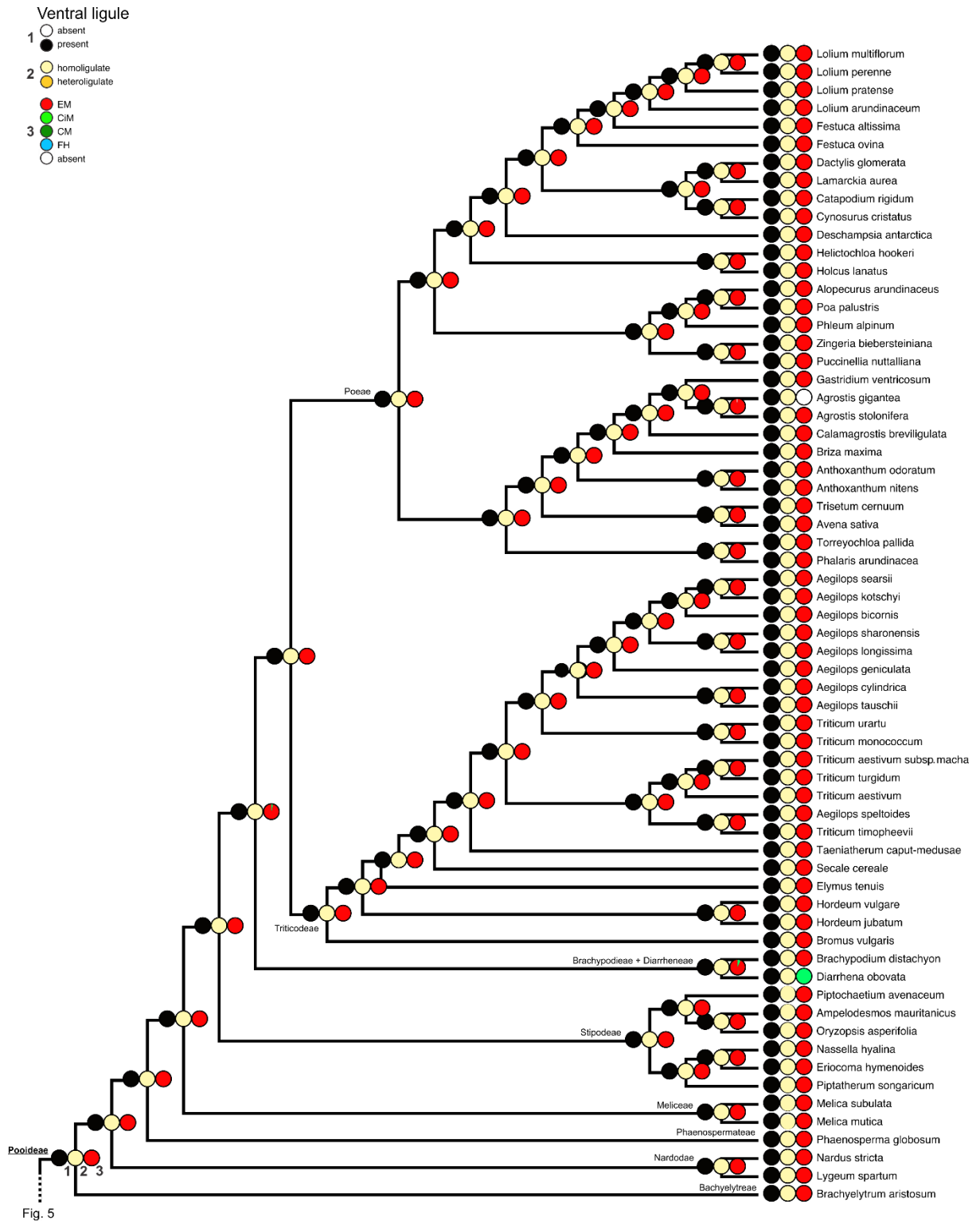


Fig. 6 Ancestral states of the ventral ligule of foliage leaves, inferred for Pooideae (BOP clade), using Maximum Likelihood (ML). Color codes for character states are shown in the upper left corner.

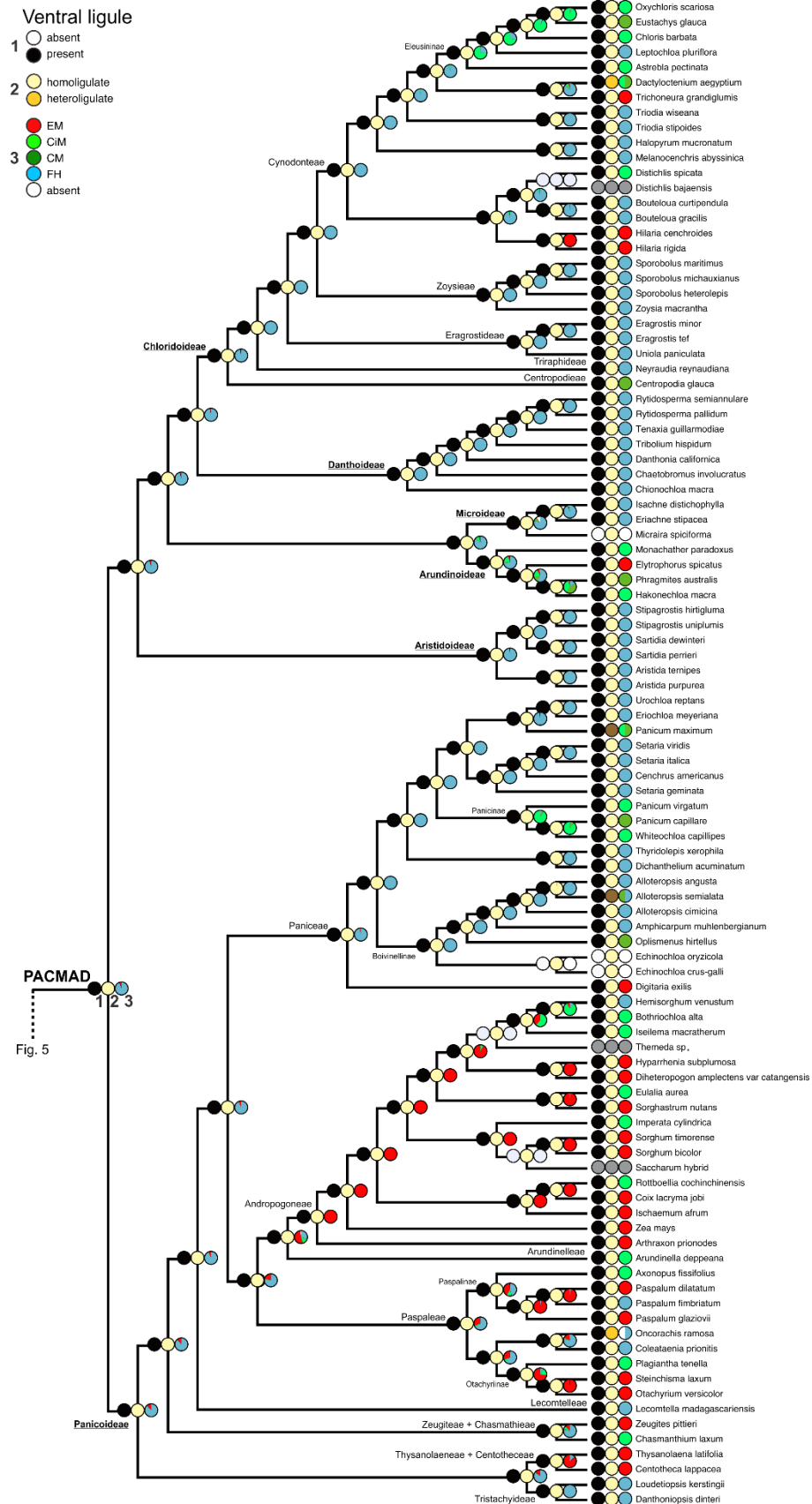


Fig. 7 Ancestral states of the ventral ligule of foliage leaves, inferred for the PACMAD clade, using Maximum Likelihood (ML). Color codes for character states are shown in the upper left corner.

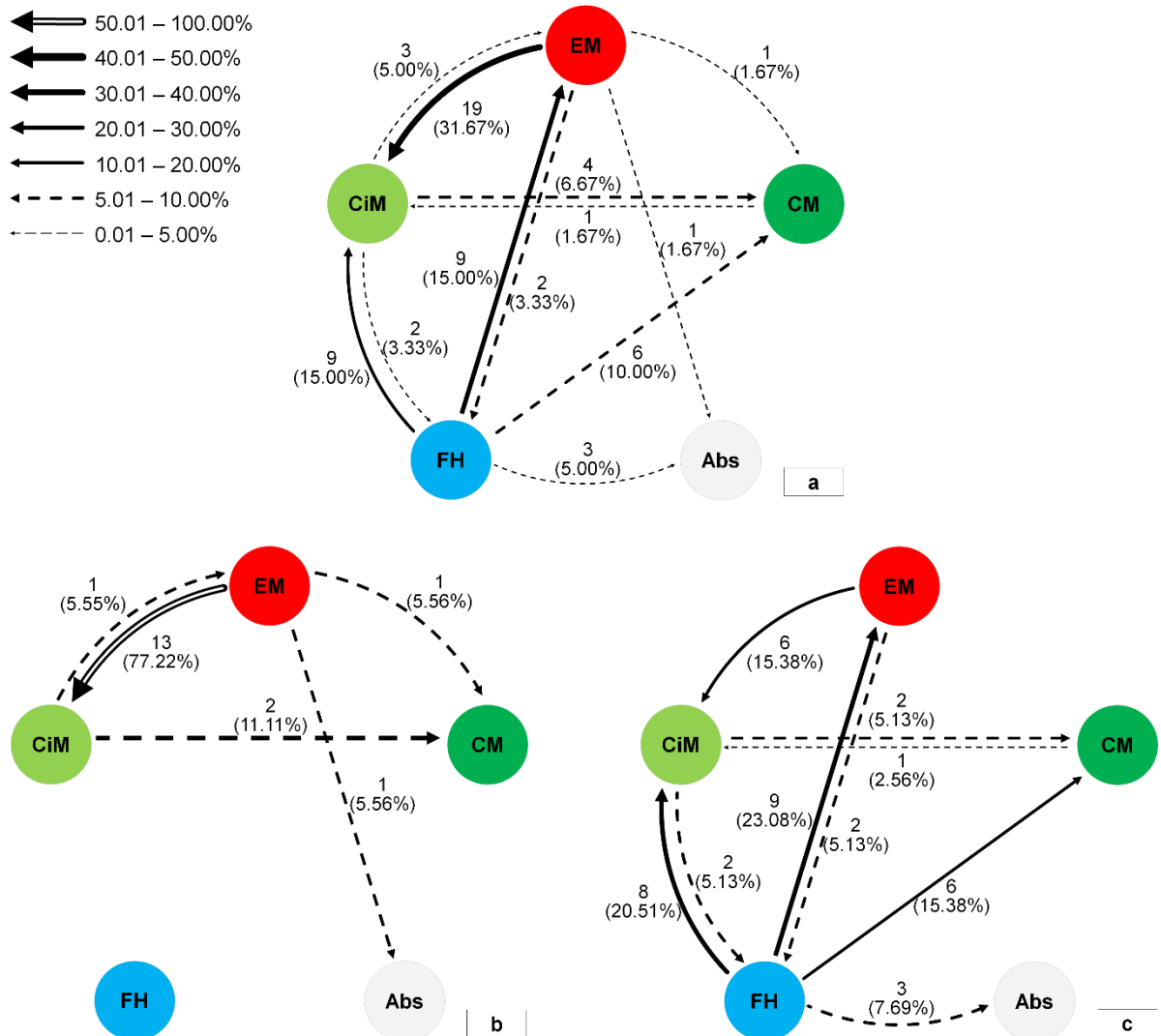


Fig. 8 Diagrams showing the absolute and percentage values of nodes in the ancestral character reconstruction that transitioned between different character states for Poaceae (a), the BOP clade (b) and the PACMAD clade (c). In the reconstruction (Figures 5-7), 60 nodes show character state changes, of these 18 occur in the BOP clade and 39 in the PACMAD clade. EM – Ligule an eciliate membrane; CiM – Ligule a ciliate membrane; CM - Ligule a ciliate membrane; FH - Ligule a fringe of hairs. Diagrams by B. Edson-Chaves

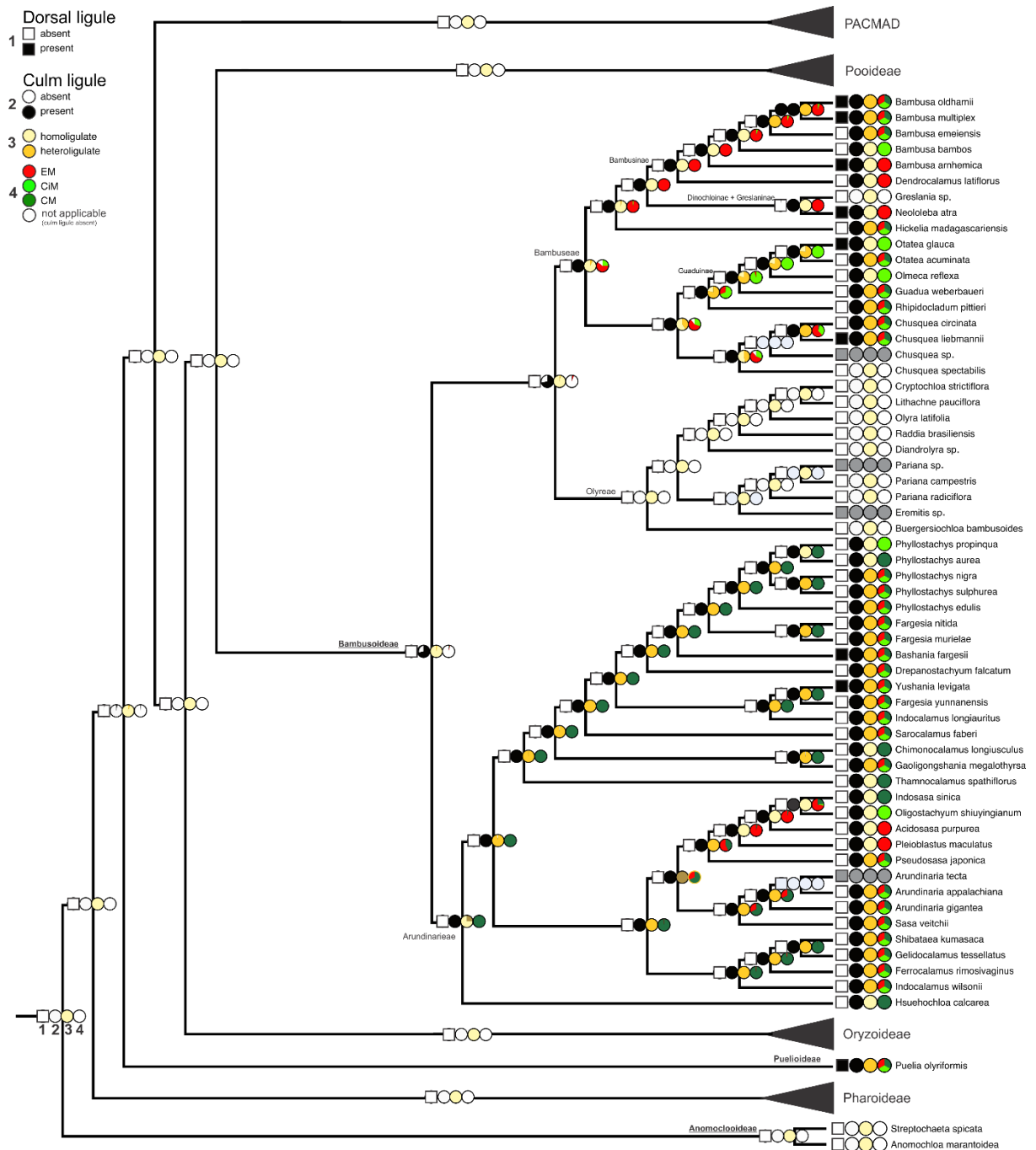


Fig. 9 Ancestral states of the dorsal ligule of foliage leaves and ventral ligules of culm leaves inferred for the Poaceae subfamilies, using Maximum Likelihood (ML). Color codes for character states shown in the upper left corner. Notes: (i) gray circles indicate data with no information, and (ii) genera with unidentified species and no gray color indicates that all species in the genus have the same information.

Capítulo 2

Revisitando a morfologia e anatomia das lígulas de Poaceae

Revisiting the morphology and anatomy of ligules in Poaceae

Bruno Edson-Chaves; Lynn G. Clark; Gladys Flávia de A. Melo-de-Pinna

Para este capítulo seguiram-se as normas da revista *Annals of Botany*.

Resumo

- *Introdução e objetivos.* Em Poaceae, as lígulas mostram-se como uma estrutura vegetativa de grande valor taxonômico, podendo variar principalmente quanto à posição e morfologia. Dada a importância deste caráter, objetivamos compreender, sob um ponto de vista morfológico e anatômico, as lígulas de Poaceae, visando um melhor entendimento da diversidade estrutural deste caráter na família.
- *Métodos.* Foram coletadas folhas maduras contendo lígula de 18 espécies de oito subfamílias. O material foi dissecado e submetido às técnicas para análises anatômicas e observação em microscopia óptica e eletrônica de varredura.
- *Principais resultados.* 11, das 18 espécies, mostram alterações na tipologia da lígula registrada na literatura. Morfologicamente, o tipo de inserção da lígula também revela potencial diagnóstico. Anatomicamente, as lígulas variam em termos da região abaxial e marginal da lígula, do número de camadas do parênquima, da presença ou ausência de espaços intercelulares no parênquima, e da presença de esclerênquima e sistema vascular, este último não necessariamente associado com o estômato.
- *Conclusões.* O estudo inédito da morfologia e anatomia de todos os tipos de lígula registrados em Poaceae, sinaliza que esta estrutura é bastante diversa e que pode revelar novos caracteres com potencial diagnóstico para o grupo.

Palavras-Chave: Anatomia foliar, base foliar, clados BOP e PACMAD, gramíneas, morfologia vegetativa, *Streptochaeta spicata*.

Abstract

- *Background and Aims.* In Poaceae, the ligules are a vegetative structure of great taxonomic value, differing mainly in their position and morphology. Considering the importance of this character, we aimed to understand, under a morphological and anatomical point of view, the Poaceae ligules, aiming at a better understanding of the structural diversity of this character in the family.
- *Methods.* 18 species from eight subfamilies were collected and morphologically analyzed, the observed ligules were compared with literature records. Part of the developed ligule collected followed for anatomical analysis, after performing usual procedures in anatomy was carried out observation in optical and scanning microscopy.
- *Key Results.* 11, of the 18 species, showed changes in the ligule typology recorded in the literature. Morphologically, the type of ligule insertion also showed diagnostic potential. Anatomically, ligules vary in terms of the abaxial and marginal region of the ligule, the number of parenchyma layers, the presence or absence of intercellular spaces in the parenchyma, and the presence of sclerenchyma and vascular system, the latter not necessarily associated with the stomata.
- *Conclusions.* This first study about morphology and anatomy of all ligule types in Poaceae show its wide diversity, and add new characters with diagnostic potential to the family.

Key words: Leaf anatomy, Leaf base, BOP and PACMAD clade, grasses, morphological characters, *Streptochaeta spicata*.

INTRODUÇÃO

Poaceae é a quinta maior família de angiospermas do mundo, apresenta ampla distribuição (Gibson, 2009) e domina cerca de 20% da vegetação terrestre (Bresinsky *et al.*, 2012). Dada sua grande variação morfológica diversos caracteres são utilizados para a taxonomia, dos quais cerca de 20% representam caracteres vegetativos (Clayton *et al.*, 2016). Dentre estes, merecem destaque as características da região ligular, como: lígula, aurícula e colar.

No que concerne às lígulas, são estruturas taxonomicamente diagnósticas (Gibson, 2009) especialmente quando apenas ramos vegetativos estão disponíveis (Szabó *et al.*, 2006). Ocorrem na posição ventral (ocasionalmente dorsal) e com variação na morfologia/tipo (Edson-Chaves *et al.*, submetido). Devido à sua posição é conhecida como órgão de fronteira, ajudando a delimitar os domínios da bainha e lâmina foliar (Toriba *et al.*, 2019). Todavia, ainda pode ser considerada uma das estruturas mais negligenciadas do ponto de vista morfoanatômico.

Embora os aspectos morfológicos tenham sido sumarizados por Edson-Chaves *et al.* (submetido, cap.1) e existam alguns trabalhos sobre a anatomia das lígulas ao longo dos séculos XX e XXI (Arber, 1923; Philipson, 1935; Thi-Tuyet, 1968; Van Nan, 1971; Chaffey, 1982, 1983, 1984, 1985a, 1985b, 1985c, 1985d, 1985e, 1994, 2000; Sylvester *et al.*, 1990; Rudall & Buzgo, 2002; Szabó *et al.*, 2006), estes apresentam foco predominante nas lígulas do tipo *eciliate membrane*. Tal estrutura é descrita por Chaffey (2000) como apresentando um sistema de revestimento constituído por uma epiderme unisseriada sem estômatos e com faces adaxial e abaxial distintas, sendo a epiderme na face adaxial constituída por células ordinárias longas, enquanto a face abaxial é composta por diversos tricomas do tipo espinho e ganchos. Ainda de acordo com o autor, as lígulas *eciliate membrane* apresentam um parênquima clorofiliano com ausência de espaço intercelular, não são vascularizadas e o esclerênquima é ocasional.

Assim, neste trabalho são descritas a morfologia e anatomia das lígulas de espécies de oito subfamílias de gramíneas, visando uma melhor compreensão da diversidade estrutural deste caráter na família.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados indivíduos de 18 espécies, representando oito, das 12 subfamílias de Poaceae. Sendo amostrados uma espécie de Anomochlooideae, além de representantes dos dois principais clados de gramíneas: (i) clado BOP (Bambusoideae, Oryzoideae e Pooideae) e (ii)

clado PACMAD (Panicoideae, Aristidoideae, Choridoideae e Arundinoideae). As espécies selecionadas representam a diversidade dos tipos de lígulas descritas em diferentes subfamílias de Poaceae; sendo sete espécies com lígula do tipo membranosa (EM), quatro do tipo membranosa-ciliada (MC) e sete do tipo ciliada (FH) (tabela 1).

