José Hernades Lopes Filho

**Desenvolvimento da Folha e Axila
Foliar em Portulacaceae e Talinaceae:
Homologias Primárias no Clado ACPT**

São Paulo
2010

José Hernandes Lopes Filho

Desenvolvimento da folha e axila foliar em
Portulacaceae e Talinaceae: homologias primárias
no clado ACPT.

Leaf and leaf axil development in Portulacaceae
and Talinaceae: primary homologies in ACPT
clade.

São Paulo

2010

José Hernandes Lopes Filho

Desenvolvimento da folha e axila foliar em
Portulacaceae e Talinaceae: homologias
primárias no clado ACPT.

Leaf and leaf axil development in
Portulacaceae and Talinaceae: primary
homologies in ACPT clade.

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo para a obtenção de Título
de Mestre em Botânica, na Área de
Anatomia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Gladys
Flávia de A. Melo-de-Pinna

São Paulo

2010

Hernandes-Lopes, José

Desenvolvimento da folha e axila foliar em
Portulacaceae e Talinaceae: homologias
primárias no clado ACPT.

98 páginas.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Botânica.

1. Portulacineae; 2. Axila foliar; 3.
Desenvolvimento foliar; 4. Anatomia; 5.
Portulaca; 6. *Talinum*.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Gladys Flávia de A. Melo de Pinna
Orientadora

Aos meus avós, pais e irmãs,
por todo o carinho, apoio e
compreensão.

“If you wish to make an apple pie from scratch, you must first invent the Universe”

- Carl Sagan

Agradecimentos

À Profa. Gladys Flávia Melo-de-Pinna, minha querida orientadora por quem tenho um imenso carinho. Alguém que muito me ensinou ao longo de todos estes anos, sempre muito atenciosa e prestativa, transmitindo um entusiasmo contagiante. Agradeço não só por todo o apoio e incentivo na área acadêmica, mas principalmente por ser essa pessoa maravilhosa, gentil, e acima de tudo amiga, sempre buscando dar o seu melhor como pessoa. Digo seguramente que você se tornou parte da minha família, não biológica, mas da biologia =).

Aos meus colegas (e ex-colegas) de orientadora: Emília Arruda, Renata Lemos, Rafael Cruz, Carla Verna, Vanessa Godofredo, Natalia Antonucci, Thais Muntoreanu, Maria Cristina Zampieri, Roberta Magna, Diego Mañas, Mário Albino, “*et. al.*”, por todo o apoio na revisão de textos, discussões enriquecedoras, ajudas emergenciais no laboratório, e pelo convívio agradável.

Gostaria de agradecer especialmente à Renata Lemos, por ter sido uma amiga tão próxima desde o começo da graduação. Procuramos estágio no Laboratório de Anatomia Vegetal juntos, e desde então temos sido companheiros de aventuras acadêmicas (e de academia também). Além de todo o companheirismo, agradeço pelas incontáveis “mãozinhas”, sejam elas em viagens de coleta, procedimentos no laboratório, discussões teóricas, revisões de textos, bolos deliciosos, e tantas outras coisas.

Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial também à minha querida amiga Emília Arruda, sempre presente, tanto nos momentos de diversão (e foram muitos, sempre me fazendo rir horrores [vide viagens de coleta]), bem como nos momentos de maior aperto. Embora agora você esteja longe, guardo um carinho muito grande por ti e sei que nossa amizade não diminuirá (guardo convites para palestrar na UFPE, não se esqueça...hehe).

À equipe de professores do Laboratório de Anatomia Vegetal: Profa. Berta Lange de Morretes, Profa. Nanuza Luiza de Menezes, Profa. Maria Emília Estelita, Profa. Verônica Angyalossy, Prof. Gregório Ceccantini, Profa. Gladys Flávia Melo-de-Pinna e Prof. Diego Demarco, por todo o apoio e conhecimento cedidos. Esta é uma das equipes de professores que mais transmitem a paixão pelo que fazem, tanto para nós do laboratório quanto para os alunos do curso de graduação.

Às técnicas do Laboratório de Anatomia Vegetal: Gisele Costa e Tássia da Santos, possuidoras de uma eficiência espantosa, mantendo sempre o laboratório em pleno funcionamento, e é claro, tornando a hora do almoço / café da tarde

sempre divertidos (aqui também não esquecendo do Gustavo Burin [Ari], Paula Jardins, Suzi da Silva e Viviane Jono).

A todos os graduandos e pós-graduandos que compartilharam o laboratório comigo ao longo destes seis anos e meio (incluindo os tempos de IC, caso contrário a nota CAPES do Depto. já teria diminuído muito =P). Sobretudo àqueles mais próximos (Gustavo Burin, Paula Elbl, Cristiane Gonçalves, Flávia Nascimento, Luiz Horta, entre tantos outros já citados ou não), por terem tornando minha estadia nesta “segunda casa” muito mais agradável e divertida.

À Profa. Alexa Paes Coelho (UEFS) pela identificação do material botânico, ao técnico Irwandro Pires pelo processamento do material destinado à microscopia eletrônica e à Profa. Eny Floh, por ceder seu microscópio e equipamento de registro fotográfico enquanto os nossos encontravam-se inoperantes.

Ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sobretudo ao Departamento de Botânica, por fornecer toda a infra-estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo primeiro e segundo ano de bolsa, respectivamente.

A todos os meus amigos de fora do laboratório, em especial ao Rafael Buono, pela infinita paciência e disposição em me ouvir e me ajudar, independente do pepino em questão, ao Thiago Francisco de Almeida, por todo o companheirismo de tão longa data (e sempre me enfiando nos mais sortidos pepinos), ao Fernando José Belmonte, pelas inúmeras horas de diversão que dividimos (faltaram as estatísticas aqui), e à Joice Savietto e Rodrigo Atique, com quem moro há mais de quatro anos, e que se tornaram praticamente uma família para mim.

Às minhas irmãzinhas queridas: Paula Hernandez Lopes e Renata Hernandez Lopes, sempre prontas para aprontar muita confusão, mas também para me apoiar quando necessário.

Aos meus pais, José Hernandez Lopes e Nelly Maria Rebelo da Silva, que sempre me apoiaram e incentivaram, me proporcionando toda a base necessária para chegar onde cheguei.

Por fim, aos meus avós, Yolanda Rebelo da Silva, João Hernandez Lopes e Ana Faria Lopes, por terem sido parte tão importante na minha criação, e também por saberem compreender meus longos períodos de ausência.

Índice

Introdução geral.....	11
Referências bibliográficas.....	23
Capítulo I - Homologias primárias no clado ACPT: um estudo da região da axila foliar em Portulacaceae e Talinaceae.....	27
Resumo.....	28
Abstract.....	29
Introdução.....	30
Materiais e métodos.....	32
Resultados.....	34
Discussão.....	38
Referências bibliográficas.....	49
Figuras.....	53
Capítulo II – Histogênese foliar em espécies de Portulacaceae e Talinaceae.....	65
Resumo.....	66
Abstract.....	67
Introdução.....	68
Materiais e métodos.....	69
Resultados.....	70
Discussão.....	76
Referências bibliográficas.....	81
Figuras.....	85
Considerações finais.....	93
Resumo.....	96
Abstract.....	97

Introdução Geral

Este capítulo busca introduzir ao leitor o atual cenário do conhecimento acerca das relações filogenéticas, bem como dos estudos de evolução de caracteres morfo-anatômicos, em um clado específico da ordem Caryophyllales.

A primeira delimitação de uma ordem com uma composição semelhante a aquela aceita atualmente para Caryophyllales foi proposta por Braun (1864 *apud* Cronquist & Thorne, 1994), recebendo o nome de ordem Caryophyllinae. Em sua proposta, a ordem reunia as famílias Nyctaginaceae, Chenopodiaceae, Amaranthaceae, Caryophyllaceae, Phytolaccaceae, Portulacaceae, Aizoaceae e Opuntiaceae (atual Cactaceae). Posteriormente, diversos autores realizaram tentativas de refinar a definição deste grupo. Eichler (1876 *apud* Cronquist & Thorne, 1994) propôs uma nova classificação, muito semelhante à de Braun, porém incluindo Polygonaceae, e para este grupo cunhou o termo Centrospermae, em referência ao tipo de placentação (central-livre ou basal) exibido por seus representantes. Em 1878, Eichler modificou sua classificação, incluindo em Centrospermae algumas famílias hoje aceitas como Caryophyllales, mas removendo a família Cactaceae (a qual associou de forma dúbia à Passifloraceae). A partir de então, a inclusão da família Cactaceae em Caryophyllales foi controversa, sendo muitas vezes separada em diferentes ordens ou mesmo compondo uma ordem de uma única família, Cactales, próxima a Caryophyllales (Cronquist & Thorne, 1994). Apenas com a descoberta de caracteres, além dos morfológicos clássicos, foi removida qualquer dúvida acerca de sua inclusão em Caryophyllales. Dentre estes caracteres podemos citar a presença de betalínas formando pigmentos (onde

normalmente estariam presentes antocianinas) e a presença de plastídios em elementos de tubo crivado, contendo um anel protéico periférico (enquanto normalmente estes plastídios contêm amido - Simpson, 2010). Finalmente, Cronquist (1968) chega a uma definição de Caryophyllales muito próxima da atualmente aceita. Atualmente Caryophyllales é composta por 34 famílias (Stevens, 2001; APGIII, 2009), sendo que algumas destas só passaram a ser incluídas na ordem após estudos baseados em dados moleculares (Simpson, 2010).

Em 1976, Thorne agrupou as famílias Cactaceae, Portulacaceae, Didieraceae, Basellaceae em um clado denominado de subordem Portulacineae. Como menciona Nyffeler (2007), recentemente diversos trabalhos vêm chamando este mesmo grupo por diferentes termos, tais como “*portulacaceous alliance*” (HersHKovitz, 1993), “*portulacaceous cohort*” (Applequist & Wallace, 2001), “*higher core Caryophyllales II*” (Hilu *et al.*, 2003), entre outros.

Embora existam diversos estudos sobre o assunto, as relações filogenéticas em Portulacineae ainda são incertas. Este fato surge como reflexo da predominância de estudos com base em caracteres morfológicos que muitas vezes não são escolhidos de forma apropriada, tornando as classificações artificiais, ou seja, não representando grupos naturais (monofiléticos). Mais recentemente, com o advento das técnicas de filogenia com base em dados moleculares, essas relações começaram a ser melhor compreendidas.