As descrições morfológicas das lígulas seguiram Clayton *et al.* (2016); todavia para padronização dos termos a tipologia da lígula adotada seguiu as descrições de Metcalfe (1960) e Longhi-Wagner *et al.* (2001) em que indicam que a lígula apresenta três tipos morfológicos, ou seja, os tipos *ciliolate membrane* e *ciliate membrane* foram descritos como do tipo membrano-ciliado. Neste aspecto, as lígulas membranosas não apresentam tricomas no ápice ou esses são muito diminutos e esparsos; membranosas-ciliada, com tricomas marginais de 1/3 a 2/3 do comprimento da lígula; e ciliadas, com tricomas maiores que 2/3 do comprimento total da lígula.

As espécies foram coletadas em estágio reprodutivo e vegetativo. As amostras férteis foram utilizadas para confecção de exsecatas e posterior registro nos herbários da Universidade Federal do Ceará (EAC) ou da Universidade de São Paulo (SPF). As que se apresentavam em fase vegetativa foram utilizadas para estudo de morfologia externa e análises anatômicas; neste caso, foram fixadas em etanol 70% (Jensen, 1962) com glicerina 4:1. Para a análise morfológica da região ligular, duas folhas de três indivíduos de cada espécie foram selecionadas e fotografadas em microscópio estereoscópio.

Para as análises anatômicas, amostras foliares do 3º ao 5º nó visível a olho nu foram fixadas em etanol 70% (Jensen, 1962) com glicerina 4:1 posteriormente, desidratadas em série butílica terciária crescente (70 – 85 – 95 – 100, 48h cada etapa, no vácuo), e colocada em uma solução de butanol terciário P.A (24h), seguida da etapa de butanol terciário P.A. e óleo mineral (1:1) (24h) e submetidas a inclusão de paraplást (Ruzin, 1999, adaptado). Amostras de *Arundo donax* L. e *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone antes do processo de desidratação em série butílica terciária foram amolecidas com Etilenodiamina 10% (Kraus & Arduim, 1997) por cinco minutos em estufa a 60°C.

Secções transversais (10 a 15µm) e longitudinais (10 a 12µm) de folhas maduras/desenvolvidas foram realizadas em micrótomo rotativo (Reihert-jung Auto Cut 2040), coradas com azul de astra 1% aquoso (40 minutos) e fuscina básica 1% etanólica (20 minutos), em seguida montadas em lâminas permanentes em verniz vitral incolor 500® (Acrilex, São Paulo, Brazil) (Paiva *et al.*, 2006). O registro fotográfico foi realizado através do Sistema de Digitalização de Imagem IM50 acoplado ao microscópio Leica DMLB do Laboratório de Anatomia Vegetal IB/USP.

Para análise em microscopia eletrônica de varredura o material vegetal foi desidratado em série acetônica crescente, seguida de série etanol e acetona (3:1, 1:1 e 1:3, acetona 100%) em intervalos de 2 horas cada um, secos ao ponto crítico de CO₂, montados em “stubs” e cobertos com ouro por dois minutos e, posteriormente, examinado em microscópio eletrônico de varredura. A observação foi realizada em Microscópio Zeiss (DSM 940), pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB/USP.

Foi adotada a terminologia anatômica para gramíneas de Ellis (1976, 1979) e a nomenclatura morfológica da lígula seguiu Chaffey (1984). Para detalhar os padrões de morfologia externa, bem como as etapas de separação da lígula da interface bainha-lâmina foliar, foi utilizado o editor gráfico Inkscape versão 1.1 (Inkscape Project, 2021).

RESULTADOS

Morfologia da região ligular

A maioria das espécies estudadas apresenta bainha aberta, lígula e lâmina foliar bem distintas (Figuras 1 e 2), com exceção para *Streptochaeta spicata* (Anomochlooideae) que apresenta ápice da bainha ciliado e elevada densidade de macrotricomas, sem a presença de lígula (Figura 1A e 2U-V).

Os tipos de lígula descritos para cada uma das espécies estudadas foram sumarizados e comparados com os dados do Grassbase e das principais literaturas do grupo, demonstrando diferentes interpretações em 11 espécies, como pode ser visto na Tabela 2.

As principais divergências foram de espécies originalmente descritas com lígula membranosa-ciliada (CiM ou CM), consideradas na literatura como do tipo *a fringe of hairs*, e espécies com lígula membranosa, as quais foram descritas como do tipo membranosa-ciliada. Além disso, é importante destacar que, sob microscopia eletrônica de varredura (Figura 1), independentemente do tipo de lígula observamos uma base membranosa, sendo que esta ocupa mais de 90% do comprimento total nas lígulas membranosas e menos de 10% em lígulas ciliadas.

No clado BOP, os representantes de Bambusoideae apresentam lígula membranosa-ciliada. No entanto, *Phyllostachys aurea* apresenta macrotricomas curtos e longos na margem, sendo mais comum este último (Figura 1B), *Raddia brasiliensis*, por sua vez, possui macrotricomas curtos (Figura 1C, 2C). *Oryza sativa* (Figura 1D), *Bromus brachyanthera* (Figura 1E) e *Holcus lanatus* (Figuras 1F-F”) apresentam lígula membranosa; todavia, *H. lanatus* com macrotricomas curtos e marginais.

No clado PACMAD, *Arundo donax* (Figura 1G-G') apresenta macrotricomas curtos e marginais, em face da densidade desses tricomas a lígula desta espécie pode ser descrita como do tipo membranosa-ciliada. As duas espécies de *Aristida* (Figura 1H-I'') possuem lígula ciliada com macrotricomas longos em *A. longifolia* (Figura 1H e 2R) e curtos em *A. setifolia* (Figura 1I'-I'' e 2S). Panicoideae apresenta espécies com lígula membranosa (*Paspalum maritimum* e *Trachypogon spicatus* - Figura 1J-K), membranosa-ciliada com macrotricomas curtos (*Setaria sulcata* - Figura 1O') ou ciliada com macrotricomas longos em *Cenchrus purpureus* (Figura 1L), *Echinoalaena inflexa* (Figura 1M) e *Melinis repens* (Figura 1N). Por fim, as espécies de Chloridoideae apresentam lígulas membranosas-ciliadas com macrotricomas marginais longos (*Dactyloctenium aegyptium* - Figura 1P) ou curtos (*Eleusine indica* - Figura 1Q'); em *Sporobolus virginicus* (Figura 1R-R') a lígula é ciliada com macrotricomas curtos.

Diferentes padrões de inserção da lígula foram observados (Tabela 3 e Figura 2): 1) arco convexo simétrico (Ex. *Arundo donax*, *Bromus brachyanthera*, *Echinoalaena inflexa* e *Melinis repens* – Figuras 2A-2D), 2) arco côncavo simétrico, podendo ou não ter lígula externa (Ex. *Phyllostachys aurea*, *Trachypogon spicatus* e *Setaria sulcata* – Figuras 2E-2J), 3) arco convexo assimétrico (Ex. *Aristida setifolia*, *Dactyloctenium aegyptium*, *Eleusine indica*, *Holcus lanatus*, *Paspalum maritimum* e *Sporobolus virginicus* – Figuras 2K-2P), 4) arco côncavo assimétrico (Ex. *Raddia brasiliensis* – Figuras 2Q-2R), 5), duplo arco convexo (Ex. *Aristida longifolia* e *Cenchrus purpureus* – Figuras 2S-2T), 6) e duplo arco côncavo (Ex. *Oryza sativa* e *Setaria sulcata* – Figuras 2U-2V). Dessas, *Setaria sulcata* é a única que possui mais de uma tipologia de inserção.

Morfologicamente (Figura 2), independentemente do tipo de lígula, é comum observar a lígula na interface bainha-lâmina foliar; exceto nas espécies com pseudopecíolo, como *Phyllostachys aurea*, *Raddia brasiliensis* e *Setaria sulcata* em que a lígula não se encontra na interface bainha-lâmina foliar, mas no ápice da bainha. Vale frisar que as amostras analisadas de *Setaria* podem apresentar ou não pseudopecíolo, como supracitado.

Ainda no que concerne aos aspectos morfológicos da região ligular, outras estruturas foram observadas. A lígula externa nas folhas do ramo foi relatada apenas para *Phyllostachys aurea* (Figura 1B' e 2Q), mostrando-se como uma linha de tricomas; o pseudopecíolo é observado nos representantes de Anomochlooideae (Figura 1A e 2W-X), Bambusoideae (Figuras 1B-C e 2I-J) e em *Setaria sulcata* (Panicoideae) (Figura 1O e 2H); e a aurícula foi observada em diversas espécies, com destaque para *Oryza sativa* com duas aurículas eretas (Figuras 1D e 2U) e *Phyllostachys aurea* com aurículas fimbriadas (Figuras 1B e 2I).

Anatomia das lígulas desenvolvidas

As lígulas de todas as espécies apresentam-se curvadas em forma de U. Contudo, durante o processo de separação da lígula da interface bainha-lâmina foliar (individualização) há diferentes padrões (Figura 3) e estes estão relacionados ao tipo de inserção da lígula.

- (i) Inserções do tipo I (Figura 3A): a lígula se individualiza da margem para o centro de modo mais ou menos simultâneo, com separação total na região mediana da nervura central ou próximo a esta.
- (ii) Inserções do tipo II (Figuras 3B-C): a lígula se individualiza do centro para a margem.
- (iii) Inserções do tipo III (Figura 3D): a lígula se individualiza da margem para o centro, porém não ocorre de modo simultâneo. A separação total ocorre em uma das alas da lâmina foliar.
- (iv) Inserções do tipo IV (Figura 3E): a lígula se individualiza de uma região próxima ao centro em direção às margens.
- (v) Inserções do tipo V (Figura 3F): a lígula se individualiza da margem para o centro de modo mais ou menos simultâneo e, ao mesmo tempo, do centro para a margem.
- (vi) Inserções do tipo VI (Figura 3G): a lígula se individualiza a partir de duas regiões próximas ao centro em direção às margens.

Anatomicamente, em todos os tipos de lígula, a estrutura apresenta epiderme uniestratificada, recoberta por cutícula em ambas as faces. Em secção transversal, as células epidérmicas comuns (CEC) da face adaxial são retangulares e achatadas; enquanto as CEC da face abaxial apresentavam formato quadrado (p.ex Figuras 4E, 4K e 4W) ou alongado (p. ex Figuras 4D, 4S e 4V), sendo as primeiras mais comuns em lígulas membranosas e membranosas-ciliadas e as últimas em lígulas ciliadas. CEC lignificadas são observadas em ambas as faces da lígula de *Trachypogon spicatus* (Figura 4F), especialmente na face abaxial. Papilas são observadas apenas na face abaxial da lígula de *Oryza sativa* (Figura 1D’).

Tricomas ocorrem na margem da lígula independentemente do tipo de lígula (como comentado anteriormente). Contudo, em lígulas membranosas ou membranosas-ciliadas foram percebidos apenas na face abaxial da epiderme. Neste caso, em espécies com lígula membranosas, são vistos macrotricomas, microtricomas e tricomas do tipo espinho em *Holcus lanatus* (Figura 1F’’ e 4B) e *Oryza sativa* (Figura 1D’); microtricomas em *Oryza sativa* (Figura 1D’); e tricomas do tipo gancho em *Trachypogon spicatus* (Figura 1K’).

Nas espécies com lígulas membranosas-ciliadas, a face abaxial apresenta macrotricomas longos em *Dactyloctenium aegyptium* e *Setaria sulcata* (Figura 4J), macrotricomas curtos em

Arundo donax (Figura 4H) e *Eleusine indica* (Figura 4N), e tricomas do tipo gancho em *Phyllostachys aurea* (Figura 4L) e *Raddia brasiliensis*.

O número de camadas do tecido parenquimático na porção mediana da lígula já individualizada varia dentre as espécies, considerando a mesma região da lígula, podendo ter de 1-3 camadas, como em *Aristida longifolia*, *Aristida setifolia*, *Arundo donax*, *Bromus brachyanthera*, *Dactyloctenium aegyptium*, *Echinolaena inflexa*, *Holcus lanatus*, *Melinis repens*, *Paspalum maritimum* e *Sporobolus virginicus*; 3-7 camadas, em *Eleusine indica*, *Oryza sativa*, *Phyllostachys aurea* (Figura 4F), *Setaria sulcata* e *Trachypogon spicatus*; ou 7-12 camadas em *Raddia brasiliensis* e *Cenchrus purpureus*. Esta região pode apresentar raros espaços intercelulares em espécies de lígulas membranosa (*Oryza sativa* e *Trachypogon spicatus*), membranosa-ciliada (*Arundo donax*, *Eleusine indica*, *Phyllostachys aurea*, *Raddia brasiliensis* e *Setaria sulcata*), ou ciliada (*Aristida longifolia*, *Aristida setifolia*, *Cenchrus purpureus* e *Echinolaena inflexa* – Figura 4U). Esclerênquima associado ao tecido parenquimático é observado em cordões de feixes vasculares (p. ex. *Oryza sativa* – Figura 4C) ou como uma faixa contínua na face abaxial (p. ex. *Trachypogon spicatus* - Figura 4F), podendo ocorrer nas espécies de lígula membranosa (Figuras 4C e 4F) e membranosa-ciliada (Figura 4I).

Feixes vasculares colaterais são observados em espécies com lígula membranosa (*Oryza sativa* - Figuras 3G e 4C; e *Trachypogon spicatus* - Figura 3B) ou membranosa-ciliada (*Phyllostachys aurea* - Figuras 3C e 4L-4M), contínuos aos feixes da bainha. Em *O. sativa* e *P. aurea*, os feixes ocorrem ao longo do eixo próximo-distal e centro-lateral da lígula. Já em *T. spicatus*, os feixes vasculares estão restritos aos bordos da lígula (Figura 3B). Os bordos de todas as lígulas são comumente afilados/acuminados, podendo ser revolutos em *Cenchrus purpureus*, *Echinolaena inflexa* (Figura 4W), *Paspalum maritimum* (Figura 4G) e *Setaria sulcata*.

DISCUSSÃO

Edson-Chaves *et al.* (submetido, cap.1) destacam que as lígulas podem ser classificadas principalmente quanto à sua posição, morfologia e variações dentro da mesma espécie. Todavia, dada a variação morfológica das lígulas, em especial as membranosas, outras classificações foram utilizadas, como: comprimento (Dahlgren *et al.*, 1985; Klapp, 1987), embora este deva ser usado com cuidado; vascularização (Chaffey, 1984; 1985a); consistência,

indumento, cor, forma e margem da lígula (Looman, 1982; Klapp, 1987; Mitidieri, 1992; Clayton *et al.*, 2006; Gandhi *et al.*, 2016; Ibrahim *et al.*, 2016).

No que se refere à morfologia da lígula, a margem pode variar intraespecificamente, como é constatado em trabalhos com *Sorghum vulgare* (Artschwager, 1948), porém o tipo de lígula se mantém constante na espécie. No que diz respeito à classificação da tipologia das lígulas das espécies estudadas, 11 espécies apresentam divergências com o descrito na literatura consultada. Destacamos a necessidade de um olhar mais atento para essa questão, buscando uma melhor identificação das diferentes morfologias, especialmente membranosa e membranosa-ciliada e entre a membranosa-ciliada e ciliada. Tal acurácia mostra-se fundamental, podendo gerar, inclusive, novas interpretações evolutivas do caráter. No que concerne a *Streptochaeta spicata*, morfologicamente e anatomicamente é identificada como uma espécie de lígula ausente; todavia, são necessários estudos de desenvolvimento para verificar se tal espécie não apresenta lígula ou se esta mostra-se latente, conforme a proposta Thi-Tuyet (1968) para *Echinochloa*.

Não foram observadas na literatura descrições da variação da inserção da lígula. Considerando que a lígula provê um dos melhores caracteres vegetativos para identificação (Copple & Pase, 1967), possuindo grande importância para a taxonomia de Poaceae (Moul, 1973, Tzvelev, 1989; Hubbard, 1992; Longhi-Wagner *et al.*, 2001; Gandhi *et al.*, 2016), a observação e inclusão deste caráter poderia auxiliar a distinguir as espécies, poderia inclusive ser usado em chaves de identificação de caracteres vegetativos ou exclusivamente ligulares, como nos trabalhos de Pechanec (1936), Klapp (1987), Pathak *et al.* (2013) e Ibrahim *et al.* (2016). Destaca-se ainda que mostra-se mais conservado entre as diferentes folhas do indivíduo, podendo ser usado com mais segurança na distinção das espécies que outras classificações para a lígula (p.ex.: comprimento, cor, forma e indumento) uma vez que tem relação direta com a formação e crescimento da lígula (ver figura 3).

Dos tipos de inserção, o arco convexo assimétrico foi o tipo mais observado. Vale destacar que as tipologias apresentadas, independem da morfologia da lígula; isso fica evidente ao observar os tipos I (arco convexo simétrico) e II (arco convexo assimétrico) que apresentam espécies com lígulas membranosas, membranosas-ciliadas e ciliadas; como também independem do grupo taxonômico, uma vez que espécies da mesma subfamília ou do mesmo gênero apresentam tipos diferentes.

Quanto aos padrões de individualização das lígulas, embora em trabalhos anteriores não haja denominações e descrições para tais padrões, é possível identificá-los nas imagens, de modo que o tipo I também foi percebido em *Poa pratensis* L. (Szabó *et al.*, 2006),

Arrhenatherum avenaceum var. *bulbosum* (Willd.) Hartm. [*Arrhenatherum elatius* subsp. *bulbosum* (Willd.) Schübl. & G. Martens] e *Hordeum vulgare* L.; e o tipo III em *Gracilea royleana* Hook.f. [syn. *Melanocenchris jacquemontii* Jaub. & Spa] e *Triticum vulgare* Vill. [*Triticum aestivum* L.] (Aber, 1923). Esta autora, ainda mostra que em *Nardus stricta* L. é observado que a individualização da lígula pode ocorrer unilateralmente, ou seja, de um lado da lâmina ao outro; embora a autora sugira que pode ser a obliquidade da secção, discordamos, pois essa tipologia também aparece em *Oryza breviligulata* A.Chev. & Roehr. (syn. *Oryza barthii* A.Chev.) (Thi-Tuyet, 1963). Assim sendo, é possível que a individualização unilateral poderia constituir um tipo VII, diferente dos apresentados nas espécies estudadas neste trabalho.

Quanto ao aspecto geral da lígula, embora seja comum bordos afilados/acuminados, o formato revoluto também foi constatado em *Oryza breviligulata* (syn. *Oryza barthii*) (Thi-Tuyet, 1963), *Deschampsia cespitosa* (L.) P.Beauv. (Philipson, 1935). Para Chaffey (1984), a anatomia das lígulas auxilia na identificação das espécies, e acrescenta novos conjuntos de caracteres nas relações filogenéticas das espécies. Dessa forma, os caracteres levantados constituem um campo relativamente inexplorado de um ponto de vista taxonômico. Neste sentido, os dados de margem têm potencial valor taxonômico, visto que apresenta variações entre as espécies, revoluto em *Cenchrus purpureus*, *Echinoalaena inflexa*, *Paspalum maritimum* e *Setaria sulcata* e afilado nas demais espécies analisadas; e, aparentemente, não apresenta variação intraespecífica.

Dada a variedade estrutural das lígulas, Chaffey (1994) destaca que a única característica em comum das lígulas é uma estrutura tripartida, ou seja, epiderme unisseriada limitando um parênquima de preenchimento; tal característica também foi observada nas espécies em estudos, uma vez que é comum variações nos tipos de tricomas, presença ou ausência de espaços intercelulares no tecido parenquimático, esclerênquima e sistema vascular.

Anatomicamente as lígulas apresentam face adaxial e abaxial da epiderme bem distintas, com a face abaxial mais variável que a superfície adaxial, conforme também é relatado por Szabó *et al.* (2006). Isto acontece devido às variações no contorno das células epidérmicas comuns e à presença de tricomas. A epiderme mostra-se uniestratificada revestida por uma cutícula, conforme também ressaltado nos trabalhos de Chaffey (1985b, 1985c, 1994, 2000). O formato das células epidérmicas na face adaxial auxilia na curvatura da lígula, especialmente quando túrgidas, enquanto as células epidérmicas alongadas da face abaxial promovem uma estreita pressão contra a folha e o caule, além disso é comum a existência de tricomas com função de defesa (Chaffey, 2000).

Tricomas do tipo espinho na face abaxial das lígulas foram encontrados em 22 das 49 espécies de gramíneas estudadas por Chaffey (1994). Por sua vez, tricomas dos tipos microtricoma e espinho em *Oryza sativa* foram ressaltados por Chaffey (1983) e Mursyidin *et al.* (2021); e ganchos (Chaffey, 1984) e espinhos (Szabó *et al.*, 2006) foram observados em diferentes espécies de *Poa*.

A presença de tricomas é comum na porção membranosa de lígulas membranosas e membranosas-ciliadas (p. ex. *Holcus lanatus*, *Oryza sativa*, *Trachypogon spicatus*, *Dactyloctenium aegyptium*, *Arundo donax*, *Setaria sulcata*, *Eleusine indica*, *Phyllostachys aurea* e *Raddia brasiliensis*); todavia estes podem variar quanto ao tipo e densidade a depender da espécie. Vale destacar que variações na densidade também podem ser intraespecíficas como ocorre em variedades de *Oryza sativa* (Mursyidin *et al.*, 2021). Por outro lado, em lígulas ciliadas foi comum a presença de macrotricomas longos tanto na porção membranosa da lígula quanto na região marginal, excetuando-se em *Sporobolus virginicus*. É possível que a presença de macrotricomas curtos nesta espécie esteja relacionado com a estrutura da folha que, nesta espécie, é estreita e curta, além de apresentar uma bainha que fortemente envolve o colmo.

A região marginal da lígula pode apresentar diferentes morfologias (Jacques & Plessis, 1950; Das *et al.*, 2008), podendo apresentar inclusive papilas (Chaffey, 1985c); todavia, pelas fotografias apresentadas no trabalho de Chaffey (1985c), acreditamos que se trata de espinhos e/ou macrotricomas curtos, semelhantes aos visualizados na margem de algumas espécies com lígula membranosas (*Holcus lanatus*) e membranosas-ciliadas (*Arundo donax*, *Phyllostachys aurea*, *Raddia brasiliensis* e *Setaria sulcata*). A presença de papilas só foi observada na face abaxial da lígula de *Oryza sativa*, aparentemente mostra-se como uma característica da espécie já que papilas também foram observadas nas lígulas de diferentes variedades de arroz estudadas por Mursyidin *et al.* (2021).

Chaffey (1982) destaca que os estômatos, quando presentes, estão associados a espécies que apresentam sistema vascular. Contudo, não encontramos esta relação, uma vez que mesmo nas espécies que apresentam sistema vascular não observamos estômatos. Para Chaffey (1982) não encontrar estômatos nas amostras não significa que não existam, uma vez que estes são uma característica que pode variar dentro de uma mesma espécie.

Nos trabalhos realizados por Chaffey (1994, 2000), a lígula foi descrita como uma estrutura com estômatos ausentes, o que diferenciaria da bainha e da lâmina foliar. Entretanto, estômatos foram observados nas lígulas de *Agrostis gigantea* Roth., *Agrostis stolonifera* L., *Alopecurus pratensis* L., *Holcus lanatus* L., *Holcus mollis* L., *Phleum pratense* L., *Phalaris arundinacea* L., *Dactylis glomerata* L., *Poa trivialis* L. (Chaffey, 1985e) e *Oryza sativa*

(Chaffey, 1983), podendo estar presentes ou ausentes a depender da variedade de arroz (Mursyidin *et al.*, 2021). Chaffey (1983) ressalta ainda que estas diferenças se devam a diferentes graus de complexidade estrutural da lígula, e que mesmo que não tenham sido visualizadas em todas as lígulas examinadas, não haveria razão para acreditar que não estivessem presentes. Tais fatos demonstram que esses não possuem um caráter anatômico determinante para identificar a lígula, podendo estar presente ou ausente a depender da amostra da lígula, espécie e/ou da variedade. É possível que esta seja a razão para não terem sido observados estômatos nas amostras de *Holcus lanatus* analisadas, diferindo do que foi observado por Chaffey (1985e).

Por outro lado, o número de camadas do tecido parenquimático de preenchimento tende a variar de acordo com a posição do seccionamento da amostra; todavia mesmo nas regiões mais próximas da interface bainha-lâmina foliar tem-se registrado até cinco células (Chaffey, 1985c), como também registrado nas espécies em estudo, com dez espécies apresentando entre 1-3 camadas de parênquima (principalmente as que apresentam lígulas ciliadas) e cinco entre 3-7 camadas. Todavia, *Raddia brasiliensis* e *Cenchrus purpureus* apresentam lígula constituídas por 7-12 camadas de parênquima.

É possível que, nestas espécies, o maior número de camadas auxilie na fotossíntese ou defesa da bainha por meio de atividades secretoras das células do parênquima, tendo em vista que estas funções já foram relatadas para as lígulas por Chaffey (1985b; 2000); além disso, também poderia apresentar uma área superficial maior para o desenvolvimento de uma rica microbiota que pode estar associada a “*some contribution to the nitrogen economy of their host plant*” (Birkby & Peerce, 1987, p. 510). Quanto aos espaços intercelulares no parênquima, embora Chaffey (1994) afirme que tal característica está ausente em lígulas, concordamos com Hinton & Bacon (1985) que cita a presença de espaços intercelulares descontínuos no parênquima da lígula de *Festuca arundinacea* Schreber, assim como em muitas das espécies estudadas neste trabalho (p. ex. *Trachypogon spicatus*, *Eleusine indica* e *Echinochloa inflexa*), não sendo, assim, uma característica distintiva da lígula em relação a bainha e lâmina foliar.

A presença de feixes vasculares observados nas lígulas desenvolvidas (*Oryza sativa*, *Phyllostachys aurea* e *Trachypogon spicatus*), indicam que a diferenciação estrutural do tecido vascular ocorre durante ou após o alongamento da lígula, ou seja, ocorre após o estabelecimento do estágio tardio de desenvolvimento das lígulas. Corroborando Philipson (1935, p. 316) em que “*transverse strands interconnecting the nerves of the sheath begin to develop soon after the formation of the ligule*”. Entretanto, não é comum na literatura aspectos sobre a vascularização

das lígulas de modo que é pouco conhecido se a vascularização ocorre apenas na base ou em toda a sua extensão, especialmente nas lígulas membranosas-ciliada.

Ainda no que concerne à vascularização, os feixes podem ser distribuídos por toda a região ligular (*Oryza sativa* e *Phyllostachys aurea*) ou marginais/restritos aos bordos (*Trachypogon spicatus*). Essa diferença já tem sido retratada na literatura, por exemplo, lígulas de *Agrostis gigantea* e *Dactylis glomerata* apresentam feixes mediantos, enquanto *Agrostis stolonifera* e *Phalaris arundinacea* feixes marginais (Chaffey, 1985e). Embora esta distribuição apresenta-se, aparentemente, como uma característica genética, ainda são necessários estudos sobre o sistema vascular de lígulas para entender o fato de algumas espécies se mostrarem heterovascularizadas.

Chaffey (2000) lamenta que a literatura não distingue entre lígulas membranosas (que para o autor são sinônimos de não vascularizadas) e vascularizadas, e caracteriza a lígula como uma estrutura que não apresenta feixes vasculares. Edson-Chaves *et al.* (submetido, cap.1) porém, sugere uma nova interpretação em que as espécies podem ser descritas como: (i) não vascularizada, (ii) vascularizada, que pode ser dividida em homovascularizada, cujas lígulas são todas vascularizadas, e heterovascularizadas, cujas lígulas podem ter vascularização presente ou ausente. Em nossas análises, das 17 espécies que apresentam lígula, apenas em 3 (três) foram observados feixes vasculares, *Oryza sativa* e *Trachypogon spicatus* (lígulas membranosas) e *Phyllostachys aurea* (lígula membranosas-ciliada). Uma proporção ligeiramente maior é observada no trabalho de Chaffey (1985e), em que das 56 espécies com lígulas heteroliguladas examinadas, que correspondem morfológicamente ao tipo membranosas, apenas 15 são vascularizadas.

Concordamos com Mauseth (1988) ao definir lígulas como estruturas vascularizadas ou não; sendo que as vascularizadas são incomuns e é possível que a vascularização ocorra somente em lígulas membranosas ou membranosas-ciliadas, pois sua porção membranosas apresenta uma fase de crescimento e individualização mais duradoura em comparação com lígulas ciliadas. A presença de feixes vasculares contínuos com a bainha, como observado nas espécies deste trabalho, também foi observada na variedade de *Oryza sativa* estudada por Thi-Tuyet & Cusset (1966) e Chaffey (1983); tal fato reforça a ideia de que a lígula é uma extensão do ápice da bainha.

Todavia, devido ao comprimento de alguns tipos de lígulas só seccionamos o material até alguns milímetros após a individualização da lígula da lâmina foliar, sendo necessário um seccionamento completo para verificar até que momento da lígula há a diferenciação do esclerênquima e do tecido vascular. Se ocorre apenas na base, ou até a porção mediana e ápice

da lígula, especialmente em lígulas membranosas-ciliadas em que não apresenta muitos dados a este respeito.

Por fim, no tocante aos aspectos morfológicos das lígulas externas, dados de Edson-Chaves *et al.* (submetido, cap.1) relatam que esta é uma característica comum em Bambusoideae, ocorrendo em cerca de 1/3 de seus representantes; no entanto, na reconstrução do caráter ancestral realizado por estes autores, *Phyllostachys aurea* é relatada com lígula externa ausente. Assim como citado anteriormente para as tipologias das lígulas ventrais, acreditamos que a descrição correta das lígulas externas seja mais uma característica que deva ter maior atenção nas descrições da base de dados, uma vez que na região do colar de *Phyllostachys aurea* há uma estrutura muito semelhante a uma lígula ciliada curta, todavia é mais facilmente vista por estudos anatômicos. Este ponto de vista também é compartilhado por Van Nan (1971) ao afirmar que mesmo em casos em que o exame morfológico externo possa levar a crer que a lígula dorsal esteja ausente é necessário ser confirmado por estudos anatômicos (“*dans tous les cas où un examen morphologique externe pourrait faire croire it l'absence de ligule dorsale, une étude anatomique permet de reconnaître l'existence d'un soubassement ligulaire*”, p. 643). Anatomicamente a lígula externa de *Phyllostachys aurea* mostra-se semelhante a uma lígula ventral ciliada, com uma porção membranosa curta e grande quantidade de tricomas.

CONCLUSÃO

Os dados indicam que 11, das 18 espécies, apresentam mudanças na tipologia de lígula registrada na literatura demonstrando que, em Poaceae, este caráter precisa ser melhor estudado. Diferente do que foi relatado na literatura até o momento, a lígula apresenta grande variação estrutural, principalmente no que se refere: à posição da lígula na interface bainha/lâmina foliar; à inserção na bainha (em, pelo menos, seis diferentes padrões); ao bordo (afilado ou revoluto); ao indumento da face abaxial e da região marginal, número de camadas do parênquima de preenchimento; a presença ou ausência de espaços intercelulares no parênquima e a presença de esclerênquima e sistema vascular, este último não necessariamente associado a estômatos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores que auxiliaram na coleta e identificação do material vegetal, bem como aos técnicos do Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Process 2019/15195-8 to GFMP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Productivity Grant Process 303962/2019-4 to GFMP and 170871/2017-7 to BEC). Além disso, os autores não têm interesses financeiros ou não financeiros relevantes a divulgar

LITERATURA CITADA

- Arber A. 1923. Leaves of the Gramineae. *Botanical Gazette* 76: 374-388.
- Artschwager E. 1948. Anatomy and morphology of the vegetative organs of *Sorghum vulgare*. USDA Technical Bulletin, 951-975.
- Birkby KM, Peerce TF. 1987. The ligules of green leaves of cock's-foot grass, *Dactylis glomerata* L., are a micro-habitat for bacteria and fungi. *Journal of Applied Bacteriology* 63: 505-511.
- Bresinsky A, Körner C, Kadereit J, Neuhaus G, Sonnewald U. 2012. *Tratado de Botânica de Strasburger*, 36^a ed. Porto Alegre: Artmed.
- Chaffey NJ. 1982. Presence of Stomata-like Structures in the Ligule of *Agrostis gigantea* Roth. *Annals of Botany* 50: 717-720.
- Chaffey NJ. 1983. Epidermal Structure in the Ligule of Rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany* 52: 13-21.
- Chaffey NJ. 1984. Epidermal structure in the ligules of four species of the genus *Poa* L. (Poaceae), *Botanical Journal of the Linnean Society* 89: 341-354.
- Chaffey NJ. 1985a. Structure and Function in the Grass Ligule: Presence of Veined and Membranous Ligules on the Same Culm of British. *New Phytologist* 101: 613-621

- Chaffey NJ. 1985b. Structure and Function in the Grass Ligule: Structure and Function in the Grass Ligule: the newly-initiated ligule of *Lolium temulentum* L., a light and electron microscope study. *Annals of Botany* 55: 525-534.
- Chaffey NJ. 1985c. Structure and Function in the Grass Ligule: Optical and Electron Microscopy of the Membranous Ligule of *Lolium temulentum* L. *Annals of Botany* 55: 65-75.
- Chaffey NJ. 1985d. Structure and function in the grass ligule: the membranous ligule of *Lolium temulentum* L. as a secretory organ. *Protoplasma* 127: 128-132.
- Chaffey NJ. 1985e. Structure and Function in the Grass Ligule: Presence of Veined and Membranous Ligules on the Same Culm of British Grasses. *New Phytologist* 101: 613-621.
- Chaffey NJ. 1994. Structure and function of the membranous grass ligule: a comparative study. *Botanical Journal of the Linnean Society* 116: 53-69.
- Chaffey NJ. 2000. Physiological anatomy and function of the membranous grass ligule. *New Phytologist* 146: 5-21.
- Chen CH, Lin CY, Kuoh CS. 2011. *Grass flora of Taiwan: Phaoideae, Ehrhartoideae, Poideae, Centothecoideae, Arundinoideae, Aristidoideae, Chloridoideae*. Chichi, Taiwan: Endemic Species Research Institute.
- Chen CH, Lin CY, Kuoh CS. 2014. *Grass flora of Taiwan: Panicoideae*. Chichi, Taiwan: Endemic Species Research Institute.
- Clayton, W.D., M. S. Vorontsova, K. T. Harman, & H. Williamson. 2006 onwards. GrassBase - The Online World Grass Flora. Available in <<http://www.kew.org/data/grasses-db.html>>. Access on 17 Ago 2019.
- Copple RF, Pase CP. 1967. *A Vegetative Key to Some Common Arizona Range Grasses*. Fort Collins: Forest Service, U. S. Department of Agriculture.
- Dahlgren RMT, Clifford HT, Yeo PF. 1985. *The families of the monocyledons: structure, evolution and taxonomy*. Berlin: Springer-Verlag.
- Das M, Bhattacharya S, Singh P, Filgueiras TS, Pal A. 2008. Bamboo Taxonomy and Diversity in the Era of Molecular Markers. *Advances in Botanical Research* 47: 225-268.
- Duistermaat H. 2005. Field Guide to the Grasses of Singapore (Excluding the Bamboos). *The Gardens' Bulletin Singapore* 57: 1-177.
- Edson-Chaves B, Silva OLM, Clark LG, Melo-de-Pinna, GFA. 2022 (submetido). The ligule in Poaceae: a historical and evolutionary review. *Botanical Review*.
- Ellis RP. 1976 A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in Poaceae. I. The leaf-blade as viewed in transverse section. *Bothalia* 12: 65-69

- Ellis RP. 1979. A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in Poaceae. II. The epidermis as seen in surface view. *Bothalia* 12: 641-671
- Filgueiras TS. 2021. *Gramíneas do Cerrado*. Rio de Janeiro: IBGE.
- Fish L, Mashau AC, Moeaha MJ, Nembudani MT. 2015. *Identification guide to Southern African grasses: an identification manual with keys, descriptions and distributions*. Pretoria: South African National Biodiversity Institute.
- Gandhi D, Albert S, Pandya N. 2016. *Handbook on the morphology of common grasses: identification and characterization of caryopses and seedlings*. Oakville: Apple Academic Press.
- Gibson DJ. 2009. *Grasses and Grassland Ecology*. Nova York: Oxford University Press.
- Hagenbuch KW, Lemke DE. 2015. Grasses of the Texas Hill Country: Vegetative key and descriptions. *Phytoneuron* 4: 1–93.
- Hinton DM, Bacon CW. 1985. The distribution and ultrastructure of the endophyte of toxic tall fescue. *Canadian Journal of Botany* 63: 36-42.
- Hubbard CE. 1992. *Grasses: a guide to their structure, identification, uses and distribution in the British Isles*, 3^a ed. London: Penguin Books.
- Ibrahim KM, Hosni HA, Peterson PM. 2016. *Grasses of Egypt*. Washington D.C.: Smithsonian Institution Scholarly Press.
- Inkscape Project (2021). Inkscape v1.1.2. <https://inkscape.org/>.
- Jacques J, Plessis Y. 1950. Note préliminaire sur l'histologie des ligules de graminées. *Comptes rendus hebdomadaire des séances de l'Académie de Sciences* 231, 163-165.
- Jensen WA. 1962. *Botanical histochemistry: principles and practices*. São Francisco: W. H. Freeman.
- Judziewicz EJ and collaborators. 1990. Poaceae (Gramineae). In: Görts-Van Rijn ARA, ed. *Flora of the Guianas*. Koenigstein: Koeltz Scientific Books.
- Klapp E. 1987. *Manual de las gramíneas*, 11^a ed. 11. Barcelona: Omega.
- Kraus JE, Arduin M. 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Seropédica: EDUR.
- Longhi-Wagner HM, Bittrich V, Wanderley MGL, Shepherd GJ. 2001. Poaceae. In: Wanderley MGL, Shepherd GJ, Giullietti AM, eds. *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo 1*. São Paulo: FAPESP/Hucitec, 1-291.
- Longhi-Wagner, HM, Todeschini, BH. 2004. Flora de grão-mogol, Minas Gerais: Gramineae (Poaceae). *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, 22: 143-165.

- Looman J. 1982. *Prairie grasses: identified and described by vegetative characters*. Ottawa: Minister of Supply and Services Canada.
- Mauseth JD. 1988. *Plant anatomy*. San Francisco: The Benjamin Cummings Publishing Company.
- Metcalfe CR. 1960. *Anatomy of the monocotyledons: I Gramineae*. New York: Clarendon Press.
- Mitideri J. 1992. *Manual de Gramíneas e leguminosas para pastos tropicais*, 2ª ed. São Paulo: Nobel e EdUSP,
- Moul ET. 1973. *Marine Flora and Fauna of the Northeastern United States: higher plants of the Marine Fringe, vol. 384*. Seattle: US Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service.
- Mursyidin DH, Purnomo, Daryono BS. The ligule ultrastructure of the tidal swamp rice (*Oryza sativa*) landraces of South Kalimantan, Indonesia, and their genetic diversity and relationship. *Biodiversitas* 22: 5280-5285.
- Oakes AJ. 1990. *Ornamental grasses and grasslike plants*. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Paiva JGA, Frank-de-Carvalho SM, Magalhães MP, Graciano-Ribeiro D. 2006. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botanica Brasílica* 20: 257-264.
- Pathak S, Kar S, Singh P. 2013. Ligules as aid to Identification of Grasses. *Pleione* 7: 241-246.
- Pechanec JF. 1936. The identification of grasses on the upper snake river plains by their vegetative Characters. *Ecology* 17: 479-490.
- Philipson WR. 1935. The development and morphology of the ligule in grasses. *The New Phytologist* 34: 310-325.
- Pohl RW. 1980. Flora costaricensis: family number 15, Gramineae. *Fieldiana Botany* 4: 1-608.
- Reitz R. 1981. *Flora ilustrada catarinense: Gramíneas, parte 1 – 1. Bambusa até 44. Chloris*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues.
- Reitz R. 1982a. *Flora ilustrada catarinense: Gramíneas, parte 2 – 45. Deschampsia até 81. Pseudechinolaena*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues.
- Reitz R. 1982b. *Flora ilustrada catarinense: Gramíneas, parte 3 – 82. Paspalum até 115. Zea*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues.
- Rudall PJ, Buzgo M. 2002. Evolutionary history of the monocot leaf. In: Cronk QCB, Bateman RM, Hawkins JA. *Developmental genetics and plant evolution*, London: Taylor & Francis, 431-458.

- Russell GEG, Watson L, Koekemoer M, Smook L, Barker NP, Anderson HM, Dallwitz MJ. 1990. *Grasses of Southern Africa: an identification manual with keys, descriptions, distributions, classification and automated identification and information retrieval from computerized data*. South Africa: National Botanic Gardens.
- Ruzin SE. 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford: Oxford Press.
- Shouliang C, Bixing S, Liang L, Zhenlan W, Shenglian L, Dezhu L, Zhengping W, Zhengde Z, Nianhe X, Liangzhi J, Liang-chih C, Guanghua Z, Zhenhua G, Guangyao Y, Wenli C, Xiang C, Phillips SM, Stapleton C, Soreng RJ, Aiken SG, Tzvelev NT, Peterson PM, Renvoize SA, Olonova MV, Ammann KH. 2006. Poaceae (Gramineae). In: Wu Z, Raven PH, Deyuan H, eds. *Flora of China*, v 22. Beijing and St. Louis: Science Press and Missouri Botanical Garden.
- Sylvester AW, Cande WZ, Freeling M. 1990. Division and differentiation during normal and liguleless-1 maize leaf development. *Development* 110: 985-1000.
- Szabó ZK, Papp M, Daróczy L. 2006. Ligule anatomy and morphology of five *Poa* species. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 48: 83–88.
- Thi-Tuyet MHT, Cusset G. 1966. Précisions sur la ligule d'*Oryza sativa* L. *Bulletin de la Société Botanique de France* 113: 152-160.
- Thi-Tuyet MHT. 1963. Sur l'existence de deux catégories histologiques de ligules «nerviées» chez les Graminées. *Bulletin de la Société Botanique de France* 110(5-6): 204-209.
- Thi-Tuyet MHT. 1968. La notion de ligule latente, *Bulletin de la Société Botanique de France*, 115(1-2): 63-76.
- Toriba T, Tokunaga H, Shiga T, Nie F, Naramoto S, Honda E, Tanaka K, Taji T, Itoh JI, Kyozuka J. 2019. Blade-on-petiole genes temporally and developmentally regulate the sheath to blade ratio of rice leaves. *Nature Communications* 10:1-13.
- Tzvelev NN. 1989. The system of grasses (Poaceae) and their evolution. *The Botanical Review* 55: 141-203.
- Van Nam MT. 1971. La ligule dorsale des Graminées. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 118: 639-657.
- Veldkamp JF, Duistermaat H, Wong KM, Middleton DJ. 2019. Poaceae (Gramineae). *Flora of Singapore* 7: 219–501.

Tabela 1. Lista de espécies estudadas, com respectivos tipos de lígulas e número de coletor.

Subfamília/Espécie	Tipo de lígula	Número de coletor
Anomochlooideae		
<i>Streptochaeta spicata</i> Schrad. ex Nees	FH	Chaves BE 288
Bambusoideae		
<i>Raddia brasiliensis</i> Bertol.	EM	Chaves BE 289
<i>Phyllostachys aurea</i> Carrière ex Rivière & C. Rivière	MC	Chaves BE 335
Oryzoideae		
<i>Oryza sativa</i> L.	EM	Chaves BE 320
Pooideae		
<i>Bromus brachyanthera</i> Döll	EM	Chaves BE 330
<i>Holcus lanatus</i> L.	EM	Chaves BE 332
Arundinoideae		
<i>Arundo donax</i> L.	MC	Chaves BE 284
Aristidoideae		
<i>Aristida longifolia</i> Trin.	MC	Chaves BE 267
<i>Aristida setifolia</i> Kunth	FH	Chaves BE 270
Panicoideae		
<i>Cenchrus purpureus</i> (Schumach.) Morrone	FH	Chaves BE 286
<i>Echinoalaena inflexa</i> (Poir.) Chase	FH	Chaves BE 285
<i>Melinis repens</i> (Willd.) Zizka	FH	Chaves BE 261
<i>Paspalum maritimum</i> Trin.	EM	Chaves BE 280
<i>Setaria sulcata</i> Raddi	FH	Chaves BE 331
<i>Trachypogon spicatus</i> (L.f.) Kuntze	EM	Chaves BE 269
Chloridoideae		
<i>Dactyloctenium aegyptium</i> (L.) Willd.	MC	Chaves BE 266
<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.	EM	Chaves BE 279
<i>Sporobolus virginicus</i> (L.) Kunth	FH	Chaves BE 274

Nota: O tipo de lígula para cada espécie segue o que foi proposto por Clayton et al. (2006), todavia a nomenclatura das lígulas está de acordo com Metcalfe (1960) e Longhi-Wagner et al. (2001) em que citam que lígulas apresentam três morfologias distintas. Acrônimos dos tipos de lígula—EM. *Ligule eciliate membrane*; MC – *Ligule membranous-ciliate*; FH. *Ligule a fringe of hairs*. Optamos por manter a terminologia em inglês.