Ainda que Cactaceae seja facilmente reconhecida como monofilética, possuindo diversas sinapomorfias, sejam morfológicas, anatômicas ou moleculares, a busca pelo seu grupo irmão tem representado uma difícil tarefa.

Em 1931, Chorinsky propõe a proximidade entre “Portulacaceae” e Cactaceae com base na presença de tricomas axilares de espécies de *Anacampseros* (“Portulacaceae”), *Pereskia* e *Rhipsalis* (Cactaceae). Metcalfe & Chalk (1985) citam esta proposta, mas consideram que este caráter por si só não é convincente para o agrupamento das famílias.

Como relata Nyffeler & Eggli (2010), “Portulacaceae” foi descrita inicialmente por Adanson em 1763, incluindo espécies pertencentes a mais de 20 famílias reconhecidas atualmente. Posteriormente Jussieu (1789 *apud* Nyffeler & Eggli, 2010) estabeleceu uma circunscrição mais restrita à família, sob o nome de Portulacaceae, e posicionou esta entre Cactaceae (“Cacti”) e Aizoaceae (“Ficoideae”). Caracteres florais, como número e arranjo de pétalas, posição do ovário, bem como a morfologia do fruto, foram usados para a sua separação das famílias próximas. Contudo, ao longo das últimas décadas estudos passaram a sugerir que “Portulacaceae” trata-se na realidade de um grupo parafilético.

Carolin (1987), em uma revisão da família, levanta diversos problemas encontrados nas filogenias anteriores, sobretudo causados pela má interpretação de caracteres morfo-anatômicos. Neste mesmo trabalho, o autor propõe uma nova classificação baseada predominantemente em caracteres morfológicos (sendo os únicos caracteres anatômicos utilizados: diferentes tipos de tricomas e formato de células da epiderme do fruto). Embora considere como grupo externo o clado Cactaceae + Aizoaceae, fundamentado na proposta de Rodman *et al.* (1984) que atualmente seria considerada equivocada (o que poderia levar a uma polarização errônea de caracteres), Carolin (1987) faz algumas conclusões interessantes: a família estaria dividida em cinco subgrupos, sendo um deles composto pelo gênero

Portulaca L. juntamente com a tribo Anacampseroteae, compreendendo os gêneros *Anacampseros* L., *Avonia* G. D. Rowley e *Grahamia* Gill. Ex Hook. s.l. (incluindo *Talinaria* Brandegee, *Talinopsis* A. Gray, e *Xenia* Gerbaulet). Segundo Carolin (1987), este clado estaria bem sustentado, mas sua posição dentro da família ainda seria incerta. Vale à pena ressaltar ainda que o autor chama atenção para uma possível condição parafilética da família em relação à Basellaceae e Didiereaceae.

Uma série de trabalhos posteriores, baseados em dados morfológicos e moleculares, corrobora a condição parafilética de Portulacaceae, evidenciando clados mais relacionados à Basellaceae, Didiereaceae e Cactaceae.

Hershkovitz (1993) realiza um estudo cladístico que visa esclarecer a circunscrição de alguns gêneros de Portulacaceae. Embora não tenha incluído espécies de Cactaceae em sua análise, sugere a proximidade desta família com o clado contendo *Portulaca*, *Anacampseros*, *Talinaria*, *Talinopsis* e *Grahamia*, ressaltando que este último gênero seria o que mais se assemelha, em termos de hábito e lenhosidade, a *Pereskia* (gênero basal de Cactaceae). De qualquer maneira, o autor menciona que nenhuma abordagem mais conclusiva seria possível com os dados conhecidos na época.

Applequist & Wallace (2001) utilizam dados moleculares da sequência *ndhF* na tentativa de elucidar o que os trabalhos prévios, utilizando apenas morfologia, não foram capazes. Em sua árvore mais parcimoniosa, surge uma politomia entre *Portulaca* + Anacampseroteae, Cactaceae e *Talinum* + *Talinella*. Embora outros dados moleculares (Hershkovitz & Zimmer, 1997) sugiram que Cactaceae seja basal em relação às espécies pertencentes aos outros dois clados, aqui existe uma fraca

evidência de que *Talinum* + *Talinella* seria basal, enquanto Cactaceae estaria como grupo irmão de Anacampseroteae + *Portulaca*.

Na figura 1 estão apresentadas de forma resumida as principais propostas de relações filogenéticas do grupo até 2001.

Figura 1. Hipóteses de relações entre taxa selecionados do clado ACPT e outras “Portulacaceae”. (A) Carolin (1987), baseado em análise cladística de dados morfológicos. (B) Hershkovitz (1993), baseado em análise cladística de dados morfológicos. (C) Hershkovitz & Zimmer (1997), baseado em dados moleculares. (D) Applequist & Wallace (2001), baseado em dados moleculares. Retirado de Nyffeller (2007).

Nyffeller (2007) realiza um estudo filogenético em Cactaceae e grupos próximos, baseado em dados moleculares do DNA mitocondrial e plastidial, focando sua análise no que chamou de “clado ACPT”, formado pela tribo Anacampseroteae, a família Cactaceae e os gêneros *Portulaca* e *Talinum*. A análise combinada das diferentes seqüências utilizadas sugere que, mesmo que apenas moderadamente sustentado, Cactaceae deve ter como grupo irmão a tribo Anacampseroteae, estando *Portulaca* e *Talinum* basais a este clado. O autor observa que, frente ao acúmulo de evidências apontando para a condição parafilética de Portulacaceae,

uma revisão nomenclatural deveria ser realizada no clado ACPT, sugerindo a criação de uma superfamília contendo Cactaceae e três famílias monogenéricas que contenham *Portulaca*, *Anacampseros* e *Talinum*.

Figura 2. Hipótese mais recente das relações filogenéticas em Portulacineae, baseada em dados moleculares das seqüências *matK* e *ndhF*. Retirado de Nyffeler & Eggli (2010).

Por fim, a filogenia mais recente e completa até o presente momento é a de Nyffeler & Eggli (2010) baseada nas seqüências *matK* e *ndhF* do genoma do cloroplasto (Fig. 2). Neste trabalho os autores desmembram “Portulacaceae”, agrupando seus diferentes gêneros às famílias relacionadas ou criando novas famílias, de maneira a aceitar apenas grupos monofiléticos. Nesta nova classificação a subordem Portulacineae é composta por oito famílias: Anacampserotaceae (*Anacampseros*, *Grahamia* e *Talinopsis*), Basellaceae, Cactaceae, Didiereaceae (incluindo *Calyptrotheca*, *Ceraria* e *Portulacaria*), Halophytaceae, Montiaceae (incluindo Hectorellaceae, *Calandrinia*, *Cistanthe*, *Claytonia*, *Lewisia*, *Montia*, *Phemeranthus*), Portulacaceae (contendo apenas o gênero *Portulaca*), e Talinaceae (*Amphipetalum*, *Talinella* e *Talinum*). Embora as relações entre as famílias não sejam bem resolvidas ou sustentadas, o clado ACPT aparece neste trabalho como bem consistente.

A busca pela delimitação das relações filogenéticas na subordem Portulacineae levanta outra questão interessante: o estudo da evolução dos caracteres morfo-anatômicos no grupo.

Em Portulacineae é freqüente a ocorrência de caracteres como: crescimento secundário “normal” (em oposição à presença de floema interno comum em Caryophyllales), cristais de oxalato de cálcio na epiderme do caule, células do parênquima floemático contendo fitoferritina, par interno de bractéolas, perianto petalóide (Stevens, 2001). Contudo, a característica que mais chama atenção no grupo é a adaptação a ambientes xéricos: das aproximadamente 2200 espécies, 90% são classificadas como suculentas (Hunt, 2006). Nesta linhagem é comum a presença

de tecido suculento no caule, folhas, ou estruturas subterrâneas; metabolismo CAM; e a ocorrência em locais quentes e suscetíveis à seca (Nyffeler *et al.*, 2008).

O xerofitismo é facilmente reconhecido, especialmente em Cactaceae cujas espécies geralmente possuem alto grau de redução foliar, transferindo a função de fotossíntese para um caule suculento. Contudo, diversas outras formas de vida (relacionadas à suculência) podem ser reconhecidas em Portulacineae: (1) herbáceas perenes com folhas suculentas persistentes, formando rosetas (*Lewisia*); (2) herbáceas perenes com raízes carnosas e folhas reduzidas ou suculentas (*Anacampseros* e *Avonia*); (3) herbáceas anuais com caules prostrados e folhas suculentas (*Portulaca*); (4) pequenos arbustos ou árvores paucicaulescentes com folhas suculentas (*Ceraria*), e com diferenciação de ramos longos e ramos curtos (*Didierea*); (5) arbustos sublenhosos com raízes tuberosas e folhas como a de herbáceas (*Talinum*); (6) trepadeiras pouco suculentas e base espessada (*Basella*) (Nyffeler *et al.*, 2008).

O surgimento de diferentes estratégias adaptativas ao ambiente xérico em grupos tão próximos filogeneticamente despertou o interesse de diversos pesquisadores em entender como teria sido o ancestral dessa linhagem, e em que ambiente teria ele vivido.

Um dos aspectos abordados na literatura diz respeito à redução da lâmina foliar. Cactaceae representa um grupo especialmente interessante neste sentido por possuir grande diversidade quanto ao grau de redução foliar. Esta diversidade está diretamente relacionada aos seus diferentes grupos. *Pereskia*, clado basal, possui folhas muito semelhantes às aquelas comumente encontradas nas demais eudicotiledôneas, apresentando limbo expandido e pecíolo (Boke, 1954; Gibson &

Nobel, 1986). Em Opuntioideae e *Maihuenia*, embora algumas espécies apresentem folhas persistentes e expandidas, na maioria ocorre redução e abscisão da lâmina foliar, sendo apenas encontradas nas regiões mais apicais dos cladódios (Gibson, 1977; Boke, 1980; Gibson & Nobel, 1986). Redução ainda maior ocorre na subfamília Cactoideae, cujas espécies normalmente não desenvolvem a lâmina foliar. Em tais casos, após a formação do primórdio foliar no ápice caulinar, a base da folha se expande, podendo muitas vezes se tornar uma longa projeção, enquanto o resto do primórdio foliar cessa seu desenvolvimento (Boke 1951; 1952; 1953; Mauseth 2007).