Tabela 2. Lista de espécies estudadas, tipo de lígula de acordo com o international Grassbase database, floras brasileiras, floras americanas (excluindo o Brasil), outras floras e livros especializados em gramíneas e dados deste trabalho. Traço indica que o tipo de lígula não foi observado para as floras consultadas. Legenda: EM. *eciliate membrane*; MC. *membranous-ciliate*; FH. *fringe of hairs*. Optamos por manter a terminologia em inglês.

Subfamília (símbolo) / Espécie	Grassbase	Floras do Brasil	Floras americanas (exceto Brasil)	Outras Floras	Presente estudo
☐ <i>Streptochaeta spicata</i>	FH	Absent	Absent	-	Absent
✦ <i>Phyllostachys aurea</i>	MC	MC	MC	MC	MC
✦ <i>Raddia brasiliensis</i>	EM	-	-	-	MC
★ <i>Oryza sativa</i>	EM	EM	EM	EM	EM
★ <i>Holcus lanatus</i>	EM	EM	EM	EM or MC	EM
★ <i>Bromus brachyanthera</i>	EM	EM	-	-	EM
○ <i>Arundo donax</i>	MC	MC	MC	MC	MC
⊙ <i>Aristida longifolia</i>	MC	MC or FH	MC	-	FH
⊙ <i>Aristida setifolia</i>	FH	MC	-	-	FH
⊙ <i>Cenchrus purpureus</i>	FH	FH	MC or FH	MC	FH
⊙ <i>Echinoalaena inflexa</i>	FH	FH	FH	-	FH
⊙ <i>Melinis repens</i>	FH	FH	FH	FH	FH
⊙ <i>Paspalum maritimum</i>	EM	EM	-	-	EM
⊙ <i>Setaria sulcata</i>	FH	MC	MC	-	FH
⊙ <i>Trachypogon spicatus</i>	EM	EM	EM	EM	EM
● <i>Dactyloctenium aegyptium</i>	MC	EM or MC	EM or MC	EM or MC	MC
● <i>Eleusine indica</i>	EM	EM	EM	EM or MC	MC
● <i>Sporobolus virginicus</i>	FH	FH	MC	FH	FH

Nota: referências das floras consultadas. Grassbase database (Clayton *et al.*, 2006), floras brasileiras [Flora do Brasil 2020 (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>); Filgueiras, 2021; Longhi-Wagner *et al.*, 2001; Longhi-Wagner & Todeschini, 2004; Reitz, 1981, 1982a, 1982b), floras americanas (excluindo o Brasil) (Hagenbuch & Lenke, 2015; Judziewicz *et al.*, 1990; Pohl,

1980), outras floras e livros especializados em gramíneas (Chen *et al.*, 2011, 2014; Duistermaat, 2005; Fish *et al.*, 2015; Ibrahim *et al.*, 2016; Oaks, 1990; Russel *et al.*, 1990; Shouliang *et al.*, 2006; Veldkamp *et al.*, 2019). As referências selecionadas apresentam descrição do tipo de lígula de, pelo menos, três espécies estudadas.

Nota 2: Símbolos que representam as subfamílias; quadrado – subfamílias que divergiram primeiro, estrela – clado BOP, círculo – clado PACMAD. Anomochlooideae (□), Bambusoideae (✦), Oryzoideae (★), Pooideae (✪) Arundinoideae (○), Aristidoideae (⊙), Panicoideae (⊗), Chloridoideae (●).

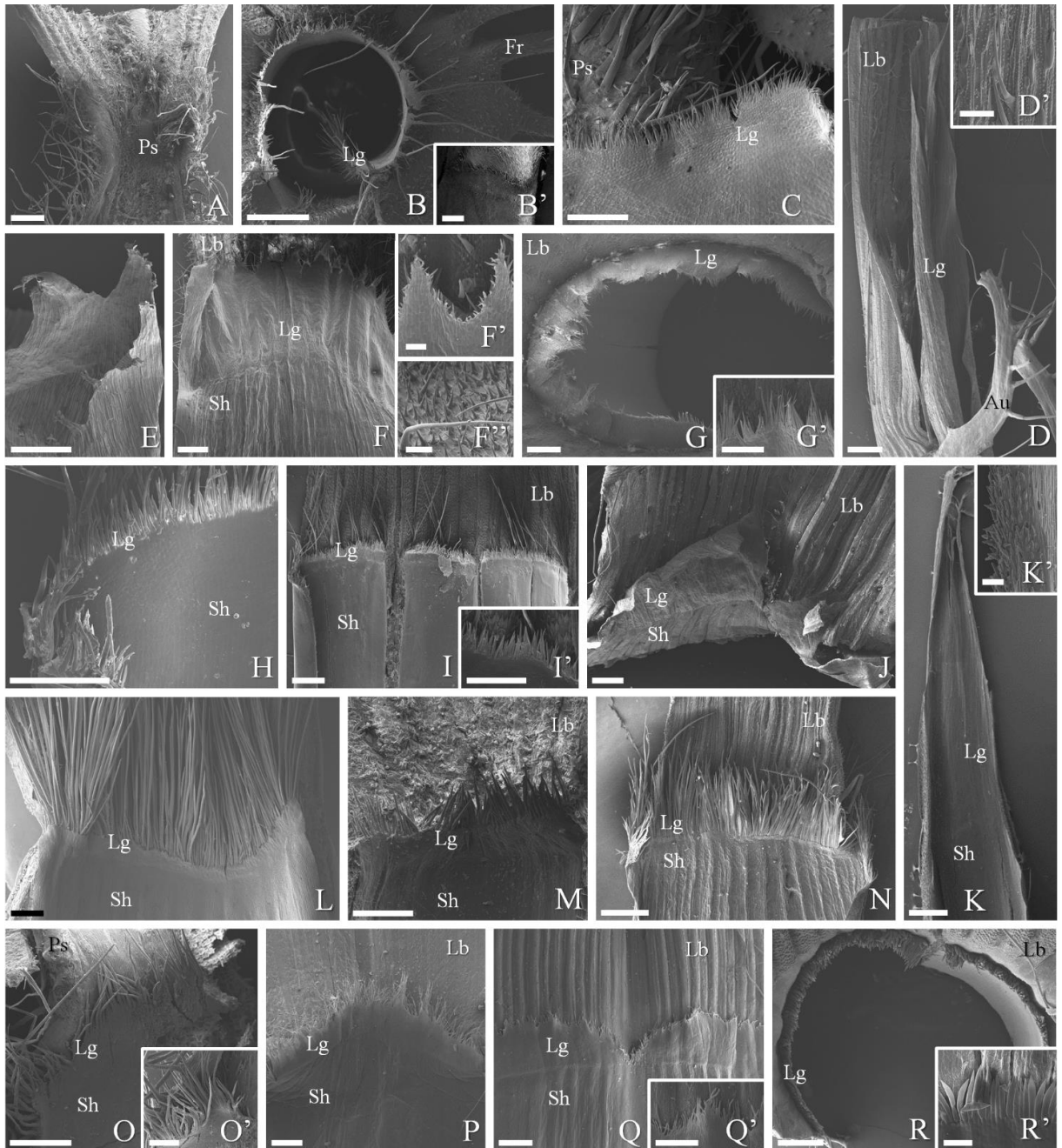


Figura 1 – Imagens em microscopia eletrônica de varredura da lígula das espécies estudadas. A. *Streptochaeta spicata*. B. *Phyllostachys aurea* (lígula ventral). B'. *Phyllostachys aurea* (lígula dorsal). C. *Raddia brasiliensis*. D. *Oryza sativa* (aspecto geral). D'. *Oryza sativa* (face abaxial da lígula evidenciando macrotricomas, microtricomas e tricomas do tipo espinho). E. *Bromus brachyanthera*. F. *Holcus lanatus* (aspecto geral). F'. *Holcus lanatus* (detalhe do bordo na região mediana da lígula). F''. *Holcus lanatus* (face abaxial da lígula evidenciando macrotricomas e tricomas do tipo espinho). G. *Arundo donax* (aspecto geral). G'. *Arundo donax* (detalhe do bordo na região mediana da lígula). H. *Aristida longifolia*. I. *Aristida setifolia* (aspecto geral). I'. *Aristida setifolia* (detalhe do bordo na região mediana da lígula). J. *Bromus brachyanthera* (aspecto geral). K. *Bromus brachyanthera* (face abaxial da lígula evidenciando macrotricomas, microtricomas e tricomas do tipo espinho). L. *Bromus brachyanthera* (face abaxial da lígula evidenciando macrotricomas, microtricomas e tricomas do tipo espinho). M. *Bromus brachyanthera* (face abaxial da lígula evidenciando macrotricomas, microtricomas e tricomas do tipo espinho). N. *Bromus brachyanthera* (face abaxial da lígula evidenciando macrotricomas, microtricomas e tricomas do tipo espinho). O. *Bromus brachyanthera* (face abaxial da lígula evidenciando macrotricomas, microtricomas e tricomas do tipo espinho). O'. *Bromus brachyanthera* (face abaxial da lígula evidenciando macrotricomas, microtricomas e tricomas do tipo espinho). P. *Bromus brachyanthera* (face abaxial da lígula evidenciando macrotricomas, microtricomas e tricomas do tipo espinho). Q. *Bromus brachyanthera* (face abaxial da lígula evidenciando macrotricomas, microtricomas e tricomas do tipo espinho). Q'. *Bromus brachyanthera* (face abaxial da lígula evidenciando macrotricomas, microtricomas e tricomas do tipo espinho). R. *Bromus brachyanthera* (face abaxial da lígula evidenciando macrotricomas, microtricomas e tricomas do tipo espinho). R'. *Bromus brachyanthera* (face abaxial da lígula evidenciando macrotricomas, microtricomas e tricomas do tipo espinho).

Paspalum maritimum. K. *Trachypogon spicatus* (aspecto geral). K'. *Trachypogon spicatus* (face abaxial da lígula evidenciando tricomas do tipo gancho). L. *Cenchrus purpureus*. M. *Echinochaena inflexa*. N. *Melinis repens*. O. *Setaria sulcata* (aspecto geral). O'. *Setaria sulcata* (detalhe do bordo na região mediana da lígula). P. *Dactyloctenium aegyptium*. Q. *Eleusine indica* (aspecto geral). Q'. *Eleusine indica* (detalhe do bordo na região mediana da lígula). R. *Sporobolus virginicus* (aspecto geral). R'. *Sporobolus virginicus* (detalhe do bordo na região mediana da lígula). Legenda: Au. Auricule; Fr. Fimbriae; Lb. Leaf blade; Lg. Ligule; Ps. Pseudopetiole; Sh. Sheat. Barra: 50 μm (F', F'', K' and R'), 250 μm (C, E, F', G', H, I', M, O', Q' and R) e 500 μm (A, B, B', D, F, G, I, J, L, N, O, P and Q). OBS: As legendas das estruturas estão em inglês, pois o manuscrito final será na língua inglesa.

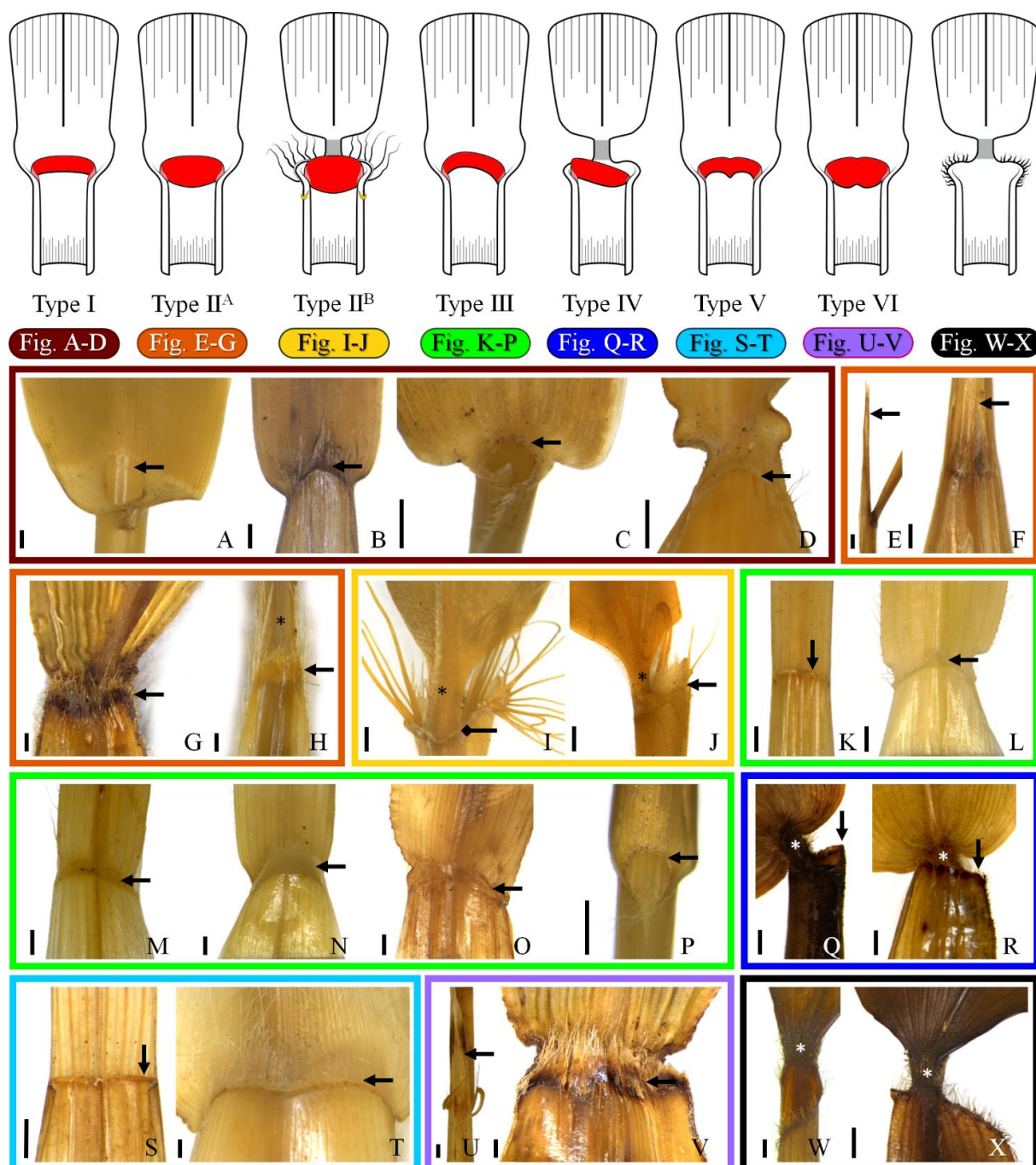


Figura 2 – Ilustração (linha superior) e morfologia (quadros) da região ligular das espécies estudadas. Nas ilustrações observa-se as diferentes tipologias da inserção da lígula na região de transição entre a bainha e a lâmina foliar: type I arco convexo simétrico; type II arco côncavo simétrico, sem lígula externa (II^A) ou com lígula externa (II^B); type III arco convexo assimétrico; type IV arco côncavo assimétrico; type V duplo arco convexo; type VI duplo arco côncavo. Legenda: vermelho indica a lígula, amarelo a lígula externa (ver Type II^B) e em cinza o pseudopecíolo (ver tipos II^B, IV e espécie que não apresenta lígula). A cor presente abaixo das ilustrações está relacionado a cor dos quadros e as imagens de morfologia das espécies que apresentam a referida tipologia. Type I (vermelho). A. *Arundo donax*, B. *Bromus*

brachyanthera, C. *Echinolaena inflexa*, D. *Melinis repens*; Type II^A (laranja). E-F. *Trachypogon spicatus*; G. *Setaria sulcata* (folha sem pseudopecíolo); H. *Setaria sulcata* (folha com pseudopecíolo); Type II^B (amarelo). I-J. *Phyllostachys aurea* (espécies com lígula externa), para melhor visualização da lígula foram retiradas parte das fímbrias na imagem J; Type III (verde). K. *Aristida setifolia*, L. *Dactyloctenium aegyptium*, M. *Eleusine indica*, N. *Holcus lanatus* O. *Paspalum maritimum*; P. *Sporobolus virginicus*; Type IV (azul escuro). Q-R. *Raddia brasiliensis*; Type V (azul claro). S. *Aristida longifolia*; T. *Cenchrus purpureus*; Type VI (violeta). U. *Oryza sativa*; V. *Setaria sulcata* (folha sem pseudopecíolo); W-X. *Streptochaeta spicata*, espécie que não apresenta lígula. Seta triangular indica a lígula dorsal, seta quadrada lígula ventral (lígula externa) e o asterisco o pseudopecíolo. Barra = 1mm.

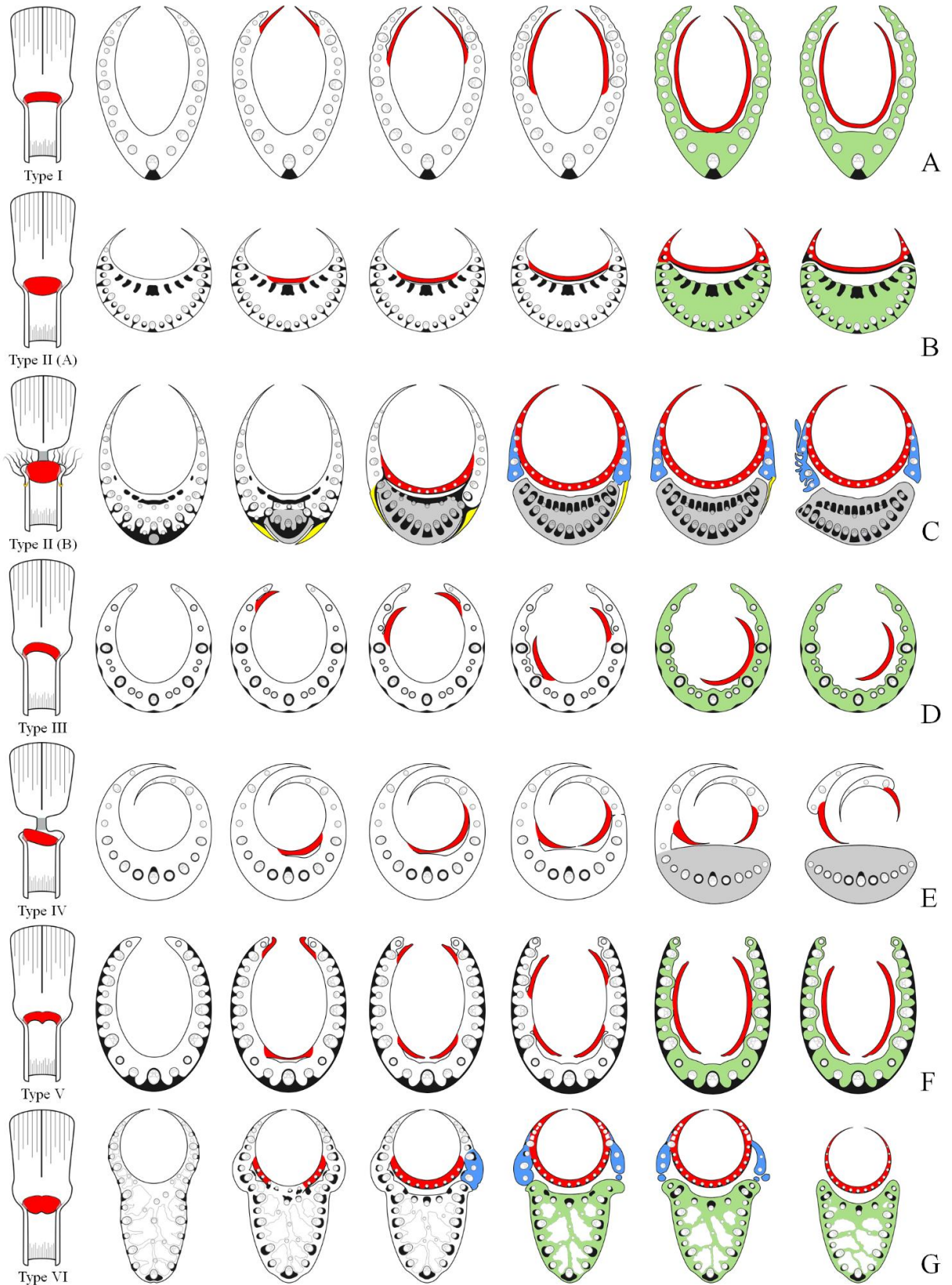


Figura 3 – Processo de individualização das lígulas na interface bainha-lâmina foliar. A. tipo I, margem para o centro de modo mais ou menos simultâneo (ex. *Bromus brachyantera – eciliate membrane*); B-C. tipo II, centro para a margem de modo mais ou menos simultâneo, neste caso,

observou-se este padrão com lígula externa ausente (ex. *Thachypogon spicatus* – *eciliate membrane*) ou presente (ex. *Phyllostachys aurea* – membranoso ciliado); D. tipo III, margem para o centro de modo não-simultâneo (ex. *Sporobolus virginicus* – *a fringe of hairs*); E. tipo IV, centro para a margem de modo não-simultâneo (ex. *Radia brasiliensis* – membranoso ciliado); F. tipo V, da margem para o centro e do centro para a margem de modo mais ou menos simultâneo (ex. *Aristida setifolia* – *a fringe of hairs*); G. tipo VI, da região mediana da ala em direção ao centro e a margem (ex. *Oryza sativa* – *eciliate membrane*). Os feixes vasculares (círculos) podem ser observados nas lígulas de *Thachypogon spicatus* (B), *Phyllostachys aurea* (C) e *Oryza sativa* (G). Nota referente as cores: vermelho – lígula; branca – bainha ou transição entre bainha e lâmina foliar; verde – lâmina foliar; amarelo – lígula externa; azul – aurícula; cinza – pseudopecíolo; preto – esclerênquima.

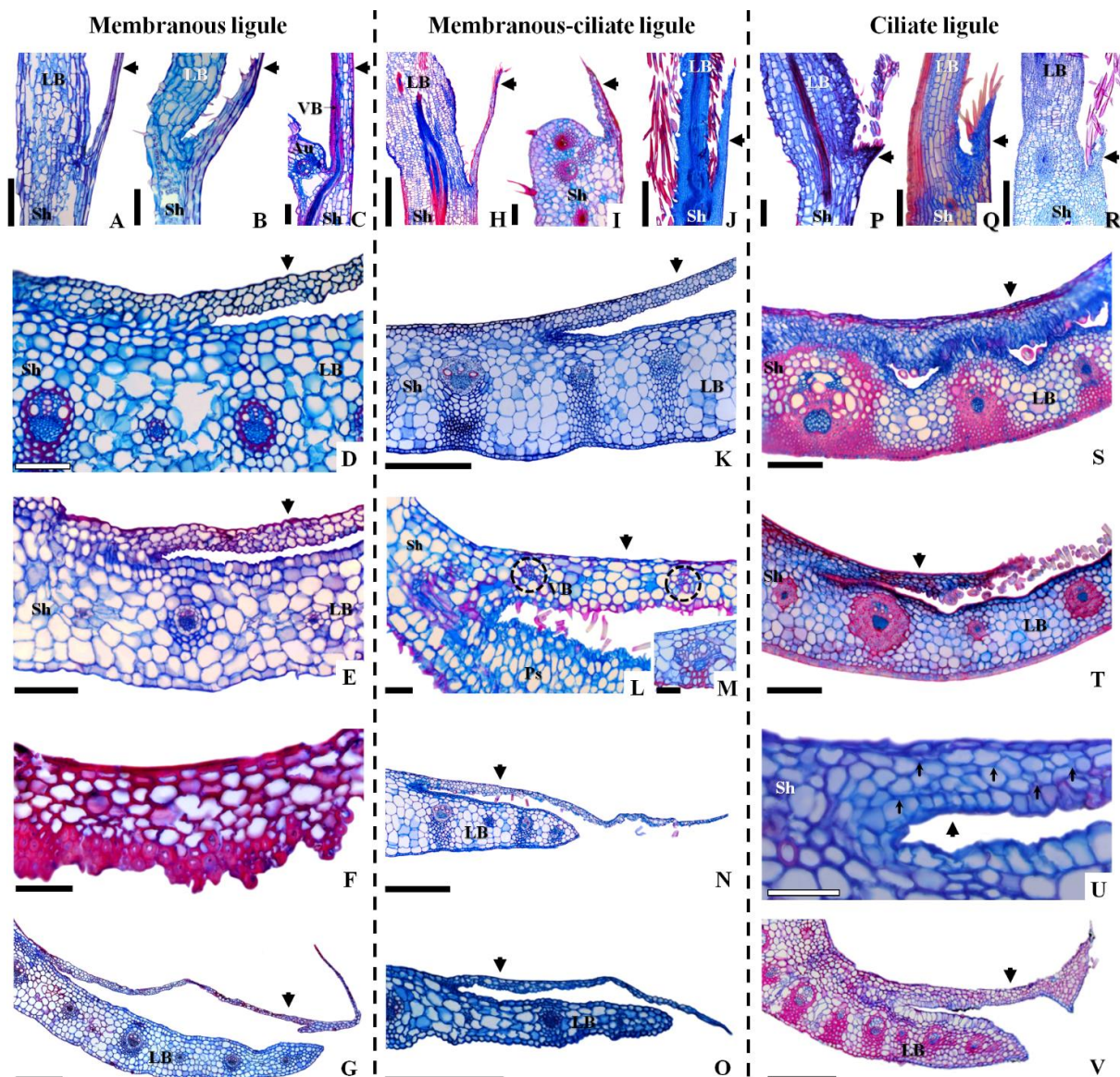


Figura 4 – Estrutura anatômica das lígulas desenvolvidas. Lígulas do tipo *eciliate membrane* (A-G), membranosa-ciliada (H-O) e *a fringe of hairs* (P-V); linha superior (A-C, H-J e P-R) amostras em secções longitudinais, demais linhas em secções transversais na interface da lígula-bainha/lâmina foliar (D-F, K-M e S-U) ou região marginal da lígula (G, N-O e V). A. *Bromus brachyanthera*; B. *Holcus lanatus*; C. *Oryza sativa*; D. *Bromus brachyanthera*; E. *Paspalum maritimum*; F. *Trachypogon spicatus* (detalhe da lígula evidenciando as fibras); G. *Paspalum maritimum*; H. *Arundo donax*; I. *Raddia brasiliensis*; J. *Setaria sulcata*; K. *Eleusine indica*; L. *Phyllostachys aurea* (aspecto geral); M. *Phyllostachys aurea* (detalhe do feixe vascular da lígula); N. *Eleusine indica*; O. *Dactyloctenium aegyptium*; P. *Melinis repens*; Q. *Aristida setifolia*; R. *Cenchrus purpureus*; S. *Aristida longifolia*; T. *Sporobolus virginicus*; U e V. *Echinoalaena inflexa*. Legenda: Au - Auricule; LB - Leaf blade; Ps – Pseudopécíolo; Sh – sheath; VB – vascular bundle; seta larga – lígula; seta curta – espaços intercelulares na lígula;

círculo pontilhado – feixes vasculares na lígula. Barra: 50 μ m (F, L e M), 100 μ m (B, C, D, E, I, P, S, T, U e V), 250 μ m (A, G, K, N, O e R) e 500 μ m (H e J).

Capítulo 3

Compreendendo as variações das lígulas ventrais de Poaceae por meio da sua ontogenia

Understanding the variations of the ventral ligules in Poaceae using an ontogenetic approach

Bruno Edson-Chaves; Lynn G. Clark; Gladys Flávia de A. Melo-de-Pinna

Resumo

- *Introdução e objetivos.* A lígula é um dos melhores caracteres vegetativos para identificação em Poaceae, e é conhecida como órgão de fronteira auxiliando a delimitar a bainha e a lâmina foliar. No entanto, em virtude da sua variação estrutural, ainda é pouco compreendida do ponto de vista de seu desenvolvimento. Assim, o presente trabalho buscou avaliar ontogenia dos diferentes tipos de lígulas de Poaceae, visando um melhor entendimento conceitual da estrutura e compreensão da sua origem e diversidade na família.
- *Métodos.* Foram analisadas 16 espécies de oito diferentes subfamílias de Poaceae, de modo a representar a diversidade estrutural das lígulas na família. Ápices caulinares vegetativos foram coletados e posteriormente submetidos às técnicas de anatomia vegetal. Folhas em diferentes plastocronos também foram observadas sob microscopia eletrônica de varredura.
- *Principais resultados.* Independentemente do tipo de lígula, o desenvolvimento ocorre em três estádios: (i) pré-lígula, (ii) inicial, e (iii) tardio. O momento de formação destes estádios varia entre as espécies, sendo o último a fase de crescimento e diferenciação. A ausência de lígulas em *Streptochaeta spicata* foi confirmada.
- *Conclusões.* O desenvolvimento das lígulas em três estádios revela que as lígulas das espécies estudadas não apresentam homologias com estípulas de eudicotiledôneas. Acreditamos que a lígula se configura como uma expansão do ápice da bainha, especialmente devido: (i) a constrição na porção superior das lígulas em estágio inicial, e (ii) ao momento de individualização das lígulas. A ausência de lígulas em *Streptochaeta spicata*, além de valor taxonômico, poderia apresentar importante implicação evolutiva do caráter na família.

Palavras-chave: clados BOP e PACMAD, *Streptochaeta spicata*, base foliar, desenvolvimento foliar, ontogenia, gramíneas.

Abstract

- *Background and Aims.* The ligule is one of the best vegetative characters for identification in Poaceae, and is known as a border organ, helping to delimit the leaf sheath and leaf blade. However, given its structural variation, it is still poorly understood from the developmental point of view. Thus, this work aimed to evaluate the development of different types of ligules in different subfamilies of Poaceae for a better conceptual understanding of the structure and comprehension of its origin and diversity in the family.
- *Methods.* Were analyzed 16 species from eight different subfamilies of Poaceae to represent the structural diversity of the ligules in the family. Vegetative stem apices were collected and submitted to plant anatomy techniques. Leaves in different plastochrons were also observed under scanning electron microscopy.
- *Key Results.* Regardless of the type of ligule, development occurs in three stages: (i) pre-ligule, (ii) early, and (iii) late. The timing of formation of these stages varies among species, with the last stage being the growth and differentiation phase. The ontogenetic approach further confirmed the absence of ligules in *Streptochaeta spicata*.
- *Conclusions.* The three-stage development of the leaflets reveals that the leaflets of the species studied do not show homologies with eudicot stipules. We believe that the lily is configured as an expansion of the sheath apex, especially due to: (i) the constriction in the upper portion of early-stage ligules, and (ii) the timing of individualization of the ligules. The absence of ligules in *Streptochaeta spicata*, in addition to taxonomic value, could present important evolutionary implication of the character in the family.

Key words: BOP and PACMAD clade, *Streptochaeta spicata*, leaf base, leaf development, ontogeny, grasses.

INTRODUÇÃO

Poaceae configura-se como a quinta maior família de angiospermas do mundo, apresentando 759-769 gêneros e 11.554-12.120 espécies (The Plant List, 2013; Clayton *et al.*, 2006; WCSP, 2020). Seus representantes apresentam folhas dísticas (raro espiraladas), com bainha geralmente aberta envolvendo o colmo, lâmina foliar estreita e alongada de até 5 (cinco) metros (Bresinsky *et al.*, 2012; Jaarsveld & Egli, 2019), geralmente contínua com a bainha, exceto nos grupos Anomochlooideae, Pharoideae, Bambusoideae e alguns gêneros de Panicoideae que apresentam pseudopecíolo (Dahlgren *et al.*, 1985; Longhi-Wagner *et al.*, 2001).

A região de interseção entre a bainha e a lâmina foliar apresenta algumas estruturas características como: lígula, aurícula, colar e pseudopecíolo. A lígula, descrita em detalhes por Edson-Chaves *et al.* (submetido, cap.1) apesar de mostrar-se polimórfica e com grande aplicação na taxonomia do grupo (Pechanec, 1936; Clifford, 1969; Tzvelev, 1989; Mitideri, 1992; Longhi-Wagner *et al.*, 2001; Pathak *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2008; Gibson, 2009; Gandhi *et al.*, 2016), ainda apresenta conceito controverso, com cinco hipóteses distintas na literatura (Edson-Chaves *et al.*, submetido). As aurículas são projeções ou apêndices laterais da base da lâmina foliar em forma de orelha, com diferentes graus de desenvolvimento (Leithead *et al.*, 1971; Longhi-Wagner *et al.*, 2001), a presença/ausência e as variações deste caráter apresentam importante valor taxonômico (Armstrong, 1917). A interação entre a aurícula e a lígula é responsável pela angulação da folha, projetando a lâmina foliar para um ângulo ótimo na captação da luz solar (Sylvester & Smith, 2009).

Por sua vez, o colo (ou colar) é a região oposta a lígula (Longhi-Wagner *et al.*, 2001), onde a lâmina foliar encontra a bainha na face abaxial da folha (Leithead *et al.*, 1971). Ao passo que o pseudopecíolo é uma estrutura distinta entre a bainha e a lâmina, não homólogo ao pecíolo de eudicotiledôneas (Bell & Bryan, 2008), usualmente curto (Dahlgren *et al.*, 1985), formado por um estreitamento da base da lâmina foliar (Pastore *et al.*, 2012), que pode ser torcido ou não, conferindo importante valor taxonômico (Longhi-Wagner *et al.*, 2001); tal estrutura é mais comum em folhas do ramo de Bambusoideae (Wang, 2017), mas também pode ser observada em representantes de Anomochlooideae, Pharoideae, além de representantes pontuais de algumas outras subfamílias (como é o caso de *Setaria sulcata* - Panicoideae) (Longhi-Wagner *et al.*, 2001; Filgueiras, 2021).

Destas estruturas, a lígula mostra-se como a mais importante, sendo considerada um dos melhores caracteres vegetativos para identificação em Poaceae (Copples & Pase, 1967;

GPWG, 2001), possivelmente devido a sua grande variação estrutural (Metcalf, 1960; Mitidieri, 1992). Como ressaltado por Edson-Chaves *et al.* (submetido, cap.1), as lígulas podem ser classificadas principalmente quanto à: (1) posição - ventrais (internas ou adaxiais) ou dorsais (externas ou abaxiais); (2) morfologia - *eciliate membrane* (EM), *ciliolate membrane* (CiM), *ciliate membrane* (CM) ou *fringe of hairs* (FH), podendo estar ausente em algumas espécies; e (3) variações dentro da mesma espécie - homoligulado, quando apresenta apenas um tipo de lígula, ou heteroligulado, quando pode expor mais de um tipo de lígula. Dentre as lígulas membranosas, são utilizadas outras classificações como vascularização (Mauseth, 1988; Chaffey, 1994), tamanho (Dahlgren *et al.*, 1985; Klapp, 1987) e formato do ápice (Looman, 1982; Klapp, 1987; Clayton *et al.*, 2006) são empregadas. Vale destacar ainda que em alguns trabalhos (Metcalf, 1960; Longhi-Wagner *et al.*, 2001), as lígulas do tipo CiM e CM são denominadas apenas de membranosas-ciliadas.

Uma vez que as lígulas, assim como as aurículas, desenvolvem-se na junção entre a bainha e a lâmina, são conhecidas como órgãos de fronteira (Toriba *et al.*, 2019); e devido a sua posição, as lígulas têm sido usadas como um importante marcador estrutural nos estudos de desenvolvimento foliar de gramíneas (Rudall & Buzgo, 2002; Foster & Timmermans, 2009). Em relação à ontogenia de lígulas dorsais do tipo *eciliate membrane*, Chaffey (1985) cita que esta estrutura tem origem muito cedo a partir da epiderme foliar na face adaxial. De acordo com Freeling *et al.* (1988), o desenvolvimento da lígula envolve uma coordenação precisa de vários processos complexos que ocorrem em diferentes tecidos; porém, ainda não é claro se a formação da lígula é induzida por células da bainha subjacente ou por uma interação entre as células da bainha e da lâmina foliar próxima a origem da lígula.

Em *Zea mays* L. foi constatado que durante a morfogênese ocorre primeiro a diferenciação da bainha, em seguida da lígula e aurícula, só então da lâmina foliar; e que a lâmina foliar tem crescimento mais acentuado que a bainha (Foster & Timmermans, 2009). Para esta espécie, Sylvester *et al.* (1990), utilizando microscopia eletrônica de varredura, propõem que as primeiras etapas de formação da folha ocorrem no segundo plastocrono (P2); porém, a diferenciação entre a lâmina e bainha só se torna evidente no plastocrono 3 (P3), com a formação de uma banda pré-ligular, constituída por uma faixa linear de células quadradas entre a lâmina foliar e a bainha, delimitando a posição que a lígula irá se formar. Continuando o desenvolvimento, em P4 e P5, quando os primórdios foliares ultrapassam a região de meristema, células da banda pré-ligular dividem-se periclinalmente e alongam-se para produzir a lígula membranosas característica desta espécie. A observação da banda pré-ligular e formação da lígula é destacada na revisão de Shaaf *et al.* (2019); porém, os autores destacam que o exato

momento da formação da banda pré-ligular e desenvolvimento da lígula podem diferir entre as espécies.

Leandro *et al.* (2018) destacam que, embora o conhecimento na anatomia das gramíneas seja crescente, os trabalhos se concentram principalmente na análise de cortes transversais da lâmina foliar em microscopia de luz, de modo que outras regiões da planta, ou mesmo da folha, continuam negligenciadas. Este é o caso da lígula, que continua sendo uma das estruturas mais negligenciadas diante da grande variedade de tipos; e cuja compreensão dos processos ontogenéticos ainda permanecem abertos (Conklin *et al.*, 2019). Deste modo é necessária uma análise mais aprofundada destas estruturas em um contexto de desenvolvimento, especialmente referente às lígulas presentes no clado das comelinídeas (Rudall & Buzgo, 2002), no qual se insere a família Poaceae. Vale destacar que, de acordo com Cruz (2013), o desenvolvimento foliar de angiospermas, quando comparados ao de outros órgãos, apresenta poucos trabalhos, no que se refere aos aspectos morfoanatômicas. No entanto, tal abordagem mostra-se fundamental para a identificação de homologias, ao mesmo tempo em que permite definir melhor as estruturas morfológicas (Edson-Chaves *et al.*, 2021).

Assim, para este estudo são analisados diversos tipos de lígulas em diferentes subfamílias de Poaceae, sob o ponto de vista ontogenético, com novos dados relevantes para a compreensão da sua origem e diversidade estrutural no grupo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados indivíduos de 16 espécies, representando oito, das 12, subfamílias de Poaceae. A escolha dessas espécies considerou diferentes grupos taxonômicos como: (i) linhagens que se divergiram primeiro (Anomochlooideae), (ii) clado BOP (Bambusoideae, Oryzoideae e Pooideae) e (iii) clado PACMAD (Panicoideae, Aristidoideae, Choridoideae e Arundinoideae). As espécies selecionadas representam a diversidade dos tipos de lígulas descritas em diferentes subfamílias de Poaceae; sendo sete espécies com lígula do tipo membranosa (EM), quatro do tipo membranosa-ciliada (MC) e sete do tipo ciliada (FH) (Tabela 1).

As tipologias de lígulas seguiram a descrição Metcalfe (1960) e Longhi-Wagner *et al.* (2001) em que indicam que a lígula apresenta três tipos morfológicos. A descrição das lígulas das espécies selecionadas e da inserção da lígula nas bainhas em folhas desenvolvidas foram baseadas nos dados morfológicos propostos por Edson-Chaves *et al.* (ver capítulo 2).

As amostras foram coletadas em estágio reprodutivo e vegetativo. As que estavam em período fértil foram utilizadas para identificação da espécie, confecção das exsiccatas e posterior depósito nos herbários da Universidade Federal do Ceará (EAC) ou da Universidade de São Paulo (SPF). As que se apresentavam em fase vegetativa foram fixadas em etanol 70% (Jensen, 1962) com glicerina 4:1 para posteriores análises anatômicas do desenvolvimento.

Para os trabalhos de desenvolvimento das lígulas a partir do meristema apical caulinar, foram selecionadas 16 espécies (Tabela 1), sendo uma Anomochlooideae, representando as linhagens que se divergiram primeiro em Poaceae, quatro espécies do clado BOP e 11 espécies do clado PACMAD. Considerando a descrição dos tipos de lígulas do Grassbase (Clayton *et al.*, 2006) e padronizadas de acordo com a classificação de Metcalfe (1960) e Longhi-Wagner *et al.* (2001), para o estudo ontogenético foram consideradas, pelo menos, cinco espécies de cada tipo de lígula, em oito subfamílias: Anomochlooideae, Oryzoideae, Bambusoideae, Pooideae, Arundinoideae, Aristidoideae, Panicoideae e Chloridoideae (Tabela 1).

Em laboratório, os ápices caulinares foram dissecados sob microscópio estereoscópio mantendo apenas folhas não expandidas e com a bainha aparentemente não alongada. Posteriormente, as amostras foram submetidas a um gradiente de desidratação em série de etanol/terc-butanol crescente (70 – 85 – 95 – 100, 48h cada etapa, no vácuo), e colocadas em uma solução de butanol terciário P.A (24h), seguida da etapa de butanol terciário P.A. e óleo mineral (1:1) (24h) e submetida a inclusão em paraplast (Ruzin, 1999, adaptado). Os cortes seriados transversais e longitudinais (10 a 12µm) foram obtidos em micrótomo rotativo (Reihert-jung Auto Cut 2040), por fim, coradas com azul de astra 1% aquoso (40 minutos) e fuscina básica 1% etanólica (20 minutos) (Kraus & Arduim, 1997), montados em lâminas permanentes em verniz vitral incolor 500[®] (Acrilex, São Paulo, Brazil) (Paiva *et al.*, 2006), e fotografados utilizando o Sistema de Digitalização de Imagem IM50 acoplado ao microscópio Leica DMLB do Laboratório de Anatomia Vegetal IB/USP.

Quanto à microscopia de varredura, as amostras foram desidratadas em série acetônica crescente (em intervalos de 2 horas cada) e secas em ponto crítico. Em seguida, foram montadas em stubs, cobertas com ouro por dois minutos e observadas no microscópio de varredura do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB/USP.

Foi adotada a terminologia anatômica para gramíneas proposta por Ellis (1976, 1979) e a nomenclatura morfológica da lígula segundo Chaffey (1984).

RESULTADOS

O desenvolvimento da lígula (Figuras 1-4) pode ser sumarizado em três fases: (i) estágio pré-ligular, (ii) estágio inicial, e (iii) estágio tardio de crescimento e diferenciação.

O estágio pré-ligular, observado apenas sob microscopia eletrônica de varredura, é caracterizado pela presença de 3-4 camadas de pequenas células epidérmicas (quadradas ou ligeiramente achatadas) ocorrendo na superfície adaxial da folha, com intensa divisão anticlinal das células epidérmicas. Nas espécies com lígulas membranosas (p.ex. *Paspalum maritimum* – Figura 1B¹) e membranosas-ciliadas (p.ex. *Arundo donax* – Figura C¹; *Eleusine indica* – Figura 1D¹), a pré-ligula ocorre no plastocrono 3 (P3).

Em *Echinoalaena inflexa*, espécie com lígula ciliada, a banda pré-ligular ocorre em P2 com características semelhantes às descritas para lígulas membranosas e membranosas-ciliadas. No entanto, nas demais espécies com o mesmo tipo de lígula, não foi possível observar a banda pré-ligular, embora seja possível a distinção entre a lâmina foliar, com superfície ondulada ou reentrâncias, e a bainha com superfície plana (Figura 1E¹ e 1G¹).

A banda pré-ligular pode ser em arco linear ou em arco convexo; tal organização independe do tipo de lígula e do grupo taxonômico. Por exemplo, arco linear é observado em *Holcus lanatus* (Pooideae com lígula do tipo membranosa), *Eleusine indica* (Chloridoideae com lígula membranosa-ciliada – Figura 1D¹), *Aristida setifolia* e *A. longifolia* (Aristidoideae com lígulas ciliadas); já arco convexo foi observado apenas em *Arundo donax* (Arundinoideae com lígula membranosa-ciliada – Figura 1C¹) e *Cenchrus purpureus* (Panicoideae com lígula ciliada).

O estágio inicial é caracterizado pelo início da formação da lígula, em que uma pequena projeção membranosa é observada, de modo descontínuo, a partir da banda pré-ligular, independentemente da morfologia da lígula. Embora seja comum observar este estágio em P3, o mesmo pode variar entre as espécies:

- (i) Em lígulas membranosas ocorre entre P3-P4 (*Oryza sativa* e *Trachypogon spicatus* – P3; *Holcus lanatus* – P4; *Paspalum maritimum* – P3-P4);
- (ii) Em lígulas membranosas-ciliadas é comum ocorrer P3 (*Dactyloctenium aegyptium*, *Eleusine indica* e *Phyllostachys aurea*). Contudo, em *Raddia brasiliensis* ocorre em P2, e *Arundo donax* em P5-P6.
- (iii) Em lígulas ciliadas ocorre entre P2-P3 (*Aristida setifolia* – P2-P3; *Echinoalaena inflexa* – P3; e *Melinis repens* – P2) ou entre P3-P4 (*Aristida longifolia*, *Cenchrus purpureus* e *Sporobolus virginicus*).