A transição entre presença de folhas “comuns”, (*Pereskia*), e ausência de folhas (Cactoideae), passando por estágios onde ocorrem folhas reduzidas e caducas (Opuntioideae e *Maihuenia*), levou os pesquisadores a olharem para as subfamílias de Cactaceae como representantes de uma gradação na redução foliar, partindo do que seria uma folha comum de eudicotiledônea. Na realidade, a existência de espécies com diferentes graus de redução foliar dentro da subfamília Opuntioideae fez com que muitos autores acreditassem que esta subfamília seria intermediária e que suas espécies com folhas maiores e mais persistentes (e.g. *Pereskiaopsis*), fossem basais dentro do grupo (Britton & Rose, 1919; Gibson & Nobel, 1986; Griffith 2004).

Contudo, recentes estudos envolvendo Cactaceae e seus grupos mais próximos apontam para uma realidade um pouco diferente. Griffith (2009), em um estudo sobre evolução de caracteres, demonstra que o ancestral de Opuntioideae deve ter possuído folhas reduzidas e caducas, sendo as folhas expandidas e persistentes um caso de reversão. Mauseth (2007) também chama a atenção para o fato de que o estágio no qual cessa o desenvolvimento das folhas em Cactoideae

varia de acordo com a espécie. Esta variação não segue um padrão filogenético, devendo representar um caso de múltiplas evoluções dentro do grupo.

Na realidade, Griffith (2004) já chama a atenção para o fato de que embora o gênero *Pereskia* tenha sido proposto como clado basal da família Cactaceae, tendo em vista suas folhas não suculentas, expandidas e persistentes, talvez estes caracteres sejam na realidade casos de reversão. Com o atual paradigma filogenético (Nyffeler & Eggli, 2010), onde Cactaceae está inserido no clado ACPT (Nyffeler, 2007), e possivelmente como grupo irmão de Anacampsetoraceae, torna-se claro que a condição encontrada em *Pereskia* não pode ser tão prontamente indicada como plesiomórfica.

Outra potencial fonte de informação acerca das relações filogenéticas no clado ACPT é a região da axila foliar. Como mencionado anteriormente, Chorinsky (1931) propôs a proximidade de “Portulacaceae” e Cactaceae baseada na presença de tricomas presentes nesta região.

Contudo, outros caracteres interessantes ocorrem na axila foliar em diferentes espécies do grupo. Cactaceae, por exemplo, apresenta ramos extremamente reduzidos na região da axila. Este ramo representa uma estrutura exclusiva da família, a aréola, e é considerada uma de suas sinapomorfias (Gibson & Nobel, 1986).

Um dos principais pesquisadores envolvidos no estudo deste caráter foi Norman H. Boke, que em uma série de trabalhos publicados principalmente nas décadas de 1940 e 1950, descreve sua estrutura e desenvolvimento.

Gibson & Nobel (1986) resumizam os trabalhos de N. Boke descrevendo a histogênese das aréolas: inicialmente, o meristema areolar surge no local onde uma

gema axilar normalmente se formaria, ou seja, na região adaxial da base foliar. Este meristema produz então um par de espinhos adjacentes à folha, denominado de lado abaxial do meristema areolar. Geralmente os espinhos subseqüentes são formados apenas no lado abaxial do meristema, contudo, em alguns casos os últimos espinhos formados podem estar posicionados no lado adaxial. A formação dos espinhos começa nas bordas do meristema areolar, da mesma maneira que os primórdios foliares. Por um breve período os espinhos crescem pelo ápice, contudo, logo esse crescimento cessa e apenas ocorrem divisões celulares em sua região basal, chamada de meristema intercalar ("*intercalary meristem*") ou zona meristemática basal ("*basal meristematic zone*"). Por fim, as células dos espinhos são esclerificadas, inclusive na região meristemática.

Outros produtos do meristema areolar são os gloquídeos, característicos das Opuntioideae. Estas estruturas são descritas como pequenos espinhos e formados da mesma maneira que estes. Contudo, os gloquídeos não são esclerificados em sua região basal e, portanto, são facilmente destacáveis da aréola (Boke, 1944; Gibson & Nobel, 1986).

Boke (1944) observa a presença de órgãos intermediários entre espinhos e folha, assim como entre gloquídeos e folhas, e que variam de formas extremamente espinescentes a órgãos praticamente folhosos. As formas mais intermediárias possuem o aspecto de uma folha diminuta com o ápice pontiagudo e serrilhado. Segundo o autor, algumas características, presentes apenas em folhas ou apenas em espinhos verdadeiros podem aparecer nessas formas intermediárias: gema

rudimentar na região axilar (espinhos verdadeiros não as possuem); vascularização (presentes apenas nas folhas).

Embora existam diversos trabalhos na literatura que relatem a estrutura e o desenvolvimento foliar e de outros caracteres presentes na região da axila da folha em Cactaceae, poucos estudos investigam outros grupos do clado ACPT. A falta de maiores informações, sobretudo que abordem a anatomia com um enfoque filogenético, considerando as recentes mudanças na compreensão das relações entre os grupos, motivou o desenvolvimento da presente dissertação. A seguir serão apresentados dois capítulos com resultados inéditos sobre a estrutura da axila foliar e o desenvolvimento da folha de espécies de Portulacaceae e Talinaceae.

Referências bibliográficas

- Angiosperm Phylogeny Group (APG). 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society** **161**: 105 – 121.
- Applequist, W. L. & Wallace, R. S. 2001. Phylogeny of the Portulacaceous Cohort Based on ndhF Sequence Data. **Systematic Botany** **26**: 406 – 419.
- Boke, N. H. 1944. Histogenesis of the Leaf and Areole in *Opuntia cylindrica*. **American Journal of Botany** **31**: 299 – 316.
- Boke, N. H. 1951. Histogenesis of the Vegetative Shoot in *Echinocereus*. **American Journal of Botany** **38**: 23 – 38.
- Boke, N. H. 1952. Leaf and Areole Development in *Coryphantha*. **American Journal of Botany** **39**: 134 – 145.
- Boke, N. H. 1953. Tubercle Development in *Mammillaria-Heyderi*. **American Journal of Botany** **40**: 239 – 247.
- Boke, N. H. 1954. Organogenesis of the Vegetative Shoot in *Pereskia*. **American Journal of Botany** **41**: 619 – 637.
- Boke, N. H. 1980. Developmental Morphology and Anatomy in Cactaceae. **Bioscience** **30**: 605 – 610.

- Britton, N. L. & Rose, J. N. 1919-1923. **The Cactaceae**. Carnegie Institution, New York.
- Carolin, R. 1987. A Review of the Family Portulacaceae. **Australian Journal of Botany** **35**: 383 – 412.
- Chorinsky, F. 1931. Vergleichend-anatomische Untersuchungen der Haargebilde bei Portulacaceen und Cactaceen. **Österreichische Botanische Zeitschrift** **80**: 308 – 327.
- Cronquist, A. 1968. **The evolution and classification of flowering plants**. Columbia University Press, New York.
- Cronquist, A. & Thorne, R. F. 1994. Nomenclatural and taxonomic history. Pags. 5-25. *In* H.D. Behnke & T.J. Mabry (Eds.) **Caryophyllales: Evolution and Systematics**. Springer-Verlag, New York.
- Gibson, A. C. 1977. Vegetative Anatomy of *Maihuenia* (Cactaceae) with some Theoretical Disucssions of Ontogenetic Changes in Xylem Cell Types. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** **104**: 35 – 48.
- Gibson, A. C. & Nobel, P. S. 1986. **The Cactus Primer**. Harvard University Press, Cambridge.
- Griffith, M. P. 2004. What Did the First Cactus Look like? An Attempt to Reconcile the Morphological and Molecular Evidence. **Taxon** **53**: 493 – 499.
- Griffith, M. P. 2009. Evolution of leaf and habit characters in Opuntioideae (Cactaceae): reconstruction of ancestral form. **Bradleya** **27**: 49 – 58.
- Herskovitz, M. A. 1993. Revised Circumscriptions and Subgeneric Taxonomies of *Calandrinia* and *Montiopsis* (Portulacaceae) with Notes on Phylogeny of the Portulacaceous Alliance. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **80**: 333 – 365.
- Herskovitz, M. A. & Zimmer, E. A. 1997. On the evolutionary origins of the cacti. **Taxon** **46**: 217 – 232.
- Hilu, K. W.; Borsch, T.; Muller, K.; Soltis, D. E.; Soltis, P. S.; Savolainen, V.; Chase, M. W.; Powell, M. P.; Alice, L. A.; Evans, R.; Sauquet, H.; Neinhuis, C.; Slotta, T. A. B.; Rohwer, J. G.; Campbell, C. S. & Chatrou, L. W. 2003. Angiosperm phylogeny based on matK sequence information. **American Journal of Botany** **90**: 1758 – 1776.
- Hunt, D. R. 2006. **The new cactus lexicon**. DH Books, Millborne Port.
- Mauseth, J. D. 2007. Tiny but complex foliage leaves occur in many "Leafless" cacti (cactaceae). **International Journal of Plant Sciences** **168**: 845 – 853.

- Metcalfe, C. R. & Chalk, L. 1985. **Anatomy of the Dicotyledons: wood structure and conclusion of the general introduction**. Second edition. Volume II. Clarendon Press, Oxford.
- Nyffeler, R. 2007. The Closest Relatives of Cacti: Insights from Phylogenetic Analyses of Chloroplast and Mitochondrial Sequences with Special Emphasis on Relationships in the Tribe Anacampseroteae. **American Journal of Botany** **94**: 89 – 101.
- Nyffeler, R. & Eggli, U. 2010. Disintegrating Portulacaceae: A new familial classification of the suborder Portulacineae (Caryophyllales) based on molecular and morphological data. **Taxon** **59**: 227 – 240.
- Nyffeler, R.; Eggli, U.; Ogburn, M. & Edwards, E. 2008. Variations on A Theme: Repeated Evolution of Succulent Life Forms in the Portulacineae (Caryophyllales). **Haseltonia** 26 – 36.
- Rodman, J. E.; Oliver, M. K.; Nakamura, R. R.; Mcclammer, J. U. & Bledsoe, A. H. 1984. A Taxonomic Analysis and Revised Classification of Centrospermae. **Systematic Botany** **9**: 297 – 323.
- Simpson, M. G. 2010. **Plant Systematics**. Second Edition. Academic Press, Oxford.
- Stevens, P. F. (2001). **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 9, June 2008. Website <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> [Acessado em Agosto, 2010].
- Thorne, R. F. 1976. A phylogenetic classification of the Angiospermae. **Evolutionary Biology** **9**: 35 – 106.

Capítulo I

Homologias primárias no clado ACPT: um estudo da região da axila foliar em Portulacaceae e Talinaceae.

Resumo

A família Portulacaceae, como reconhecida tradicionalmente, foi definitivamente refutada como monofilética em recentes estudos de filogenia baseados em dados moleculares. Uma classificação mais recente desmembra a antiga família Portulacaceae em diversas famílias menores, sendo algumas delas pertencentes ao clado ACPT (Anacampserotaceae, Cactaceae, Portulacaceae e Talinaceae). Pouco se sabe sobre sinapomorfias morfo-anatômicas do grupo, sendo a presença de tricomas na região da axila foliar uma das poucas mencionadas para o clado ACP. O presente trabalho teve como objetivo investigar a região da axila foliar em espécies de Portulacaceae (*Portulaca werdermannii*, *P. mucronata*, *P. hirsutissima*, *P. halimoides*) e Talinaceae (*Talinum paniculatum*) em busca de homologias primárias morfo-anatômicas dentro do clado ACPT. Regiões nodais de porções apicais e basais do caule de cada espécie foram analisadas com utilização de técnicas usuais em anatomia vegetal. Como principais resultados, são descritas outras estruturas presentes na axila foliar, além dos tricomas: (1) região de constrição que delimita limbo e base foliar (espécies de *Portulaca* e *Talinum*); (2) instalação precoce de periderme na axila foliar (*Portulaca*); (3) estruturas foliares derivadas da gema axilar (*Talinum*, podendo representar uma possível homologia com aréolas de Cactaceae). Com base nos resultados obtidos, torna-se evidente que a região da axila foliar é informativa, sendo necessários novos estudos incluindo outros taxa para a compreensão das relações filogenéticas do clado ACPT.

Palavras-chave: anatomia; periderme; constrição abaxial; Portulacineae; tricomas.

Abstract

Portulacaceae, as traditionally circumscribed, was definitely rejected as monophyletic in recent phylogenetic studies based on molecular data. A more recent classification dismembers the old family Portulacaceae in several smaller families, some of them belonging to ACPT clade (Anacampserotaceae, Cactaceae, Portulacaceae and Talinaceae). Little is known about morphological and anatomical synapomorphies of the group, being the presence of trichomes in the leaf axil one of the few mentioned for the ACP clade. This study aimed to investigate the leaf axil in Portulacaceae (*Portulaca werdermannii*, *P. mucronata*, *P. hirsutissima* and *P. halimoides*) and Talinaceae (*Talinum paniculatum*) in search of primary homologies within ACPT clade. Nodal regions of apical and basal portions of stems were analyzed using standard techniques of plant anatomy. As main results are described structures in the leaf axil other than trichomes: (1) an abaxial constriction that delimits blade and leaf base (species of *Portulaca* and *Talinum*), (2) early onset of periderm in the leaf axil (*Portulaca*), (3) modified leaves derived from the axillary bud (*Talinum*, which may represent a possible homology with areoles of Cactaceae). Based on these results, it becomes evident that the region of the axillary bud contains many informative characters to the phylogeny of the group. Further studies including more taxa are needed to a better understanding of the evolution and relationships within the ACPT clade.

Key words: anatomy; periderm; abaxial constriction; Portulacineae; trichomes.

Introdução

A família Portulacaceae, como reconhecida tradicionalmente, havia sido contestada como monofilética diversas vezes (Carolin 1987; Hershkovitz, 1993; Hershkovitz & Zimmer, 1997; Applequist & Wallace, 2001; Nyffeler, 2007). Contudo, mais recentemente, a família foi segregada em diversas famílias menores, sendo que algumas delas formam um clado bem sustentado, denominado ACPT-Anacampserotaceae, Cactaceae, Portulacaceae e Talinaceae (Nyffeler & Eggli, 2010)

Alguns caracteres morfo-anatômicos presentes neste grupo parecem possuir um alto grau de homoplasia, ou seja, devem ter surgido independentemente diversas vezes ao longo da evolução. No entanto, outros parecem representar verdadeiras sinapomorfias, tendo aparecido no ancestral e se mantido ao longo da história evolutiva do grupo. Este é o caso dos tricomas axilares presentes no clado ACP (Anacampseroteae + Cactaceae + *Portulaca*), sendo uma das poucas sinapomorfias não moleculares apontadas para o grupo (Ogburn & Edwards, 2009).

Poucos trabalhos, além de Chorinsky (1931), relatam a estrutura destes tricomas em “Portulacaceae”. Embora existam diferentes tipos, com variações quanto ao tamanho e número de séries de células, aparentemente todos apresentam sempre a mesma estrutura básica e seqüência de desenvolvimento, sendo sempre descritos como multisseriados para o grupo (Prabhakar & Ramayya, 1975; Marinho & Estelita, 1996).

Já para a família Cactaceae há diversos trabalhos que relatam a ocorrência e estrutura dos tricomas axilares, sendo quase sempre unisseriados e sem muitas

variações quanto à sua estrutura (Boke, 1944; 1951; 1952; 1954; Gibson & Nobel, 1986).

Contudo, outras evidências sobre a evolução das diferentes linhagens do clado ACPT podem ser encontradas na região da axila foliar.

Uma das estruturas mais notáveis neste grupo é a aréola de Cactaceae, portadora de espinhos e tricomas. Esta estrutura altamente modificada representa uma importante sinapomorfia morfológica da família, sendo facilmente utilizada no seu reconhecimento (Gibson & Nobel, 1986).

Segundo Gibson & Nobel (1986), as aréolas são compostas por gemas axilares situadas em uma base foliar expandida e persistente, que produzem espinhos ao invés de folhas, e que, eventualmente, podem dar origem a uma estrutura reprodutiva, a um novo ramo ou até mesmo a raízes. Os espinhos, por sua vez, são folhas modificadas, o que torna a interpretação da aréola, já desenvolvida, como sendo um pequeno ramo lateral modificado (Salgado & Mauseth, 2002).

Talinum (Talinaceae), por sua vez, apresenta perfis produzidos pela gema axilar que podem assumir características morfológicas superficialmente semelhantes aos tricomas (ápice esclerificado) presentes em ACP (Ogburn & Edwards, 2009).

Nyffeler & Eggli (2010) levantam a hipótese de que a ocorrência destas diferentes estruturas na região da axila foliar em *Portulaca* (Portulacaceae), *Anacampseros* (Anacampserotaceae) e *Talinum* (Talinaceae) talvez seja vestígio de um ramo curto altamente condensado presente no ancestral do grupo, e que esta condição seja homóloga à aréola de Cactaceae.

Embora estudos filogenéticos atuais baseados em dados moleculares tenham contribuído muito para o entendimento das relações em Portulacineae, há agora uma carência de trabalhos que abordem caracteres morfológicos e anatômicos sob o enfoque evolutivo. Applequist & Wallace (2001) já chamam a atenção para a necessidade de maiores estudos buscando sinapomorfias morfológicas que sustentem os clados observados em análises moleculares.

Pinna (1991) define homologia primária como uma proposta de homologia baseada em similaridades, e que carrega uma expectativa de correspondência filogenética. Após confrontada com um paradigma filogenético a homologia primária pode ser validada como homologia secundária, ou seja, uma sinapomorfia.

Frente à importância de caracteres presentes na região da axila foliar para o entendimento da evolução do clado ACPT e dada a escassez de estudos, sobretudo com enfoque ontogenético e filogenético, que abordem a ocorrência de tais caracteres em “Portulacaceae”, o presente trabalho busca caracterizar a estrutura e desenvolvimento de tais estruturas em espécies de *Portulaca* e *Talinum*, buscando estabelecer homologias primárias para o grupo.

Materiais e métodos

Para o presente trabalho foram selecionadas espécies de *Portulaca* (*P. werdermannii* Poelln., *P. halimoides* L., *P. mucronata* Link., *P. hirsutissima* Camb.), bem como *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.

O material botânico foi coletado nos municípios de Santana do Riacho (MG), Mucugê (BA) e Seabra (BA). Material testemunho foi depositado no herbário do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo.

Desenvolvimento da região axilar

Indivíduos adultos de cada espécie foram fotografados para registro da organização geral do sistema aéreo. A partir de ramos em fase vegetativa, foram isoladas amostras de regiões contendo o ápice e os primeiros nós, bem como regiões da base do ramo.

As amostras foram fixadas em FAA 50 (formaldeído, ácido acético glacial e etanol 50% - Johansen, 1940), sendo após 48 horas, armazenadas em etanol 70%. O material foi então desidratado em série etanol/álcool butílico terciário (50-100%), posteriormente incluído em parafina (Ruzin, 1999). Cortes histológicos seriados, transversais e longitudinais, foram obtidos com auxílio de micrótomo rotativo. A coloração do material foi realizada com o uso de fucsina básica e azul de Astra, seguindo metodologia descrita por Kraus *et al.* (1998). O registro fotográfico foi realizado a partir do Sistema de Digitalização de Imagem IM50 acoplado ao microscópio Leica DMLB do Laboratório de Anatomia Vegetal IB/USP.

Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O material foi desidratado em série etanólica (50-100% EtOH) e submetido ao ponto crítico com gás carbônico para secagem (CPD 030, Balzer). Depois de secas, as amostras foram montadas em suportes metálicos (*stubs*) e metalizadas com ouro (Silveira, 1989), para então serem analisadas e registradas em Microscópio Zeiss (DSM 940).

Resultados

Em todas as *Portulaca* analisadas foram observados tricomas, apresentando variações de densidade entre as diferentes espécies (Figs. 1A-E). *Talinum paniculatum*, por sua vez, não apresentou nenhum tipo de tricoma axilar (Fig. 1F).