O estágio inicial é observado em 1 a 2 plastocronos seguidos do plastocrono com a pré-lígula, a depender da espécie, até o momento em que a lígula se mostra contínua na região ligular; neste momento, também é possível verificar uma pequena constrição acima da lígula. Este estágio é visível em secção longitudinal (Figura 2) onde se observa uma pequena projeção contínua à bainha com uma constrição na porção superior, entre P2 a P5 a depender da espécie.

Logo em seguida, à medida que a bainha se expande também se inicia o estágio de crescimento da lígula, por meio de divisões anticlinais e periclinais do mesofilo da bainha que irá formar o tecido parenquimático ligular, caracterizando uma origem mista da lígula. Em secções transversais seriadas, a partir da região do meristema apical caulinar, este estágio de crescimento da lígula pode ser visualizado com a separação da lígula da interface bainha-lâmina foliar, apresentando uma epiderme unisseriada em ambas as faces, tricomas eventuais a depender da espécie, e um parênquima de preenchimento (Figuras 3 e 4).

Nas espécies analisadas com lígulas membranosas este estágio ocorre entre P4-P5 (*Trachypogon spicatus*) ou em P5 (*Holcus lanatus* e *Paspalum maritimum*); em lígulas membranosas-ciliadas e ciliadas podem ocorrer em P4 (representantes de Bambusoideae, *Aristida setifolia*, *Dactyloctenium aegyptium*, *Echinolaena inflexa*, *Sporobolus virginicus*), P5 (*Aristida longifolia*, *Eleusine indica* e *Cenchrus purpureus*) ou a partir de P7 (*Arundo donax*). Concomitante com o processo de crescimento da lígula, ou logo no plastocrono seguinte, também há formação de tricomas marginais e na face abaxial da epiderme da lígula. Uma síntese sobre os diferentes estádios de desenvolvimento das lígulas encontra-se na tabela 3.

Em relação as demais estruturas que podem estar presentes na região ligular, como pseudopecíolo e aurículas, sua formação é posterior ao surgimento e diferenciação da lígula, como observado no pseudopecíolo e nas aurículas fimbriadas em *Phyllostachys aurea* (Figura 3E-3G). As lígulas externas que ocorrem em *Phyllostachys aurea*, por sua vez, só foi possível observar quando a lígula ventral já se encontrava em estágio tardio, e após alongamento da bainha (Figura 2D).

Durante as análises, não foi possível observar a formação de lígula em *Streptochaeta spicata* (Figuras 3H^I-H^{IV} e 4F-I). Nesta espécie, em microscopia óptica, a transição de bainha para lâmina foliar também não apresenta a diferenciação da lígula, sendo possível distinguir as duas regiões foliares pela formação da nervura central e células fusóides na lâmina foliar em P4 (Figura 4F-6I).

DISCUSSÃO

Como uma visão holística da ontogenia revela maior entendimento do conceito de lígulas em Poaceae

A formação da lígula envolve processos muito bem ordenados tanto do ponto de vista genético (Becraft *et al.*, 1990; Moreno *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2014; Richardson & Hake, 2019; Strable & Nelissen, 2021), quanto do ponto de vista ontogenético. Quanto a este último aspecto, Thi-Tuyet (1967) destaca que o desenvolvimento pode ocorrer em sete estádios; por sua vez, trabalhos em *Zea mays* (Sharman, 1942; Sylvester *et al.*, 1990; Sylvester *et al.*, 1996) também destacam que a formação da lígula ocorre em três estádios (pré-ligular, inicial e de tardio ou crescimento/diferenciação), semelhante ao encontrado nas espécies aqui estudadas. Todavia é comum na literatura a descrição de tais estádios para lígulas membranosas, mas também observamos para lígulas membranosas-ciliadas e ciliadas.

O momento de formação do estágio pré-ligular varia um pouco entre as espécies, ocorrendo até o P3 de modo semelhante, independentemente do tipo de lígula. Acreditamos que isto ocorra devido a uma organização pré-estabelecida (pré-padrão) para a formação das lígulas em Poaceae. Para Conklin *et al.* (2019, p. 707), o pré-padrão pode ser definido como “um padrão genético molecular pré-existente que prevê o desenvolvimento de uma estrutura embrionária ou primordial antes que qualquer evidência de morfogênese seja observada”. Assim, antes mesmo de ter a formação das lígulas há uma região pré-estabelecida para a sua posição, cujo sinais morfológicos/fenotípicos ocorre por meio de divisões anticlinais da epiderme, evidenciado pelas 3-4 camadas de células epidérmicas quadradas ou ligeiramente achatadas encontradas nas espécies estudadas, ou seja, o estágio pré-ligular mostra-se como um processo de mudança fenotípica da região ligular. Devido a este processo ocorrer, predominantemente, nas células epidérmicas, é mais facilmente visualizado em MEV, conforme também é ressaltado por Sylvester *et al.* (1990); sob microscopia ótica, o primórdio mostra-se indiferenciado.

Embora tenha sido observado banda pré-ligular em P2 de *Echinolaena inflexa* (plastocrono mais jovem em que é observado este estágio de desenvolvimento), espécie de lígula ciliada, nas demais espécies com esse mesmo tipo de lígula tal observação não foi comum. Entretanto, neste mesmo plastocrono, a região da interface entre a bainha e a lâmina foliar estava bem delimitada, com uma organização morfológica diferente entre as duas regiões, isto é, sendo possível ver nitidamente os domínios de bainha e lâmina foliar. A não visualização nítida e distinta da banda pré-ligular nestas espécies ciliadas, no entanto, não exclui a

possibilidade destas folhas passarem pelo processo de formação da pré-lígula. Deve-se ressaltar que não se pode generalizar informando que a fase pré-ligular de lígulas ciliadas ocorre em P2; em *Phragmites communis* Trin. [syn. *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud. – Arundinoideae] os primeiros sinais de divisão periclinais da epiderme ocorrem em P5 conforme é relatado por Thi-Tuyet (1967).

É possível que a banda pré-ligular seja muito estreita, em comparação às demais tipologias, ou o período de ocorrência desta fase não seja tão duradouro quanto nas outras espécies observadas, mas o processo em si acontece durante a formação da lígula; inclusive, devido aos pré-padrões já estabelecidos na região ligular. Corrobora para este aspecto: (i) a lígula funciona como uma estrutura de fronteira, reorientando o crescimento da bainha e lâmina foliar (Lewis *et al.*, 2014), e (ii) o estágio inicial das lígulas ciliadas é semelhante às lígulas membranosas ou membranosas-ciliadas.

Embora haja este pré-padrão, foram observadas pequenas variações na organização das células da banda pré-ligular devido a um crescimento diferenciado da lígula resultando em arco convexo, o qual tem mais crescimento no centro que nas margens, ou arco plano, cujo crescimento é mais ou menos uniforme ao longo do eixo centro-lateral. Independentemente do tipo de crescimento inicial há mudanças posteriores na morfologia da inserção da lígula, que devem ocorrer, possivelmente, durante o estágio tardio de crescimento da lígula.

Nossos dados demonstram que independentemente do tipo de lígula, o processo de morfogênese ocorrido no estágio inicial começa com divisões celulares anticlinais e periclinais da epiderme da banda pré-ligular, semelhante ao observado por Sharman (1942); em seguida há divisões periclinais e anticlinais do tecido parenquimático subepidérmico. As divisões periclinais da epiderme ocorrendo de modo descontínuo e esporádico foram observados por Becraft *et al.* (1990) e Sylvester *et al.* (1990); isso ajudaria a explicar o fato de que nos primeiros momentos da fase de iniciação a lígula encontra-se descontínua.

É possível que esse padrão descontínuo tenha levado Lewis e Hake (2016) a afirmarem que na banda preligular, as divisões de células periclinais produzem a lígula madura na epiderme adaxial (“*within the preligule band, periclinal cell divisions produce the mature ligule fringe on the adaxial epidermis*”, p.81). Todavia, os autores afirmam que as divisões anticlinais e periclinais no tecido subepidérmico que sucedem as divisões periclinais da epiderme parecem não contribuir na formação das lígulas. A presença de uma região membranosa, ou seja, com tecido parenquimático na base de todos os tipos de lígula, sugere que as divisões epidérmicas associadas às subepidérmicas estão relacionadas ao processo de formação da lígula. E que diferenças na atividade das divisões celulares podem resultar em

diferentes padrões de crescimento da lígula (Green, 1980). Tais processos são coordenados durante o desenvolvimento (Freeling *et al.*, 1988; Tsiantis & Langdale, 1998), ocorrendo em um contexto basípeto de diferenciação foliar (Moreno *et al.*, 1997) e associados ao rápido crescimento da lâmina, corroborando os dados apresentados por Sylvester *et al.* (1990) para *Zea mays*.

Os tricomas marginais, especialmente em lígulas membranosas-ciliadas e ciliadas, iniciam seu desenvolvimento durante o estágio inicial, continuando a se desenvolver durante o estágio tardio. Por sua vez, os tricomas na superfície abaxial, quando ocorrem, surgem após os tricomas marginais, quando há um ligeiro aumento da porção membranosa. Fato semelhante também é observado em *Phragmites communis* (syn. *Phragmites australis*), espécie com lígula ciliada (Thi-Tuyet, 1967). Os dados apresentados corroboram, assim, com Esau (1965) ao afirmar que os tricomas se desenvolvem cedo em relação ao crescimento do órgão, no nosso caso ao crescimento da lígula.

Em *Zea mays*, após o estabelecimento da lígula de forma contínua, há alongamento da bainha (Skinner & Nelson, 1994). Nesta espécie, nos dois primeiros estádios a bainha cresce pouco em comprimento, embora continue se dividir; o aumento rápido do comprimento da bainha ocorre concomitante ao estágio tardio da lígula, de modo que o crescimento da lígula está associado ao alongamento da bainha (Sylvester *et al.*, 1990). Além dos dados em *Zea mays* (lígula membranosa), a relação entre o crescimento da bainha e da lígula também foi observada em *Phragmites communis* (syn. *Phragmites australis*) (Thi-Tuyet, 1967); como observado nas demais espécies citadas nestes trabalhos.

Sintetizando as etapas de desenvolvimento das espécies estudadas, observamos que lígulas membranosas tendem a iniciar o processo de formação (estádio pré-ligular) em P3 e iniciar o estágio de crescimento em P5, exceto em *Trachypogon spicatus* cujo estágio pré-ligular ocorre aparentemente antes do P3. Lígulas membranosas-ciliadas apresentam estágio pré-ligular em P2-P3 e o estágio de crescimento ocorre em P4-P5, a exceção é *Arundo donax* que apresenta banda pré-ligular em P3, mas seu estágio de crescimento é em P7-P10. Lígulas ciliadas exibem a banda pré-ligular em P2 e o início da fase de maturação entre P3-P5. Das espécies amostradas, a lígula de *Melinis repens* (lígula ciliada) é a que se desenvolve mais rápido, enquanto que *Arundo donax* (lígula membranosa-ciliada) é a que demora mais a atingir o estágio de crescimento.

Com base nisso, acreditamos ainda que lígulas membranosas e membranosas-ciliadas podem apresentar um crescimento mais prolongado, a depender de seu tamanho, em comparação com as lígulas ciliadas. Estas últimas, encerrando a formação dos tricomas

marginais que podem ser curtos (p. ex. *Aristida longifolia* - Figura 1E^{IV}; *Sporobolus virginicus* - Figura 1G^{IV}) ou longos (p.ex. *Cenchrus purpureus* – Figura 1F^{IV}), tendem a cessar seu crescimento mais rápido que os demais tipos morfológicos. Possivelmente, a variação do crescimento tem relação tanto com o tipo morfológico de lígula, como pelo crescimento da própria folha (longa x curta e estreita x larga). Esta também pode ser uma justificativa para a variação encontrada para o início do estágio inicial e tardio nas espécies estudadas.

Levando em consideração que nas análises ontogenéticas de diferentes tipos de lígulas não foi possível observar tecido esclerenquimático e tecido vascular, relatado para algumas espécies por Edson-Chaves *et al.* (ver capítulo 2), podemos inferir que este tecido se diferencia durante os estádios finais da maturação da lígula (final da fase tardia de desenvolvimento). Podendo ocorrer ocasionalmente nos tipos membranosos, conforme encontrado em algumas de nossas espécies e também relatado por Chaffey, (1994), ou membranosas-ciliadas. A ocorrência de esclerênquima nestes tipos de lígula, possivelmente, confere maior sustentação e pouca flexibilidade da lígula, dado que esta é uma das funções deste tecido (Esau, 1965; Fahn, 1967), o que garantiria que a porção membranosa das lígulas atingisse maiores tamanhos e auxiliasse nas funções sumarizadas por Edson-Chaves *et al.* (submetido, cap.1).

Além da lígula ventral, a região de interface da bainha e lâmina foliar de gramíneas pode apresentar lígula dorsal, pseudopecíolo e aurículas (Longhi-Wagner *et al.*, 2001). Do ponto de vista do desenvolvimento, tais estruturas são evidenciadas durante o estágio de crescimento da lígula ventral, isto é, se formam após o estabelecimento da lígula ventral. Quanto as aurículas, os dados obtidos com o estudo de *Zea mays* demonstram que estas surgem a partir de divisões das células remanescentes da porção superior da banda pré-ligular (Foster & Timmermans, 2009), porém só começam a se expandir após a lígula (Moreno *et al.*, 1997). Nosso trabalho, além de corroborar os dados apresentados na literatura, auxilia a extrapolar esta ideia para uma maior diversidade de tipologias da região ligular, uma vez que em *Oryza sativa* (lígula membranosa) e *Phyllostachys aurea* (lígula membranosa-ciliada) tal estrutura é evidenciada após o crescimento da lígula.

As informações aqui citadas sobre o desenvolvimento dos diversos tipos de lígulas, com múltiplas abordagens, certamente auxiliam para uma maior compreensão do caráter lígula. De acordo com a revisão de Edson-Chaves *et al.* (submetido, cap.1), a lígula pode ser definida por diferentes hipóteses, a saber: (i) extensão da bainha, (ii) região específica da folha, (iii) estípula, (iv) extensão da base da lâmina foliar, e (v) formada pela fusão da estípula com diferentes estruturas (pecíolo ou bainha).

Estípulas são determinadas muito cedo no processo de desenvolvimento foliar, se separando dos flancos dos primórdios foliares possivelmente após a determinação do eixo proximal-distal (Townsend & Sinha, 2012), o que não foi observado nas lígulas neste estudo. Pois, apesar da banda pré-ligular ser formada nos primeiros plastocronos (especialmente em lígulas ciliadas), não há uma separação/individualização de fato até o estabelecimento do estágio tardio com o alongamento da bainha, o que ratificaria que a lígula não apresenta natureza estipular.

Este ponto de vista também favorece a refutar a ideia de que, nas espécies estudadas, a lígula não seria a fusão de estípula com outras estruturas. No entanto, não descartamos totalmente esta hipótese uma vez que, nas espécies estudadas, não observamos a individualização das estípulas nos primórdios e sua posterior fusão, como acontece em *Metrodorea* A.St.-Hil. - Rutaceae (Cruz *et al.*, 2015); é possível que haja uma fusão congênita ou mesmo que esta ocorra de modo precoce e efêmera, que não seja perceptível a individualização das partes. Para testar essa hipótese necessitaria de uma diversidade maior de espécies que as estudadas nesse trabalho, possivelmente incluindo representantes de outras subfamílias e/ou tribos das subfamílias já amostradas.

Das hipóteses descritas por Edson-Chaves *et al.* (submetido, cap.1), nossos dados confluem para afirmar que a lígula é uma expansão do ápice da bainha e não da base da lâmina foliar. Para este aspecto destaca-se: (i) a constrição na porção superior das lígulas em estágio inicial, e (ii) o momento de individualização das lígulas.

Em *Portulaca* (Portulacaceae), *Talinum* (Talinaceae) (Lopes-Filho, 2010) e *Metrodorea* - Rutaceae (Cruz *et al.*, 2015), a presença de uma constrição na junção da lâmina e base foliar durante as etapas iniciais do desenvolvimento foliar mostra-se como importante marcador estrutural para diferenciar estes dois domínios foliares; a porção acima da constrição daria origem a lâmina foliar e a porção abaixo originaria estruturas de base foliar (p.ex. pecíolo e bainha).

Na fase inicial de desenvolvimento das folhas de gramíneas, estas assumem a forma de um capuz, não sendo possível distinguir bainha e lâmina e crescem por meio de atividades do meristema intercalar (Esau, 1965). Com a formação da banda pré-ligular esta região divide-se em duas: (i) zona proliferativa da basal da bainha, associada ao meristema intercalar, e (ii) zona proliferativa da lâmina, que permanece como uma faixa distinta imediatamente acima da lígula que se divide anisotropicamente (Sylvester & Smith, 2009). O posicionamento desta zona proliferativa da lâmina ajuda a delimitar que a lígula está no ápice da bainha. Vale destacar que à medida que ocorre o alongamento da folha acontece uma mudança no posicionamento do

predifferentiation zone (cujo nosso entendimento é a zona proliferativa da lâmina derivado do meristema intercalar pela formação da banda pré-ligular) em relação a lígula (Mitkovski & Sylvester, 2003), ficando mais evidente o posicionamento da lígula na porção de bainha. Por fim, ao longo do crescimento da folha, as diferentes atividades desta zona proliferativa da lâmina, possivelmente, também seriam responsáveis pela variação no posicionamento da inserção da lígula na região ligular relatada por Edson-Chaves *et al.* (ver capítulo 2).

A distinção clara entre bainha, lígula e lâmina foliar levou alguns autores a propor que a lâmina foliar de gramíneas é composta por essas três regiões, sendo a lígula uma região específica e distinta das demais, como destacam diversos autores expostos na revisão de Edson-Chaves *et al.* (submetido, cap.1), ou região/órgãos de fronteira (Ito *et al.*, 2002; Toriba *et al.*, 2019). Tal hipótese, proposta inicialmente em 1809, ganhou mais força a partir da segunda metade do século XX; embora a hipótese de que a lígula seja uma continuação da bainha tenha sido mais relatada na literatura (Edson-Chaves *et al.*, submetido – cap.1) e defendida neste trabalho, não consideramos estas duas hipóteses como excludentes. Isso porque tratam-se de pontos de vista diferentes; quanto à origem ontogenética a lígula mostra-se como uma expansão da bainha, mas do ponto de vista morfológico pode ser considerada uma estrutura à parte das demais regiões foliares pois fornece diversas e importantes características com valor taxonômico; ou seja, é uma expansão da bainha que resulta, morfológicamente, em uma estrutura peculiar denominada lígula. Estas questões também não descartam a ideia de fusão de diferentes estruturas, pois poderia ser a fusão congênita e/ou precoce do ápice da bainha com estípulas.

Por fim, considerando as amostras analisadas ainda pairam dúvidas sobre algumas questões: (i) espécies de gramíneas com bainha completamente fechada mantém o mesmo padrão de desenvolvimento que as que apresentam bainha aberta?; e (ii) o desenvolvimento das lígulas dorsais segue o mesmo padrão que ocorre nas lígulas ventrais? Para responder tais questões e compreender melhor a região ligular de gramíneas investigações envolvendo outros grupos taxonômicos são necessárias.

Novas implicações sobre o surgimento das lígulas em Poaceae com base em dados ontogenéticos de Streptochaeta spicata

Clayton *et al.* (2006) descrevem que *Streptochaeta spicata* (Anomochlooideae) apresenta lígula ciliada; no entanto, nossas análises não evidenciaram nenhum dos três estádios (pré-ligular, inicial e tardio) de desenvolvimento para a referida espécie, o que indicaria a ausência de lígula; confirmando as análises morfológicas e anatômicas realizadas por Edson-Chaves *et*

al. (ver capítulo 2) para a referida espécie, e de Clark *et al.* (1995) e Kellong (2015) que comentam que o gênero *Streptochaeta* não apresenta lígula.

Acreditamos que o fato da bainha ter ápice ciliado e o pseudopecíolo apresentar elevada densidade de macrotricomas (Edson-Chaves *et al.* - ver capítulo 2) tenham levado Clayton *et al.* (2006) a descrever a espécie com lígula do tipo ciliado, porém nas espécies com lígula ciliada (p. ex. *Aristida setifolia*, *Cenchrus purpureus* e *Melinis repens*) utilizadas neste estudo, ocorre a presença de uma banda pre-ligular ou clara distinção entre a bainha e lâmina foliar logo nos primeiros primórdios, seguida de uma fase de iniciação formando uma pequena base membranosa que não foi observada em *Streptochaeta spicata*, mesmo em plastocronos mais avançados. Outro ponto a ser considerado é que nas demais espécies com pseudopecíolo (*Phyllostachys aurea*, *Raddia brasiliensis* e *Setaria sulcata*) a lígula mostra-se evidente entre o pseudopecíolo e a bainha (Edson-Chaves *et al.* - ver capítulo 2), o que não acontece na espécie em questão.

A ausência das lígulas em *Streptochaeta* pertencente a Anomochlooideae (subfamília com representantes das primeiras linhagens de Poaceae) conforme é indicado pela literatura supracitada, e sustentada nos nossos dados para *Streptochaeta spicata*, possivelmente indicaria que o ancestral comum de Poaceae tinha lígulas ausentes e que a diversidade encontrada na família surgiu posteriormente.

Outro aspecto que ajuda a justificar este ponto de vista, refere-se ao conceito de lígula latente proposto por Thi-Tuyet (1968), utilizando como plantas modelo espécies de *Echinochloa* (Panicoideae). De acordo com o autor, certas espécies com lígula ausente apresentam divisões celulares para a formação da lígula, mas não há crescimento da estrutura, de modo que ela não é visível na morfologia externa. É possível que a lígula latente seja uma redução extrema do caráter, dado que em Panicoideae a lígula mostra-se como um caráter comum. Porém, se considerarmos que o ancestral de Poaceae/Anomochlooideae não apresenta lígula, em *Streptochaeta* apenas se mantém o caráter ancestral, sem vestígios (lígula latente) de redução do caráter.

O fato de que o ancestral de gramíneas possivelmente não tem lígulas difere do apresentado por Edson-Chaves *et al.* (submetido, cap.1), pois os autores se basearam em dados de Clayton *et al.* (2006), os quais citam que *Streptochaeta spicata* possui lígula ciliada, para propor a história evolutiva do caráter lígula na família. Assim, a ausência de lígulas em *Streptochaeta* além de apresentar valor taxonômico, pois seria uma característica importante para diferenciar *Streptochaeta* de *Anomochloa* (Anomochlooideae), que apresenta este caráter (Oliveira & Clark 2020a, b), mostra-se com importante implicação evolutiva.