Anatomicamente, todas as espécies possuem como características comuns a presença de uma constrição delimitando a lâmina e a base foliar, que nestas espécies encontra-se expandida e fundida ao caule, proporcionando a este um alargamento na região nodal (Fig. 2A). Em seção longitudinal, a região de constrição é mais acentuada nas espécies de *Portulaca* (Figs. 2A-D), chegando, em alguns casos, a apresentar abaxialmente à nervura central apenas 3-4 camadas de células. Já em *Talinum* (Fig. 2E) há um maior número de camadas de células (8-10), resultando em uma menor constrição quando comparada com as de *Portulaca*.

Tricomas na região da axila foliar foram observados em todas as espécies de *Portulaca* analisadas (Fig. 3A-D). Embora possuam algumas variações entre as espécies, todos os tricomas apresentam a mesma estrutura básica e o mesmo padrão de desenvolvimento: são multicelulares, multisseriados e com diferenciação basípeta.

O desenvolvimento dos tricomas começa a partir de iniciais protodérmicas que se dividem e formam uma região basal constituída por células com características meristemáticas (citoplasma denso e núcleo evidente; Figs. 3B-C). Células desta região permanecem em constante divisão, quase que exclusivamente anticlinais, resultando no crescimento da estrutura em comprimento. As células sofrem diferenciação conforme se distanciam dessa região, em direção ao ápice, passando por um rápido processo de alongamento (Fig. 3D).

Em seção transversal do caule, notamos que ao longo do tricoma, a maior parte da sua extensão é composta por quatro séries de células (Fig. 4A), enquanto que próximo à sua base pode ocorrer um maior número de séries (Figs. 4B-D).

Além do alongamento celular, outra característica marcante durante o desenvolvimento dos tricomas é o espessamento e lignificação desigual das paredes celulares. Na região basal, as células do tricoma possuem paredes uniformemente delgadas (Fig. 4D), contudo, logo há espessamento e lignificação das paredes que estão em contato com as demais células do tricoma, enquanto as paredes voltadas para o exterior permanecem delgadas (Figs. 4A, E-G).

Inicialmente, os tricomas são formados na região abaxial da gema axilar, ou seja, entre esta e a folha (Fig. 3A), contudo, logo são formados tricomas também na região adaxial e em torno de toda a gema (Figs. 4C, 5A-B). Tricomas também foram observados, em todas as espécies, nos flancos da conexão da lamina foliar e sua base (Fig. 5C), e apenas em *P. hirsutissima* e *P. werdermannii* presentes na constrição (Fig. 5D).

Além da presença de tricomas axilares, outro caráter observado unicamente em espécies de *Portulaca* foi a formação precoce de periderme apenas na região da axila foliar. Embora em *P. hirsutissima* e *P. werdermannii* ocorra a formação de periderme ao redor de toda a circunferência do caule em regiões mais desenvolvidas (base do caule), foi observado que em ambas as espécies, assim como em *P. halimoides*, ocorre a instalação do felogênio próximo à inserção da folha logo nos primeiros estágios do desenvolvimento do caule.

As divisões celulares que darão origem ao felema e a feloderme iniciam-se na epiderme, sendo também observadas divisões nas camadas subepidérmicas. Estas

divisões são preferencialmente periclinais, podendo eventualmente ocorrer divisões anticlinais (Fig. 6A). Como resultado da instalação localizada do felogênio, o caule passa a ter uma porção revestida por epiderme, e outra pelo felema (Fig. 6B), esta última restrita à região da axila foliar nas porções mais apicais do caule.

Geralmente a periderme, na região axilar, se desenvolve no mesmo local onde os tricomas foram formados (Figs. 6C-E). Inicialmente a periderme se desenvolve abaxialmente em relação à gema axilar. Desta maneira, em determinados estágios do desenvolvimento, é possível observar regiões onde já houve a formação da periderme, enquanto outras regiões ainda apresentam epiderme com tricomas (Fig. 6F). Em estágios mais avançados, a periderme é formada em torno de toda a gema axilar (Figs. 7A-C). Adaxialmente à gema, pouca periderme é formada (Fig. 7A), em relação às porções laterais e abaxial (Figs. 7B-C), onde há amplo desenvolvimento. Além disso, a ocorrência de periderme segue o mesmo padrão dos tricomas, sendo formada também nos flancos da inserção das folhas (Fig. 7D), e eventualmente na região da constrição (Fig. 7E-F).

Após a formação do felema, a base dos tricomas se lignifica (Figs. 6D-E), muitas vezes sendo imperceptível a delimitação entre o tecido formado pelo felema e a base multisseriada dos tricomas (Fig. 6E).

Em *P. hirsutissima*, foram encontrados cristais nas camadas mais internas da periderme, bem como na região de conexão entre a folha e o caule (Figs. 8A-C).

Internamente às regiões onde a periderme é formada, muitas vezes ocorre uma coloração mais intensa das paredes celulares (Figs. 6A, 6D, 7D,8D), indicando possível deposição de suberina.

Portulaca mucronata foi a única espécie que não apresentou desenvolvimento de periderme em todos os estágios de desenvolvimento analisados no presente estudo, nem mesmo em regiões caulinares onde as gemas axilares já estavam no início de atividade para formação de um novo ramo (Fig. 8E).

Talinum paniculatum, ao contrário das espécies de *Portulaca*, não exibe tricomas axilares. Por outro lado, na região da axila foliar, esta espécie produz diferentes estruturas por meio da atividade da gema axilar (Fig. 9A). Em seção transversal é possível compreender melhor a disposição e a seqüência de formação dessas estruturas. Inicialmente a gema axilar produz um par de estruturas lateralmente dispostas, que em seção transversal apresentam formato próximo ao triangular (Figs. 9B-C). Na seqüência é produzida, abaxialmente em relação à gema, uma única estrutura que, em seção transversal, se assemelha a um trapézio (Figs. 9D-E). Após esta etapa inicial de formação das três estruturas, a gema passa a produzir pares de folhas (Figs. 9F-H).

Em seção longitudinal, percebemos que o primeiro par de estruturas formadas pode, às vezes, apresentar um ápice esclerificado (Fig. 10A). Além disso, a estrutura única, formada abaxialmente, apresenta uma morfologia bem distinta das demais. Sendo possível observar que, em estágios posteriores do desenvolvimento, as células parenquimáticas apresentam diferenças quanto à forma e tamanho, levando a uma simetria dorsiventral (Fig. 10B).

Foi também observada a presença de tecidos vasculares nas três estruturas formadas inicialmente pela gema axilar (Figs. 10C-D), sendo que nas porções apicais estas estruturas não apresentam vascularização (Figs. 10E-F).

Por meio da análise de seções transversais seriadas partindo de um internó em direção ao ápice caulinar, podemos acompanhar a conexão vascular entre o caule, a folha e a gema axilar (Figs. 11A-F). Em região mais basal (Figs. 11A-B) observamos o sistema vascular da folha (traço foliar) e da gema axilar. Em determinado ponto, os suprimentos vasculares da folha e da gema estão unidos (Fig. 11C), sendo que na seqüência há a separação destes (Fig. 11D). Em região mais próxima ao nó, o traço da gema assume a disposição de um cilindro fechado (Figs. 11E-F). Por fim, observamos que a vascularização das estruturas presentes na axila foliar está conectada ao sistema vascular da gema (Figs. 12A-D).

Discussão

Como já descrito na literatura, uma das características marcantes encontradas nas espécies de *Portulaca* é a presença de tricomas na região da axila foliar. Embora sua ocorrência seja amplamente relatada, poucos trabalhos tratam o assunto em detalhe.

Possivelmente, o trabalho mais detalhado sobre a estrutura e o desenvolvimento de tricomas em “Portulacaceae” foi o de Prabhakar & Ramayya (1975), utilizando espécies de *Portulaca* e *Talinum*. Neste trabalho os autores relatam a presença de tricomas axilares apenas em *Portulaca*, classificando-os em três categorias: (1) “*Multiseriate simple hair*”, (2) “*Multiseriate hollow-capitate hair*” e (3) “*Multiseriate scaly hair*”. Os três tipos apresentam essencialmente a mesma estrutura: multisseriada contendo de três a sete células de largura (tangencialmente ao caule) e duas ou três células de espessura (radialmente ao caule), uma região basal com células menores, enquanto tornam-se progressivamente alongadas em

direção ao ápice. Contudo, o tipo “*hollow-capitate*” apresenta uma cavidade em seu ápice, enquanto o tipo “*scaly hair*” apresenta aspecto membranoso, devido a uma grande quantidade de camadas de células em largura e apenas duas em espessura.

Das quatro espécies de *Portulaca*, estudadas no presente trabalho, duas foram analisadas por Marinho & Estelita (1996), que descrevem numerosos tricomas na região axilar dos primórdios foliares em *P. hirsutissima* e *P. mucronata*. Segundo as autoras, os tricomas são multisseriados, com paredes consideravelmente espessadas e lignificadas; longos e emaranhados e com diferenciação basípeta.

No presente estudo não foram encontrados tricomas axilares em *Talinum paniculatum*, apenas nas espécies de *Portulaca*, que não apresentaram as variações morfológicas registradas por Prabhakar & Ramayya (1975), sendo todos os tricomas classificados como simples multisseriado, constituídos em sua grande parte por quatro séries de células. Em relação ao desenvolvimento, semelhante ao descrito por Prabhakar & Ramayya (1975) e Marinho & Estelita (1996), todas as quatro espécies apresentam tricomas com diferenciação basípeta.

Segundo Prabhakar & Ramayya (1975), a célula inicial do tricoma cresce acima do nível da protoderme e inicialmente divide-se anticlinalmente, formando uma díade, que por nova divisão anticlinal produz uma tétrade. A tétrade então passa por uma série de divisões periclinais resultando no meristema basal do tricoma. A partir de então este meristema é o responsável pelo seu crescimento, seja em comprimento (através de divisões periclinais) ou em espessura (divisões anticlinais). Ainda segundo os autores, há duas fases de formação dos tricomas a partir das iniciais protodérmicas: primeiramente surgem enquanto os primórdios foliares estão sendo formados, antes mesmo das gemas axilares serem distintas, e

subseqüentemente, são também formados entre a gema axilar e o caule. Embora as folhas sofram abscisão, os tricomas diferenciados na região adaxial da gema persistem intactos na região nodal.