CONCLUSÃO

A abordagem ontogenética, utilizando dados de microscopia óptica e de varredura, ao ser realizada de modo integrado foi fundamental para uma melhor compreensão do caráter lígula em Poaceae.

A lígula mostra-se como uma importante estrutura das folhas de Poaceae, considerada como uma estrutura peculiar no grupo. Independente da morfologia e da subfamília estudada, ontogeneticamente mostra-se uma expansão da porção superior da bainha, cujo desenvolvimento ocorre em três estádios: (i) pré-ligular, caracterizado por divisões anticlinais e periclinais da epiderme, que pode apresentar variações quanto ao formato (arco plano ou arco convexo); (ii) inicial, demarcada estruturalmente por uma constrição na porção superior, bem como de divisões anticlinais e periclinais da região subepidérmica, ocorrendo inicialmente descontínua; e (iii) tardio, que é a fase de crescimento e individualização da lígula e a fase em que surgem as principais variações morfológicas e anatômicas da lígula. Tais aspectos revelam que a lígula não apresenta homologias com estípulas de eudicotiledôneas, não sendo descartada a hipótese de que poderia ser uma fusão de estípula com ápice da bainha.

As análises realizadas indicam que *Streptochaeta spicata* não apresenta lígula ciliada (conforme é relatado por alguns autores) nem lígula latente, reforçando a ausência deste caráter na espécie. Tal fato apresenta implicações taxonômicas e filogenéticas, de modo que o ancestral de gramíneas pode não apresentar lígulas e este caráter se diversificou grandemente dentro da família, já nas primeiras linhagens.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a todos que auxiliaram na coleta de amostras do material vegetal e técnicos do Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Process 2019/15195-8 to GFMP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Productivity Grant Process 303962/2019-4 to GFMP and

170871/2017-7 to BEC). Além disso, os autores não têm interesses financeiros ou não financeiros relevantes a divulgar

LITERATURA CITADA

- Armstrong SF. 1917. *British grasses and their employment in agriculture*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Becraft PW, Bongard-Pierce DK, Sylvester AW, Poethig RS, Freeling M. 1990. The liguleless-1 Gene Acts Tissue Specifically in Maize Leaf Development. *Developmental Biology* 141: 220-232
- Bell AD, Bryan A. 2008. *Plant form: an illustrated guide to flowering plant morphology*. London: Timber Press.
- Bresinsky A, Körner C, Kadereit J, Neuhaus G, Sonnewald U. 2012. *Tratado de Botânica de Strasburger*, 36ª ed. Porto Alegre: Artmed.
- Chaffey NJ. 1984. Epidermal structure in the ligules of four species of the genus *Poa* L. (Poaceae), *Botanical Journal of the Linnean Society* 89: 341–354.
- Chaffey NJ. 1985. Structure and Function in the Grass Ligule: Optical and Electron Microscopy of the Membranous Ligule of *Lolium temulentum* L. *Annals of Botany* 55: 65-75.
- Chaffey NJ. 1994. Structure and function of the membranous grass ligule: a comparative study. *Botanical Journal of the Linnean Society* 116: 53-69.
- Clark LG, Zhang W, Wendel JF. 1995. A Phylogeny of the Grass Family (Poaceae) Based on ndhF Sequence Data. *Systematic Botany* 20: 436-460
- Clayton, W.D., M. S. Vorontsova, K. T. Harman, & H. Williamson. 2006 onwards. GrassBase - The Online World Grass Flora. Available in <<http://www.kew.org/data/grasses-db.html>>. Access on 17 Ago 2019.
- Clifford HT. 1969. Attribute correlation in the Poaceae (grasses). *Botanical Journal of the Linnean Society* 62: 59-67.
- Conklin PA, Strable J, Li S, Scanlon MJ. 2019. On the mechanisms of development in monocot and eudicot leaves. *New Phytologist* 221: 706–724.
- Copple RF, Pase CP. 1967. *A Vegetative Key to Some Common Arizona Range Grasses*. Fort Collins: Forest Service, U. S. Department of Agriculture.
- Cruz R, Duarte M, Pirani JR, Melo-de-Pinna GFA. 2015. Development of leaves and shoot apex protection in *Metrodorea* and related species (Rutaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 178, 267–282.

- Cruz R. 2013. *Caracteres morfoanatômicos e ontogenéticos foliares de Metrodorea A.St.-Hil. e espécies relacionadas (Rutaceae) sob uma perspectiva filogenética*. Master Thesis, Universidade de São Paulo, Brazil.
- Dahlgren RMT, Clifford HT, Yeo PF. 1985. *The families of the monocyledons: structure, evolution and taxonomy*. Berlin: Springer-Verlag.
- Das M, Bhattacharya S, Singh P, Filgueiras TS, Pal A. 2008. Bamboo Taxonomy and Diversity in the Era of Molecular Markers. *Advances in Botanical Research* 47: 225-268.
- Edson-Chaves B, Santos-Silva LNN, Cortez PA. 2021. Atuação e potencialidades da Anatomia Vegetal. In: Monteiro SS, Lírio EJ, Lopes AS, Amaral FPM, Esposito MP, Furlan CM, eds. *Botânica no Inverno 2021*. São Paulo : Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo
- Edson-Chaves B, Silva OLM, Clark LG, Melo-de-Pinna, GFA. 2022 (submetido). The ligule in Poaceae: a historical and evolutionary review. *Botanical Review*.
- Ellis RP. 1976 A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in Poaceae. I. The leaf-blade as viewed in transverse section. *Bothalia* 12: 65-69
- Ellis RP. 1979. A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in Poaceae. II. The epidermis as seen in surface view. *Bothalia* 12: 641-671
- Esau K. 1965. *Plant Anatomy*. 2^a ed. New York: John Wiley & Sons.
- Fahn A. 1967. *Plant Anatomy*. Oxford: Pergamon Press.
- Filgueiras TS. 2021. *Gramíneas do Cerrado*. Rio de Janeiro: IBGE.
- Foster TM, Timmermans MCP. 2009. Axial Patterning of the Maize Leaf. In: Bennetzen JL, Hake SC, eds. *Handbook of Maize: Its Biology*. New York: Springer, 161-178.
- Freeling M, Bongard-Pierce DK, Harberd N, Lane B, Hake S. 1988. Genes involved in the patterns of maize leaf cell division. In: Verma DPS, Goldberg RB, eds. *Temporal and spatial regulation of plant genes*. New York: Springer-Verlag, 41-62.
- Gandhi D, Albert S, Pandya N. 2016. *Handbook on the morphology of common grasses: identification and characterization of caryopses and seedlings*. Oakville: Apple Academic Press.
- Gibson DJ. 2009. *Grasses and Grassland Ecology*. Nova York: Oxford University Press.
- GPWG - Grass Phylogeny Working Group. 2001. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88 (3): 373-457.
- Green PB. 1980. Organogenesis: a biophysical view. *Annual Review of Plant Biology* 31:51-82

- Ito M, Sentoku N, Nishimura A, Hong SK, Sato Y, Matsuoka M. 2002. Position dependent expression of GL2-type homeobox gene, *Roc1*: significance for protoderm differentiation and radial pattern formation in early rice embryogenesis *The Plant Journal* 29: 497-507
- Jaarsveld EV, Eggli U. 2019. Poaceae. In: Eggli U, Nyffeler R, eds. *Monocotyledons*, 2^a ed. Hamburg: Springer, 1307-1310.
- Jensen WA. 1962. *Botanical histochemistry: principles and practices*. São Francisco: W. H. Freeman.
- Kellogg EA. 2015. Flowering Plants Monocots: Poaceae. In: Kubitzki K, ed. *The families and genera of vascular plants*, New York: Springer, 1-416.
- Klapp E. 1987. *Manual de las gramíneas*, 11^a ed. 11. Barcelona: Omega.
- Kraus JE, Arduin M. 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Seropédica: EDUR.
- Leandro TD, Rodrigues TM, Clark LG, Scatena VL. 2018. Fusoid cells in the grass family Poaceae (Poales): a developmental study reveals homologies and suggests new insights into their functional role in young leaves. *Annals of Botany* 122: 1–16.
- Lee J, Park JJ, Kim SL, Yim J, An G. 2007. Mutations in the rice liguleless gene result in a complete loss of the auricle, ligule, and laminar joint. *Plant Molecular Biology* 65:487–499.
- Leithead HL, Yarllet LL, Shiflet TN. 1971. *100 Native forage grasses in 11 southern states*. U.S. Washington, D. C.: Department of Agriculture, Soil Conservation Service.
- Lewis MW, Bolduc N, Hake K, Htike Y, Hay A, Candela H, Hake S. 2014. Gene regulatory interactions at lateral organ boundaries in maize. *Development* 141, 4590-4597.
- Lewis MW, Hake S. 2016. Keep on growing: building and patterning leaves in the grasses. *Current Opinion in Plant Biology* 29: 80–86.
- Longhi-Wagner HM, Bittrich V, Wanderley MGL, Shepherd GJ. 2001. Poaceae. In: Wanderley MGL, Shepherd GJ, Giuliatti AM, eds. *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo 1*. São Paulo: FAPESP/Hucitec, 1-291.
- Looman J. 1982. *Prairie grasses: identified and described by vegetative characters*. Ottawa: Minister of Supply and Services Canada.
- Lopes Filho JH. 2010. *Desenvolvimento da folha e axila foliar em Portulacaceae e Talinaceae: homologias primárias no clado ACPT*. PhD Thesis, Universidade de São Paulo, Brazil.
- Mauseth JD. 1988. *Plant anatomy*. San Francisco: The Benjamin Cummings Publishing Company.

- Metcalf CR. 1960. *Anatomy of the monocotyledons: I Gramineae*. New York: Clarendon Press.
- Mitideri J. 1992. *Manual de Gramíneas e leguminosas para pastos tropicais*, 2ª ed. São Paulo: Nobel e EdUSP,
- Mitkovski M, Sylvester AW. 2003. Analysis of cell patterns in developing maize leaves: dark-induced cell expansion restores normal division orientation in the mutant *tangled*. *International Journal of Plant Sciences* 164:113–124.
- Moreno MA, Harper LC, Krueger RW, Dellaporta SL, Freeling M. 1997. Liguleless1 encodes a nuclear-localized protein required for induction of ligules and auricles during maize leaf organogenesis. *Genes & Development* 11:616-628.
- Oliveira RP, Clark LG. 2020a. *Anomochloa* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 11 mar. 2022
- Oliveira RP, Clark LG. 2020b. *Streptochaeta* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 11 mar. 2022
- Paiva JGA, Frank-de-Carvalho SM, Magalhães MP, Graciano-Ribeiro D. 2006. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botanica Brasilica* 20: 257-264.
- Pastore M, Rodrigues RS, Simão-Bianchini R, Filgueiras TS. 2012. *Plantas exóticas invasoras na Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André – SP: guia de campo*. São Paulo: Instituto de Botânica.
- Pathak S, Kar S, Singh P. 2013. Ligules as aid to Identification of Grasses. *Pleione* 7: 241-246.
- Pechanec JF. 1936. The identification of grasses on the upper snake river plains by their vegetative Characters. *Ecology* 17: 479-490.
- Richardson AE, Hake S. 2019. Drawing a Line: Grasses and Boundaries. *Plants* 8: 1-20.
- Rudall PJ, Buzgo M. 2002. Evolucionary history of the monocot leaf. In: Cronk QCB, Bateman RM, Hawkins JA. *Developmental genetics and plant evolution*, London: Taylor & Francis, 431-458.
- Ruzin SE. 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford: Oxford Press.
- Shaaf S, Bretani G, Biswas A, Fontana IM, Rossini L. 2019. Genetics of barley tiller and leaf development^{FA}. *Journal of Integrative Plant Biology* 61: 226–256.
- Sharman BC. 1942. Developmental Anatomy of the Shoot of *Zea mays* L. *Annals of Botany* 6: 245-282.
- Skinner RH, Nelson CJ. 1994. Epidermal Cell Division and the Coordination of Leaf and Tiller Development. *Annals of Botany* 74: 9-15.

- Strable J, Nelissen H. 2021. The dynamics of maize leaf development: Patterned to grow while growing a pattern. *Current Opinion in Plant Biology* 63:1-11.
- Sylvester AW, Cande WZ, Freeling M. 1990. Division and differentiation during normal and liguleless-1 maize leaf development. *Development* 110: 985-1000.
- Sylvester AW, Smith L, Freeling M. 1996. Acquisition of identity in the developing leaf. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12: 257–304.
- Sylvester AW, Smith L. 2009. Cell Biology of Maize Leaf Development. In: Bennetzen JL, Hake SC, eds. *Handbook of Maize: its biology*. New York: Springer, 179-204.
- Szabó ZK, Papp M, Daróczy L. 2006. Ligule anatomy and morphology of five *Poa* species. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 48: 83–88.
- The Plant List. 2013. A working list of all plant species. Available in <<http://www.theplantlist.org/>>. Access on 15 Feb 2022.
- Thi-Tuyet MHT. 1967. La “ligule de poils” du *Phragmites communis* Trin. *Bulletin de la Société Botanique de France* 114: 319-327.
- Thi-Tuyet MHT. 1968. La notion de ligule latente, *Bulletin de la Société Botanique de France*, 115(1-2): 63-76.
- Toriba T, Tokunaga H, Shiga T, Nie F, Naramoto S, Honda E, Tanaka K, Taji T, Itoh JI, Kyojuka J. 2019. Blade-on-petiole genes temporally and developmentally regulate the sheath to blade ratio of rice leaves. *Nature Communications* 10:1-13.
- Townsley BT, Sinha NR. 2012. A New Development: Evolving Concepts in Leaf Ontogeny. *Annual Review of Plant Biology* 63: 535–562.
- Tsiantis M, Langdale JÁ. 1998. The formation of leaves. *Current Opinion in Plant Biology* 1:43-48
- Tzvelev NN. 1989. The system of grasses (Poaceae) and their evolution. *The Botanical Review* 55: 141-203.
- Wang S. 2017. Bamboo sheath - A modified branch based on the anatomical observations. *Scientific Reports* 7: 1-8
- WCSP. 2020. World Checklist of Selected Plant Families. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Available in <<http://wmsp.science.kew.org/>>. Access on 07 Sep 2020.

Tabela 1. Lista de espécies estudadas, com seus respectivos tipos de lígulas e número de coletor.

Subfamília/Espécie	Tipo de lígula	Número de coletor
Anomochlooideae		
<i>Streptochaeta spicata</i> Schrad. ex Nees	Absent	Chaves BE 288
Bambusoideae		
<i>Raddia brasiliensis</i> Bertol.	MC	Chaves BE 289
<i>Phyllostachys aurea</i> Carrière ex Rivière & C. Rivière	MC	Chaves BE 335
Oryzoideae		
<i>Oryza sativa</i> L.	EM	Chaves BE 320
Pooideae		
<i>Holcus lanatus</i> L.	EM	Chaves BE 332
Arundinoideae		
<i>Arundo donax</i> L.	MC	Chaves BE 284
Aristidoideae		
<i>Aristida longifolia</i> Trin.	FH	Chaves BE 267
<i>Aristida setifolia</i> Kunth	FH	Chaves BE 270
Panicoideae		
<i>Cenchrus purpureus</i> (Schumach.) Morrone	FH	Chaves BE 286
<i>Echinolaena inflexa</i> (Poir.) Chase	FH	Chaves BE 285
<i>Melinis repens</i> (Willd.) Zizka	FH	Chaves BE 261
<i>Paspalum maritimum</i> Trin.	EM	Chaves BE 280
<i>Trachypogon spicatus</i> (L.f.) Kuntze	FH	Chaves BE 269
Chloridoideae		
<i>Dactyloctenium aegyptium</i> (L.) Willd.	MC	Chaves BE 266
<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.	MC	Chaves BE 279
<i>Sporobolus virginicus</i> (L.) Kunth	FH	Chaves BE 274

Nota: As tipologias das lígulas seguem Metcalfe (1960) e Longhi-Wagner *et al.* (2001). O tipo de lígula para cada espécie segue o que foi proposto por Edson-Chaves *et al.* (ver capítulo 2). Acrônimos dos tipos de lígula—EM. *eciliate membrane*; MC – *membranous-ciliate*; FH. *a fringe of hairs*. Optamos por manter os tipos de lígula na língua inglesa.

Tabela 2. Plastocronos em que é observado cada um dos estádios de estádios de desenvolvimento das lígulas de 15 espécies analisadas neste estudo. Legenda: traço, indica estágio não observado; asterisco indica que não foi observado a pré-lígula, mas observado clara distinção entre os domínios da bainha e lâmina foliar.

Tipo de lígula / Subfamília (símbolo) / Espécie	Estádio de desenvolvimento		
	Pré-lígula	Inicial	Tardio
Lígula membranosa			
★ <i>Oryza sativa</i>	-	P3	P4
★ <i>Holcus lanatus</i>	P3	P4	P5
⊙ <i>Paspalum maritimum</i>	P3	P3-P4	P5
⊙ <i>Trachypogon spicatus</i>	-	P3	P5
Lígula membranosa-ciliada			
✦ <i>Phyllostachys aurea</i>	-	P3	P4
✦ <i>Raddia brasiliensis</i>	-	P2	P4
○ <i>Arundo donax</i>	P3	P5-P6	P7
● <i>Dactyloctenium aegyptium</i>	P3	P3	P4
● <i>Eleusine indica</i>	P3	P3	P5
Lígula ciliada			
⊙ <i>Aristida longifolia</i>	P2*	P3-P4	P5
⊙ <i>Aristida setifolia</i>	P2*	P2-P3	P4
⊙ <i>Cenchrus purpureus</i>	P2*	P3-P4	P5
⊙ <i>Echinolaena inflexa</i>	P2	P3	P4
⊙ <i>Melinis repens</i>	-	P2	P3
● <i>Sporobolus virginicus</i>	P2*	P3-P4	P4-P5

Nota 1: *Streptochaeta spicata* não foi incluída na tabela, uma vez que não foi observado nenhum dos três estádios de desenvolvimentos.

Nota 2: Símbolos que representam as subfamílias; quadrado – subfamílias que divergiram primeiro, estrela – clado BOP, círculo – clado PACMAD. Anomochlooideae (□), Bambusoideae (✦), Oryzoideae (★), Pooideae (★) Arundinoideae (○), Aristidoideae (⊙), Panicoideae (⊙), Chloridoideae (●).

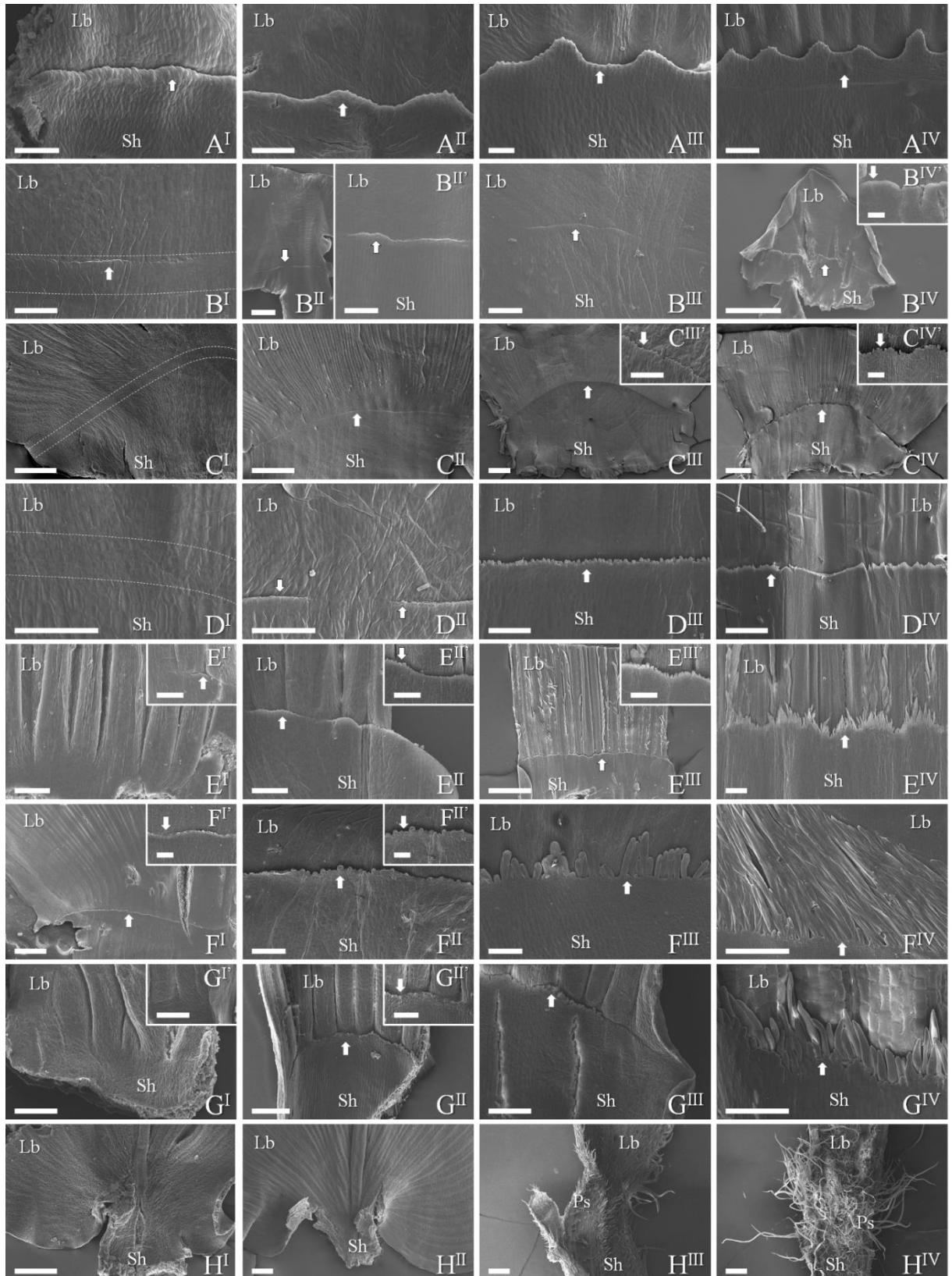


Figura 1 – Desenvolvimento de lígulas do tipo eciliate membrane (A e B), membranosa-ciliada (C e D) e ciliadas (E, F e G), além de espécie com lígula ausente (H), sob microscopia eletrônica de varredura. A. Plastocrono 4 (P4) (A^I e A^{II}) e plastocrono 5 (P5) (A^{III} e A^{IV}) de *Holcus lanatus*; B. P3 (B^I), P4 (B^{II} e B^{III}) e P5 (B^{IV}) de *Paspalum maritimum*; C. P3 (C^I e C^{II}) e P4 (C^{III}

e C^{IV}) de *Arundo donax*; D. P3 (D^I e D^{II}) e P4 (D^{III} e D^{IV}) de *Eleusine indica*; E. P2 (E^I), P3 (E^{II}), P4 (E^{III}) e P5 (E^{IV}) de *Aristida longifolia*; F. P3 (F^I), P4 (F^{II} e F^{III}) e P5 (F^{IV}) de *Cenchrus purpureum*; G. P2 (G^I), P3 (G^{II} e G^{III}) e P4 (G^{IV}) de *Sporobolus virginicus*; H. P2 (H^I e H^{II}) e P3 (H^{III} e H^{IV}) de *Streptochaeta spicata*. Região limitada pelas linhas pontilhadas (B^I, C^I e D^I) indicam a banda pré-ligular; seta branca indica a lígula em formação. Figuras indicadas pela aspa simples (') são detalhes das imagens. Barra: 50µm (A^I, A^{II}, A^{III}, B^I, B^{IV}', C^{III}', C^{IV}', D^I, D^{II}, D^{III}, E^I, E^I', E^{II}, E^{II}', E^{III}', E^{IV}, F^I, F^{II}', G^I, G^I', G^{II}', G^{III} e G^{IV}), 100µm (A^{IV}, B^{II}', B^{III}, F^{II}, F^{III} e G^{II}), 250µm (C^I, D^{IV}, E^{IV}, H^I, H^{II}, H^{III} e H^{IV}) e 500 µm (B^{II}, B^{IV}, C^{II}, C^{III}, C^{IV}, E^{III} e F^I).