As observações realizadas no presente trabalho corroboram o descrito por Prabhakar & Ramayya (1975), uma vez que os tricomas formam-se inicialmente na região abaxial à gema axilar, sendo posteriormente formados entre esta e o caule. Ademais, seções transversais em série permitiram identificar, em estágios posteriores do desenvolvimento, uma distribuição contínua dos tricomas em torno de toda a gema axilar, como relatado por Marinho & Estelita (1996) em *P. mucronata* e *P. hirsutissima*.

Marinho & Estelita (1996) ao discutirem a esclerificação dos tricomas, mencionam o trabalho de Shields (1950), que sugere uma provável relação deste caráter com a deficiência de nitrogênio. Isto parece pouco provável, uma vez que todas as espécies com tricomas apresentaram este mesmo tipo de desenvolvimento, independente do local ou época de coleta, e que a esclerificação ocorre seguindo um padrão muito bem definido, isto é, apenas nas paredes que estão em contato com outras células do tricoma (aquelas mais internas). Vale salientar também que, a lignificação da região apical de tricomas é mencionada em espécies de Cactaceae (Gibson & Nobel, 1986; Arruda, 2010).

Em *Anacampseros*, além dos tricomas comuns, é relatada a presença de cerdas (“bristles”), descritas como tricomas multisseriados extremamente largos, com mais de vinte camadas de células de espessura (Oggburn & Edwards, 2009). Análise preliminar realizada em *Anacampseros arachnoides*, pelos presentes autores, registra a ocorrência deste tipo de tricoma, inclusive com o processo de

esclerificação na região apical. Desta maneira, tal caráter parece ser conservado no grupo.

Já em Cactaceae, os tricomas apresentam estrutura diferente daquela encontrada em *Portulaca* e *Anacampseros*. Estes são sempre unisseriados, com exceção de *Pereskia* onde os tricomas são multisseriados em sua base (Boke, 1954). Assim como em *Portulaca*, se desenvolvem a partir de uma única célula epidérmica, a qual se divide periclinalmente e forma uma célula basal, que por sua vez dará origem ao tricoma através de divisões sucessivas, gerando uma série de células muito alongadas. Segundo Gibson & Nobel (1986), o crescimento do tricoma é indeterminado, portanto o tamanho final dos tricomas é variável; enquanto as células apicais podem sofrer colapso, as basais permanecem vivas por algumas semanas ou meses.

Em *Opuntia cylindrica* (Juss. Ex Lam.) DC. (Cactaceae) a produção de tricomas começa no início do desenvolvimento da aréola, formados na base das estípulas. Depois os mesmos são produzidos também próximos aos espinhos e gloquídeos e, em estágios posteriores do desenvolvimento da aréola, parecem ser produzidos a partir de todas as células epidérmicas (Boke, 1944; 1951).

Boke (1954), em um trabalho sobre organogênese de *Pereskia*, descreve os ápices vegetativos de três espécies deste gênero. Segundo o autor, os tricomas surgem dos dois lados do primórdio foliar no momento em que a gema axilar começa a ser formada e, conforme a gema e a base foliar se expandem, os tricomas cercam toda a gema axilar e as estruturas por ela formadas. No início do desenvolvimento, os tricomas podem apresentar divisões nas células terminais, mas posteriormente ficam limitados à produção de novas células apenas na zona basal. O

autor observa, ainda, que em *Pereskia grandifolia* Haw. podem ocorrer também algumas divisões anticlinais na base do tricoma, indicando uma possível condição multisseriada. Já em *Pereskia aculeata* Mill., além dos tricomas unisseriados, ocorre a presença de apêndices multisseriados. Estes apêndices são semelhantes a pequenos espinhos, contudo, diferem destes em sua ontogenia e arranjo irregular (Boke, 1954).

Embora existam diferenças estruturais entre os tricomas de Portulacaceae, Cactaceae e Anacampserotaceae, é evidente a semelhança no padrão de desenvolvimento dos mesmos. Além disso, tendo em vista que *Pereskia* representa um dos clados mais basais de Cactaceae, a existência de tricomas cuja base é multisseriada representa uma evidência de que este seria o caráter ancestral. Vale ainda salientar que nas espécies de *Portulaca* analisadas, a base do tricoma também possui maior número de séries de células, assemelhando-se à situação de *Pereskia*.

Desta maneira, podemos inferir que o ancestral do clado ACP deve ter possuído tricomas multisseriados na axila foliar, e que ao longo da evolução os tricomas de Cactaceae teriam assumido a condição unisseriada.

É importante notar outra diferença entre a presença de tricomas na axila foliar de *Portulaca* e em aréolas de Cactaceae: enquanto que nas primeiras, os tricomas são formados a partir da protoderme que reveste a própria axila foliar, em Cactaceae estes também são produzidos a partir do tecido derivado do meristema areolar. Não obstante, este fato não invalida a proposta de homologia entre os tricomas dos diferentes grupos visto que em Cactaceae estes também são produzidos antes do início da atividade da gema areolar. O que acontece aqui é uma extensão da produção de tricomas também para a região axilar dos espinhos,

lembrando que a aréola nada mais é do que um ramo altamente reduzido e, seus espinhos, folhas modificadas.

As estruturas presentes na axila foliar do clado ACPT causaram controvérsia no passado e atualmente ainda geram alguma confusão. Alguns autores (Huntchinson, 1926; Lawrence, 1951) sugeriram que os tricomas em *Portulaca* e *Anacampseros* eram na realidade estípulas modificadas. Esta visão, contudo, passou a ser descartada uma vez que nunca foram encontrados vestígios de vascularização nestas estruturas, além de terem origem epidérmica (Solereider, 1908; Chorinsky, 1931). Não obstante, algumas obras ainda chamam estas estruturas de estípulas, como por exemplo Judd *et al.* (2007).

Embora a presença de estípulas não seja comum no grupo em que o clado ACPT está inserido, alguns trabalhos descrevem a formação de estruturas que possivelmente são estípulas modificadas.

Em *Opuntia cylindrica* (Cactaceae), por exemplo, Boke (1944) relata a ocorrência de um par de estruturas associadas ao primórdio foliar. Estas estruturas iniciam sua formação de cada lado do primórdio foliar enquanto este possui ainda menos de 100µm de comprimento, antes mesmo da formação de tricomas ou da diferenciação do meristema areolar. Contudo, seguem o mesmo padrão de formação e diferenciação que espinhos e gloquídeos, sendo que na maturidade tornam-se esclerificados, torcidos e semelhantes aos tricomas (“hair-like”). Devido a sua posição e formação precoce, o autor considera esses apêndices como estípulas modificadas, e descarta a possibilidade de serem profilos, reforçando que não têm origem do meristema areolar por surgirem antes mesmo da formação deste. Além disso, o autor reporta a ocorrência de tecido xilemático nestas estruturas.

De qualquer forma, dentre todas as espécies analisadas no presente estudo, não foram encontradas quaisquer evidências das estruturas axilares serem estípulas. Em *Portulaca*, os tricomas nitidamente têm origem protodérmica e se distribuem por toda a região da axila foliar, além de não haver nenhum sinal, mesmo que vestigial, de vascularização. Já em *Talinum*, como será discutido mais adiante, as estruturas formadas em pares, são provenientes da gema axilar e não do meristema apical caulinar, como é esperado para estípulas.

Embora a presença de tricomas axilares já tenha sido mencionada e discutida por alguns autores como possível sinapomorfia morfológica do clado ACP, pudemos observar a presença de outros caracteres que até então passaram despercebidos pelos trabalhos sobre o tema.

A presença de uma constrição que delimita lâmina e base foliar é uma delas. Todas as espécies analisadas apresentam esta característica, descrita também em Cactaceae sem muitos detalhes. Gibson & Nobel (1986) relatam que sua formação ocorre quando o primórdio foliar possui em torno de 2mm de comprimento. A constrição também é registrada por Boke (1944) no que chamou de estruturas intermediárias entre espinhos e folhas.

A constrição é relatada em “Pereskioideae” e Opuntioideae (subfamílias de Cactaceae), mas parece ausente em muitas espécies da subfamília Cactoideae, provavelmente explicado pela extrema redução da lâmina foliar que ocorre neste grupo (Boke, 1944; Gibson & Nobel, 1986; Mauseth, 2007; Godofredo, 2010; Arruda, 2010). Considerando-se a ocorrência da constrição em todas as espécies analisadas

e nestes grandes grupos de Cactaceae, este é mais um caráter morfológico que pode representar uma sinapomorfia de ACPT.

Embora não tenhamos uma análise mais detalhada da situação em Anacampserotaceae, observações preliminares em *Anacampseros arachnoides* revelam a presença de uma região de constrição reduzida. Mesmo a eventual ausência deste caráter nos demais taxa de Anacampserotaceae não invalidaria a hipótese de homologia, podendo representar um caso de reversão.

Contudo, para a determinação do clado ao qual a constrição representa uma sinapomorfia, grupos externos devem ser também estudados a fim de se conhecer a partir de que ancestral o caráter deve ter surgido.

Dada a localização da constrição, e levando em consideração que o tecido de abscisão é formado adjacente a esta, é possível que haja uma relação entre a extensão da constrição e a caducifolia. Isto é sustentado tendo em vista que a constrição é maior em espécies de *Portulaca* e Cactaceae cujas folhas são caducas. Por outro lado, a espécie de *Talinum* estudada, bem como as análises preliminares em *Anacampseros* (espécies que apresentam folhas perenes), demonstram uma constrição reduzida.

Outro caráter a ser considerado é a formação de periderme na axila foliar. Sob perspectiva evolutiva em Portulacineae, Ogburn & Edwards (2009) abordam a formação de periderme no sistema de revestimento do caule, e não apenas na região axilar. O trabalho foca, principalmente, no tempo de formação da periderme, ou seja, se a formação é precoce (logo no início do desenvolvimento do ramo), ou tardia (iniciando em regiões já antigas do ramo). Os autores concluem que o tempo

de formação da periderme não parece seguir nenhum padrão filogenético, embora pareça estar relacionado com a presença/ausência de outros caracteres.

Por outro lado, o presente estudo indica que a formação de periderme em três das quatro *Portulaca* analisadas, mesmo que tardia se considerada como sistema de revestimento do caule, ocorre precocemente na região da axila foliar. Da mesma maneira, em aréolas de Cactaceae ocorre a instalação precoce do felogênio na região areolar, logo abaixo dos gloquídeos e tricomas, e ao redor de espinhos (Boke, 1944; Boke, 1951; Boke, 1952).

Já em *Talinum paniculatum*, não foi observada esta condição, não havendo nenhum indício da instalação precoce de periderme na região da axila foliar, ao passo que em Anacampserotaceae a periderme tem instalação precoce em todo o caule, incluindo a região da axila foliar (Ogburn & Edwards, 2009).

Mais uma vez, poderia ser argumentado que este caráter não representa uma homologia consistente, visto que a periderme, em aréolas, pode se instalar a partir de iniciais epidérmicas, ou subepidérmicas (Boke, 1944; 1951; 1952), dependendo do grupo, enquanto que nas espécies de *Portulaca* estudadas, o felogênio é epidérmico. Contudo, podemos considerar que, independente da origem ontogenética do tecido onde se instala o felogênio, este está sendo formado na região da axila foliar, representando portanto uma homologia primária.

Outro aspecto a ser considerado sobre a presença da periderme na axila foliar, diz respeito a sua provável função. Boke (1944) menciona que com a produção da periderme a ligação entre os espinhos, e destes com a planta, torna-se muito mais firme, de maneira que quando é aplicada forte tensão a um espinho, normalmente

toda a aréola (ou grande parte dela) é removida junto. Sugere então que uma possível função da periderme seria oferecer proteção à planta contra seus próprios espinhos, impedindo que estes adentrassem o parênquima subjacente ao ocorrer o contato destes com alguma superfície rígida. Contudo, qual seria a provável função em grupos que não apresentam espinhos como *Portulaca* e *Anacampserotaceae*?

E mais, levando-se em consideração as famílias mais próximas do clado ACPT, representantes de *Didiereaceae* possuem espinhos em uma estrutura semelhante à aréola (Nyffeler & Eggli, 2010). Contudo, não há registro na literatura da ocorrência da formação de periderme na axila foliar para a família. Caso esta semelhança represente uma sinapomorfia de ACPT + *Didiereaceae*, a presença da periderme pode ter surgido no ancestral de forma a atuar como proteção, assim como sugerido por Boke (1944) e sua presença em *Portulaca* e *Anacampserotaceae* representaria um caráter vestigial.

Por outro lado, caso a periderme tenha surgido no ancestral apenas do clado ACP, possivelmente possuía outra função, e desenvolveu a função de proteção contra os espinhos de forma secundária, caracterizando uma exaptação.

Finalmente, dentre as espécies estudadas, um caráter particular ocorre na região da axila foliar de *T. paniculatum*. Sua gema axilar produz inicialmente um par de filóclados que podem ter seu ápice modificado em uma estrutura esclerificada, sendo posteriormente produzida uma única estrutura em posição abaxial, seguida de pares de folhas comuns. Essa atividade diferencial lembra àquela do meristema areolar de alguns cactos, a qual gera espinhos em sequência alternando entre pares

e estruturas únicas normalmente em posição também abaxial (Gibson & Nobel, 1986).

A presença de estruturas foliares modificadas em *Talinum* levou Nyffeler & Eggli (2010) a sugerirem uma possível homologia deste ramo encurtado com as aréolas de Cactaceae. Na realidade, os autores vão mais adiante, e sugerem que as estruturas presentes em Didiereaceae poderiam também ter sua origem em um ancestral comum, que deveria possuir um ramo axilar altamente condensado. Desta maneira, todas as estruturas axilares (tricomos e folhas modificadas) presentes neste grande subclado de Portulacineae, seriam vestígios de um ramo axilar altamente condensado.

Esta proposta surge como uma potencial sinapomorfia morfológica para a atual filogenia do grupo, a qual é baseada exclusivamente em dados moleculares (Nyffeler & Eggli, 2010). Contudo não fica explícita a exata relação entre o ramo altamente reduzido e os tricomos presentes em Portulacaceae e Anacampserotaceae, uma vez que estes últimos iniciam seu desenvolvimento em fase anterior à diferenciação estrutural da gema axilar.

Uma explicação seria o ramo reduzido surgindo no ancestral de ACPT + Didiereaceae e sendo perdido em Portulacaceae e Anacampserotaceae. Ao passo que os tricomos teriam surgido no ancestral de ACP e se mantido, variando apenas sua estrutura nos diferentes grupos atuais.

Mesmo que a ocorrência de um ramo reduzido possa ter surgido independentemente em cada um dos diferentes grupos de Portulacineae, isso não implica na não-homologia do caráter, mas sim em uma homologia latente

(Rutishauser & Moline, 2005), isto é, as estruturas compartilham o mesmo mecanismo molecular de desenvolvimento, mas não estavam presentes no ancestral comum ao grupo.

Desta maneira, o presente estudo, além de corroborar a hipótese de homologia entre os tricomas presentes no clado ACP, acrescentou como novas homologias primárias (morfológicas), a ocorrência da constrição abaxial e a formação precoce de periderme que suportam a atual filogenia de Portulacineae, baseada apenas em dados moleculares. Futuros estudos envolvendo espécies de Anacampserotaceae, Didiereaceae, bem como número mais representativo de Talinaceae, poderão esclarecer ainda mais as relações entre estas famílias, sobretudo no que se refere à resolução da proximidade de Didiereaceae com o clado ACPT.

Referências bibliográficas

- Applequist, W. L. & Wallace, R. S. 2001. Phylogeny of the Portulacaceous Cohort Based on ndhF Sequence Data. **Systematic Botany** **26**: 406 – 419.
- Arruda, E. C. P. 2010. **Histogênese de segmentos caulinares de espécies de Opuntioideae**. Tese de doutorado. Departamento de Botânica, IB, Universidade de São Paulo.
- Boke, N. H. 1944. Histogenesis of the Leaf and Areole in *Opuntia cylindrica*. **American Journal of Botany** **31**: 299 – 316.
- Boke, N. H. 1951. Histogenesis of the Vegetative Shoot in *Echinocereus*. **American Journal of Botany** **38**: 23 – 38.
- Boke, N. H. 1952. Leaf and Areole Development in *Coryphantha*. **American Journal of Botany** **39**: 134 – 145.
- Boke, N. H. 1954. Organogenesis of the Vegetative Shoot in *Pereskia*. **American Journal of Botany** **41**: 619 – 637.
- Carolin, R. 1987. A Review of the Family Portulacaceae. **Australian Journal of Botany** **35**: 383 – 412.

- Chorinsky, F. 1931. Vergleichend-anatomische Untersuchungen der Haargebilde bei Portulacaceen und Cactaceen. **Österreichische Botanische Zeitschrift** **80**: 308 – 327.
- Gibson, A. C. & Nobel, P. S. 1986. **The Cactus Primer**. Harvard University Press, Cambridge.
- Godofredo, V.R. 2010. **Ontogênese, função e evolução das traqueídes vasculares em Cactaceae, tendo como modelo o cacto colunar Pilosocereus aurisetus (Werderh.) Byles & G.D. Rowley**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Botânica, IB, Universidade de São Paulo.
- Hershkovitz, M. A. 1993. Revised Circumscriptions and Subgeneric Taxonomies of Calandrinia and Montiopsis (Portulacaceae) with Notes on Phylogeny of the Portulacaceous Alliance. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **80**: 333 – 365.
- Hershkovitz, M. A. & Zimmer, E. A. 1997. On the evolutionary origins of the cacti. **Taxon** **46**: 217 – 232.
- Hutchinson, J. 1926. **Families of Flowering Plants**. Calderon Press, Oxford.
- Johansen, D. A. 1940. **Plant microtechnique**. 3.ed. Paul B. Hoeber Inc, New York.
- Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F.; Donoghue, M. J. 2007. **Plant Systematics: a phylogenetic approach**. 3.ed. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Kraus, J. E.; Sousa, H. C.; Rezende, M. H.; Castro, N. M.; Vecchi, C. & Luque, R. 1998. Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials. **Biotechnic & Histochemistry** **73**: 235 – 243.
- Lawrence, G. H. M. 1951. **Taxonomy of Vascular Plants**. Macmillan, New York.
- Marinho, T. C. & Estelita, M. E. 1996. Anatomia da raiz e do caule das Portulacaceae da Serra do Cipó, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Botânica** **19**: 67 – 75.
- Mauseth, J. D. 2007. Tiny but complex foliage leaves occur in many "Leafless" cacti (cactaceae). **International Journal of Plant Sciences** **168**: 845 – 853.
- Nyffeler, R. 2007. The Closest Relatives of Cacti: Insights from Phylogenetic Analyses of Chloroplast and Mitochondrial Sequences with Special Emphasis on Relationships in the Tribe Anacampseroteae. **American Journal of Botany** **94**: 89 – 101.
- Nyffeler, R. & Eggli, U. 2010. Disintegrating Portulacaceae: A new familial classification of the suborder Portulacineae (Caryophyllales) based on molecular and morphological data. **Taxon** **59**: 227 – 240.

- Ogburn, R. M. & Edwards, E. J. 2009. Anatomical variation in Cactaceae and relatives: Trait lability and evolutionary innovation. **American Journal of Botany** **96**: 391 – 408.
- Pinna, M. C. C. d. 1991. Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. **Cladistics** **7**: 367 – 394.
- Prabhakar, M. & Ramayya, N. 1975. Structure and development of trichomes in the family Portulacaceae. *In*: Ram, M.; H.Y.; Shah, J.J. & Shah, C.K. (Eds.). **Form, structure & Function in Plants**. Sarita Prakashan, Nauchandi, Meerut, India. p. 356 – 368.
- Rutishauser, R & Moline, P. 2005. Evo-devo and the search for homology (“sameness”) in biological systems. **Theory in Biosciences** **124**: 213–241.
- Ruzin, S. E. 1999. **Plant Microtechnique and Microscopy**. Oxford University Press, New York.
- Salgado, T. T. & Mauseth J. D. 2002. Shoot Anatomy and Morphology. *In*: Nobel, P. S. **Cacti: Biology and Uses**. University of California Press, Los Angeles. p. 23-40.
- Shields, L. M. 1950. Leaf Xeromorphy As Related to Physiological and Structural Influences. **Botanical Review** **16**: 399 – 447.
- Silveira, M. 1989. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. *In*: Souza, W. (ed.). **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. v.1. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, Rio de Janeiro.
- Solereder, H. 1908. **Systematic Anatomy of the Dicotyledons**. Volume I. Calderon Press, Oxford.