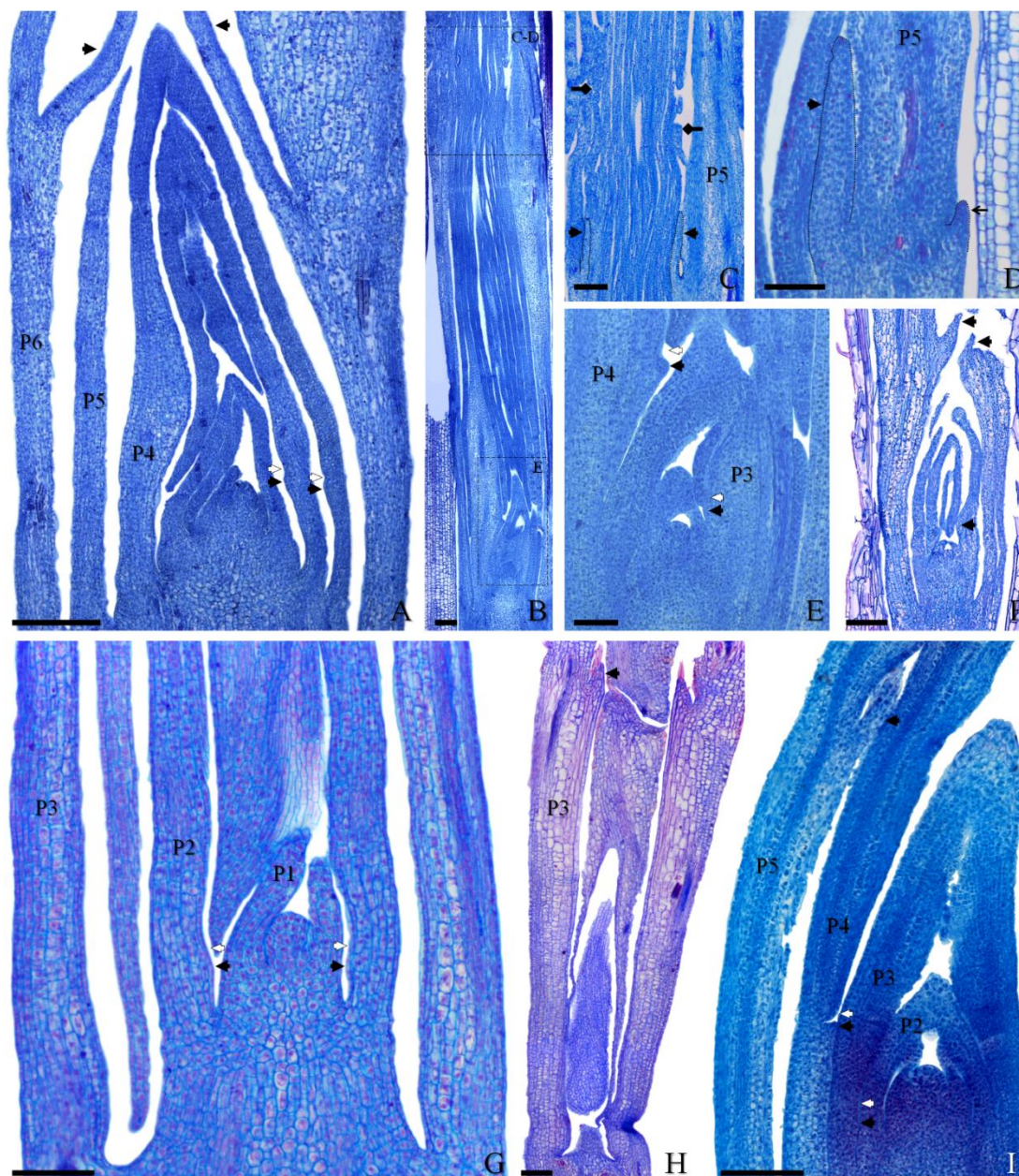


Figura 2 – Desenvolvimento de lígulas (seta triangular) do tipo eciliate membrane (A), membranosa-ciliada (B-F) e a fringe of hairs (G-I) em seções longitudinais observadas em microscopia de luz. A. estágio inicial (P3) e de crescimento (P5) das lígulas de *Trachypogon spicatus*; B-E. estágio inicial (P3) e de crescimento (P5) das lígulas de *Phyllostachys aurea*, observa-se ainda as fimbrias (seta quadrada) e lígula externa (seta estreita) em P5; F. estágio inicial (P3) e de crescimento (P4) das lígulas de *Raddia brasiliensis*; G. estágio inicial (P2) das lígulas de *Aristida longifolia*; H. estágio de crescimento (P3) das lígulas de *Echinolaena inflexa*; I. estágio inicial (P3) e de crescimento (P5) das lígulas de *Sporobolus virginicus*. A seta branca indica a constrição acima da região ligular que ocorre no estágio inicial de desenvolvimento ligular. Barra: 100µm (D-I) e 200µm (A-C).

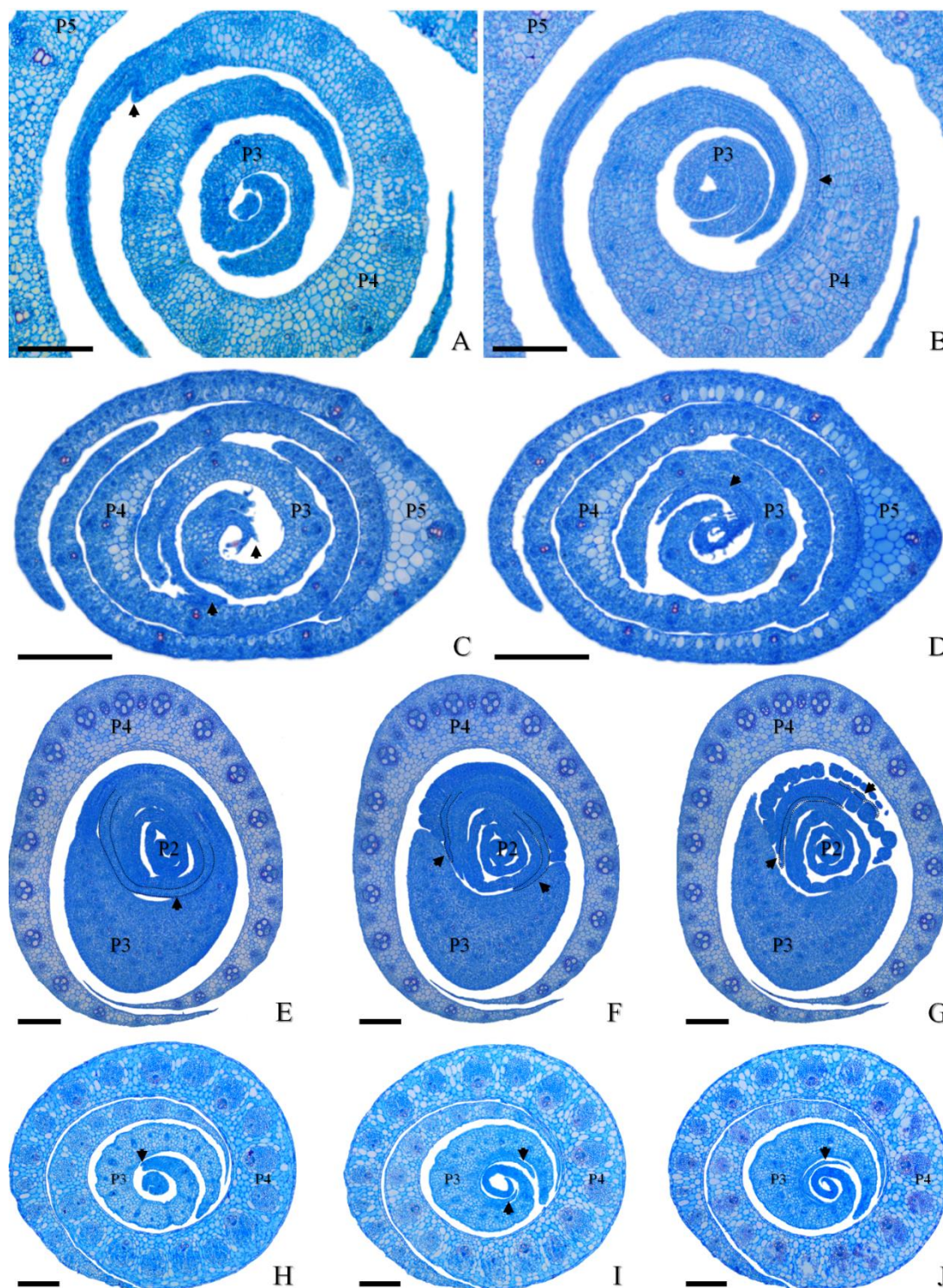


Figura 3 – Desenvolvimento de lígulas (seta triangular) do tipo eciliate membrane (A-B) e membranosa-ciliada (C-J) em seções transversais observadas em microscopia de luz. A-B. *Trachypogon spicatus*; C-D. *Dactyloctenium aegyptium*; E-G. *Phyllostachys aurea*, nota-se que a individualização da lígula ocorre antes da formação e individualização das fímbrias (seta quadrada); H-J. *Raddia brasiliensis*. Barra: 100 μ m (A-B) e 200 μ m (C-J).

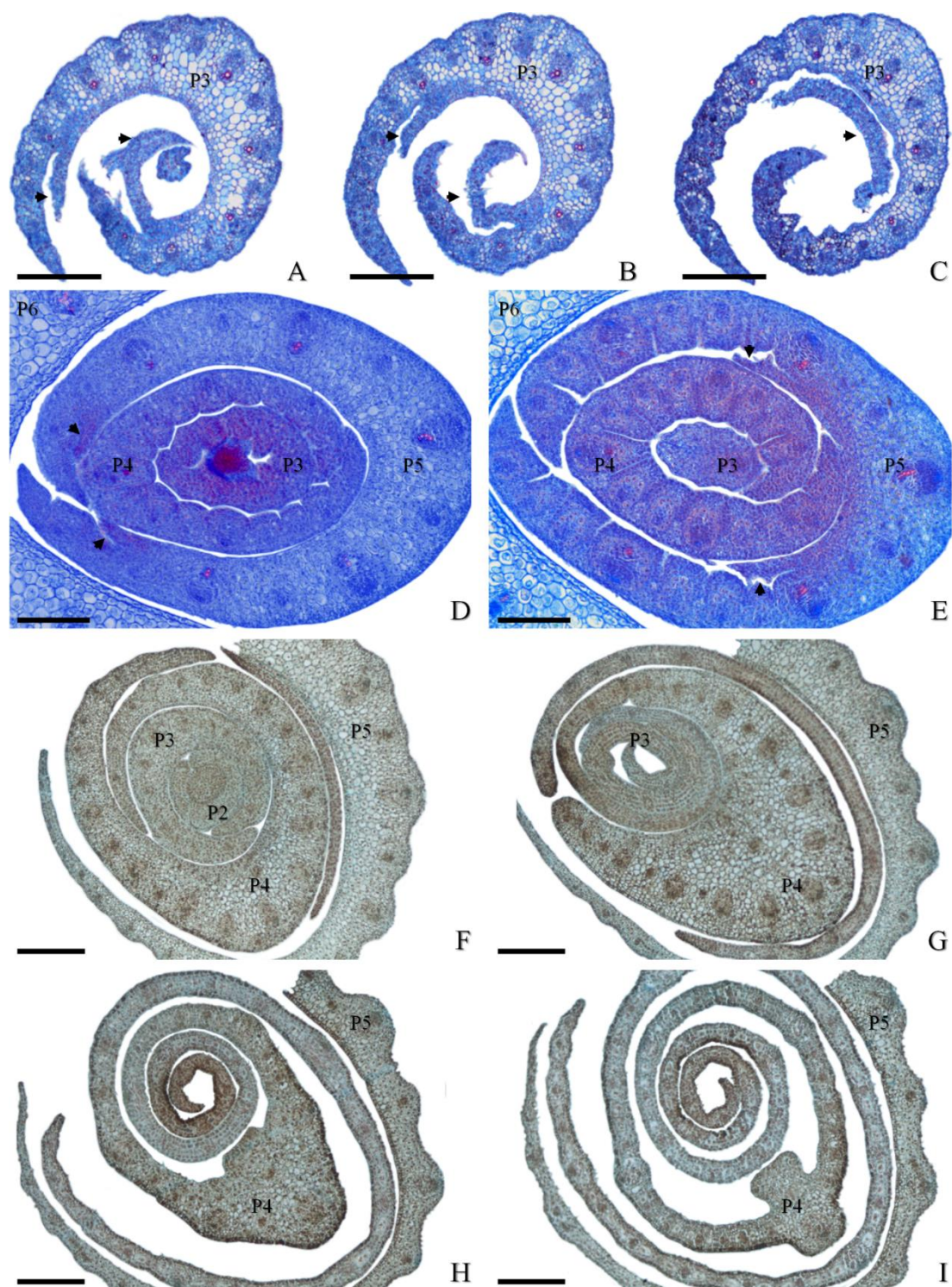


Figura 4 – Desenvolvimento de lígulas (seta triangular) do tipo fringe of hairs (A-E) em seções transversais observadas em microscopia de luz. A-C. *Echinolaena inflexa*; D-E. *Sporobolus virginicus*. As análises ainda evidenciam a ausência de lígula de *Streptochaeta spicata* (F-I), tomando como base o P4, na imagem F observa-se apenas bainhas, em G o ápice da bainha, em H base da lâmina foliar e em I lâmina foliar totalmente desenvolvida. Barra: 100 μ m (D-E) e 200 μ m (A-C e F-I).

Considerações finais

As lígulas de Poaceae mostram-se como uma importante estrutura diagnóstica, podendo ocorrer na porção ventral (mais comum) ou dorsal das folhas (folhas do colmo ou folhas do ramo). Morfológicamente, há 3-4 tipologias comuns encontradas na literatura: membranosa, membranosa-ciliada (que pode se dividir em *ciliolate membrane* e *ciliate membrane*) ou ciliada. As espécies ainda podem ser definidas como homoligulada ou heteroligulada e vascularizada e não vascularizada, podendo apresentar dimorfismo quanto à vascularização. As demais características morfológicas encontradas na literatura (p.ex. tamanho e formato da margem) são mais frequentes para lígulas membranosas.

Quanto à representatividade dos tipos de lígula na família, foi diagnosticado que do ponto de vista quantitativo, as lígulas ventrais membranosas são as mais comuns especialmente no clado BOP, Pharoideae mostra-se como única subfamília em que há predominância de lígulas membranosas-ciliadas; as lígulas ciliadas são mais comuns em Anomochlooideae e no Clado PACMAD. Lígulas dorsais são comuns em Pharoideae e Bambusoideae (Bambusae e Arundinarieae). Considerando a grande variação estrutural, desde o ano de 1800 foram propostas cinco diferentes hipóteses para tentar definir a lígula em Poaceae, destas as mais frequentes foram: (i) lígulas como extensão do ápice da bainha, e (ii) lígula como uma região específica das folhas de gramíneas.

As análises ontogenéticas realizadas com espécies de diferentes morfologias e em distintas subfamílias corrobora a ideia de que a lígula é uma extensão do ápice da bainha foliar, uma vez que: (i) não apresenta separação na fase de primórdio foliar, (ii) apresenta uma constrição na porção superior das lígulas em estágio inicial, e (iii) a separação/individualização de fato ocorre no estágio tardio concomitante ao alongamento da bainha. Todavia, do ponto de vista morfológico pode ser considerada como uma estrutura peculiar devido apresentar diversas características com valor diagnóstico para a taxonomia de Poaceae.

Além dos aspectos morfológicos comumente descritos na literatura, observamos que a inserção da lígula na bainha pode apresentar, pelo menos, seis padrões diferentes que também poderiam auxiliar a distinguir as espécies. Tais padrões têm relação direta com a formação e crescimento da lígula. A análise morfológica também identificou, para algumas espécies, certas incongruências dos tipos de lígulas observados com o relatado na literatura, demonstrando que este caráter precisa ser verificado com mais detalhes nas espécies, inclusive para ter uma melhor compreensão da sua história evolutiva na família.

No que concerne à reconstrução do caráter ancestral das lígulas de Poaceae, com base nos dados do GrassBase, observamos que o ancestral de gramíneas apresenta homoliguladas e ciliadas; no entanto, há mudandas de estado de caráter para lígulas membranosas (predominantemente no clado BOP) com inversões pontuais no grupo. O clado PACMAD mantém a característica ancestral com reversões para o tipo membranoso, especialmente em Panicoideae. Não há uma linearidade entre as mudanças nos estados de caráter. Em Poaceae, ao contrário do que ocorre em outras famílias de monocotiledôneas, a característica de lígula ausente aparentemente é derivada. Todavia, estudos morfológicos, anatômicos e ontogenéticos de *Streptochaeta spicata* (Anomochlooideae) demonstram que esta espécie não apresenta lígula evidente, nem lígula latente, caracterizando-a como lígula ausente. Esta informação, além de apresentar valor taxonômico, mostra-se com importante implicação evolutiva uma vez que pode caracterizar que o ancestral de Poaceae não apresentava lígulas (como é comum em outras Poales) e que este caráter se diversificou grandemente dentro da família, já nas primeiras linhagens.

Anatomicamente, diferente do que é comumente relatado em alguns trabalhos, as lígulas apresentam grande variação estrutural, principalmente no que se refere à(o): bordo, indumento da face abaxial e da região marginal, número de camadas do parênquima de preenchimento, presença ou ausência de espaços intercelulares no parênquima e à presença de esclerênquima e sistema vascular.

Considerando que estudos morfoanatômicos e ontogenéticos da região ligular das folhas de Poaceae ainda são incipientes, este trabalho trouxe, por meio de diferentes abordagens, uma melhor definição deste caráter na família, bem como também ampliou o conhecimento sobre a diversidade morfológica e anatômica das lígulas de gramíneas; ao mesmo tempo que corrige certas incongruências observadas na literatura. Todavia, também instigam muitas perguntas, algumas das quais estão expostas ao longo do texto, que igualmente deveriam ser respondidas o quanto antes para a melhor compreensão dessa estrutura, de modo que outros estudos acurados da lígula ainda se fazem necessário.

Biografia

Bruno Edson-Chaves nasceu em Fortaleza, Ceará, Brasil, em 18 de janeiro de 1988. Sempre gostou de explorar a natureza, tendo decidido fazer Biologia para estudar plantas ainda no início do Ensino Médio. Em 2005 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Ceará (UECE), tendo estagiado nos laboratórios de Carcinicultura, Botânica e Ecologia, sendo que neste último iniciou seus estudos com Anatomia ecológica em espécies de *Croton* em 2006. Em 2007, o curso “Técnicas aplicadas em Anatomia Vegetal” na XXX Reunião Nordestina de Botânica (Crato-CE) mostrou quão interessante e diversa é a Anatomia Vegetal, sendo decisivo para escolher essa linha de pesquisa como área de atuação. Graduou-se em Licenciatura (2008) e Bacharelado (2010) em Ciências Biológicas na UECE. Sua monografia, fruto dos trabalhos desenvolvidos na Iniciação Científica ao longo da graduação, teve enfoque na anatomia foliar de espécies de *Croton* da Caatinga, sob orientação do Prof. Dr. Oriel Herrera Bonilla.

Em 2010 mudou-se para Brasília-DF, onde iniciou o Mestrado em Botânica na Universidade de Brasília. Além de conhecer e explorar o Cerrado, foi apresentado à anatomia de Poaceae pela Prof^a. Dr^a. Dalva Graciano Ribeiro, que o orientou nos estudos sobre anatomia da lâmina foliar e radicular de espécies de *Saccharum* (Poaceae), tendo defendido a dissertação em julho de 2012. Em 2013, assumiu como professor substituto de Botânica do curso de licenciatura em Ciências Biológicas na UECE. Em 2016 assumiu como professor efetivo de Botânica da Faculdade de Educação, Ciências e Letras de Iguatu (FECLI), unidade da UECE no município de Iguatu-CE.

Em dezembro de 2017 iniciou o doutorado em Ciências Biológicas/Botânica na Universidade de São Paulo, enquanto continuava a ministrar aulas na UECE. Desta vez, sob orientação da Prof^a Dr^a. Gladys Flávia de A. Melo-de-Pinna, a sua pesquisa foi dedicada à compreensão das lígulas de Poaceae por meio de uma abordagem morfológica, anatômica e ontogenética. Para este estudo realizou diversas expedições para coletas de gramíneas em ambientes bem distintos do Ceará, Brasília e São Paulo. Os resultados deste trabalho estão apresentados nesta tese. Atualmente, é Coordenador do Núcleo de Especialistas em Anatomia Vegetal da Sociedade Botânica do Brasil (2021-2023), bem como também compõe a equipe organizadora do canal do YouTube AnatoEncontros e a moderação da página [anomiavegetal_sbb](#) no Instagram.