Figura 1. Aspecto geral das espécies de *Portulaca* e *Talinum* estudadas. **A.** *P. werdermannii*. **B.** *P. hirsutissima*. **C.** *P. hirsutissima*. **D.** *P. mucronata*. **E.** *P. halimoides*. **F.** *T. paniculatum*.

Figura 2. Seções longitudinais da região nodal de espécies de *Portulaca* e *Talinum*. Notar a constrição abaxial (setas) presente em todas as espécies. **A.** *P. hirsutissima*, notar sinuosidade do caule dada pela expansão da base foliar. **B.** *P. halimoides*. **C.** *P. mucronata*. **D.** *P. werdermannii*. **E.** *T. paniculatum*. Escala = 400µm (A), 200µm (B-E).

Figura 3. Seções longitudinais da axila foliar de espécies de *Portulaca* exibindo região basal meristemática dos tricomas. **A.** *P. halimoides*. **B.** *P. hirsutissima*. **C.** *P. werdermannii*. **D.** *P. mucronata*. Notar rápido alongamento que ocorre em células que se distanciam da região basal. Escala = 100 μ m (A-B, D), 50 μ m (C).

Figura 4. Seções transversais (A-E), longitudinal (F) e microscopia eletrônica de varredura (G), da região da axila foliar de *Portulaca*. **A.** *P. halimoides*. **B.** *P. mucronata*. **C.** *P. hirsutissima*. **D.** *P. mucronata*. **E.** *P. mucronata*. **F.** *P. halimoides*. **G.** *P. hamimoides* (notar paredes externas do tricoma colapsadas, enquanto paredes internas permanecem rígidas). Escala = 50 μ m (D-E, G), 100 μ m (A-C, F).

Figura 5. Seções longitudinais (A, B e D) e transversal (C) da região da axila foliar de *Portulaca*, mostrando a distribuição dos tricomas. **A.** *P. werdermannii*. **B.** *P. hirsutissima*. **C.** *P. halimoides*. Notar tricomas nas laterais da inserção da folha (figura 3C). **D.** *P. werdermannii*. Notar tricomas na região da constrição abaxial. Escala = 100µm (A, C-D), 200µm (B).

Figura 6. Seções transversais (A, B, D e E) e longitudinais (C e F) da região da axila foliar de *Portulaca*, exibindo a instalação de felogênio. **A-B.** *P. hirsutissima*. Notar divisões celulares na epiderme e camada subepidérmica. **C.** *P. halimoides*. **D-E.** *P. hirsutissima*. **F.** *P. werdermannii*. Escala = 200µm (A), 100µm (B-D, F), 50µm (E).

Figura 7. Seções transversais (A-D) e longitudinais (E e F) da região da axila foliar de *Portulaca*, mostrando a distribuição da periderme. **A.** *P. halimoides*. **B.** *P. hirsutissima*. **C.** *P. halimoides*. **D.** *P. werdermannii*. **E-F.** *P. werdermannii*. Notar que em diferentes regiões da constrição pode estar presente apenas tricomas, ou também periderme. Escala = 400µm (B), 200µm (A, C-F).

Figura 8. Seções transversais (A-D) e longitudinal (E) da região da axila foliar de *Portulaca*. **A.** *P. hirsutissima*. Notar cristais na camada mais interna da periderme sob luz polarizada. **B.** *P. hirsutissima*. Imagem sob luz polarizada. **C.** *P. hirsutissima*. Mesma imagem de B sem luz polarizada. **D.** *P. werdermannii*. **E.** *P. mucronata*. Notar gema axilar com formação de primórdios foliares e ausência da periderme. Escala = 100µm (A), 200µm (B-E).

Figura 9. Seções transversais da região nodal de *Talinum paniculatum*. Sequência de diferenciação das estruturas formadas a partir da gema axilar. 1 = par de perfis; 2 = estrutura abaxial. Escala = 300µm (A), 200µm (F, H), 100µm (B-E, G).

Figura 10. Seções longitudinais (A-D) e transversais (E, F) da região da axila foliar de *Talinum paniculatum* mostrando perfis (seta) e estrutura abaxial (ponta de seta). Notar ausência de vascularização e presença de cavidades secretoras na região apical das estruturas (E e F). Escala = 200µm (A, C-D), 100µm (B, E), 50µm (F).

Figura 11. Seções transversais da região nodal de *Talinum paniculatum*, mostrando em seqüência a vascularização da folha (seta) e da gema axilar (asterisco e ponta de seta). Escala = 200μm.

Figura 12. Seções transversais da região nodal de *Talinum paniculatum*, mostrando a vascularização da gema axilar e das estruturas formadas (setas, A). Notar que o sistema vascular das estruturas está presente na base (C) e praticamente ausente em regiões mais apicais (D). 1 = par de perfis; 2 = estrutura abaxial. Escala = 200 μ m (A, C), 100 μ m (B, D).

Capítulo II

Histogênese foliar em espécies de Portulacaceae e Talinaceae

Resumo

Neste trabalho são apresentados dados da estrutura e do desenvolvimento de folhas de *Portulaca werdermannii*, *P. halimoides*, *P. mucronata*, *P. hirsutissima* e *Talinum paniculatum*, obtidas do ápice caulinar e de regiões mais basais do caule, submetidas à técnicas de inclusão em parafina para análise de seções em série. Foram registrados dois diferentes padrões morfológicos: (1) *P. werdermannii* e *P. halimoides*: folhas com seção transversal elíptica; mesofilo composto por parênquima aquífero; sistema vascular com um feixe central e feixes periféricos com cloroplastos distribuídos de forma centrípeta nas células da endoderme (anatomia Kranz); (2) *P. mucronata*, *P. hirsutissima* e *T. paniculatum*: folhas dorsiventrais, possuindo parênquima aquífero; sistema vascular com um único feixe na região da nervura central e ramificações distribuídas pelo mesofilo. Variações na atividade do meristema marginal foram observadas durante o desenvolvimento de primórdios foliares: 1) ocorrendo perifericamente ou 2) lateralmente à nervura central, originando a lâmina, em folhas dorsiventrais. Em ambos os casos, a partir do meristema marginal são diferenciados parênquima e procâmbio, este responsável pela diferenciação de xilema e floema primários, além do periciclo. Com estes resultados, concluímos que a distribuição e a atividade do meristema marginal no início do desenvolvimento dos primórdios resultam em diferentes morfotipos foliares e que estes diferentes padrões de desenvolvimento surgem como variações de um tema central: uma breve fase de crescimento apical seguida por atividade meristemática e alongamento celular que produz o crescimento do órgão em espessura.

Palavras-chave: desenvolvimento foliar; meristema marginal; anatomia.

Abstract:

This paper presents data on structure and development of leaves of *Portulaca werdermannii*, *P. halimoides*, *P. mucronata*, *P. hirsutissima* and *Talinum paniculatum*. Material was obtained from the basal and apical region of the stem, embedded in paraffin for analysis of serial sections. We observed two different morphological patterns: (1) *P. werdermannii* and *P. halimoides*: elliptical leaves in transverse section, mesophyll consisting mostly of water storage cells; vascular system with a central bundle and peripheral bundles with chloroplasts distributed in a centripetal pattern in the endodermis cells (Kranz anatomy); (2) *P. mucronata*, *P. hirsutissima* and *T. paniculatum*: dorsiventral leaves, with water storage cells in the mesophyll; vascular system with a central bundle in midrib region and branching of the small bundles (networks) situated in the mesophyll. Variations in the activity of the marginal meristem were observed during the development of leaf primordium: 1) peripherally arranged to the surface of the organ or 2) laterally to the midrib, resulting in a dorsiventral leaf blade. In both cases, parenchyma cells and procambium differentiates from the marginal meristem. With these results, we conclude that the distribution and activity of the marginal meristem at the beginning of the leaf development result in different leaf types and that these different patterns of development emerge as variations on a theme: a brief apical growth phase followed by meristematic activity and cell elongation that produces the growth of organ in thickness.

Key words: leaf development; marginal meristem; anatomy.

Introdução

Em Portulacineae é comum a ocorrência de folhas reduzidas, caducas, ou até mesmo ausentes. Em espécies que retêm folhas, é recorrente a presença de mucilagem, parênquima aquífero e outros caracteres xeromórficos (Stevens, 2001; Nyffeler *et al.*, 2008; Ogburn & Edwards, 2009).

Alguns trabalhos utilizam caracteres foliares, sobretudo relacionados à venação e à epiderme, na tentativa de estabelecer grupos e avaliar suas relações em “Portulacaceae” (HersHKovitz, 1991; 1993). Contudo, poucos trabalhos abordam o desenvolvimento foliar em Portulacineae, sendo a maior parte destes estudos concentrada na família Cactaceae, a qual apresenta grande diversidade de morfologias foliares, sobretudo no que diz respeito à suculência e à redução foliar.

Por muito tempo, os diferentes graus de redução foliar presentes nas subfamílias de Cactaceae levaram diversos autores a interpretar o fenômeno como uma gradação ao longo da evolução. Contudo, o estabelecimento do clado ACPT (Nyffeler, 2007) e a sugestão de Anacampserotaceae como grupo irmão de Cactaceae revelam que a redução foliar deve ter ocorrido múltiplas vezes dentro do grupo, ou então que pode ter ocorrido antes mesmo da divergência destas duas famílias (Griffith, 2004; 2008; Nyffeler *et al.*, 2008;).

O desenvolvimento da folha, do ponto de vista anatômico, inicia-se no meristema apical caulinar, onde células tanto do corpo quanto da túnica participam na formação de uma projeção, o primórdio foliar (Fahn, 1990). O primórdio foliar passa por uma fase de crescimento apical, onde é estabelecida a região correspondente ao pecíolo e à nervura central. O espessamento do órgão, nesta fase, é dado pela intensa atividade mitótica presente na porção adaxial do

primórdio, o chamado meristema adaxial (Fahn, 1990). Após esta fase, normalmente ocorre a instalação do meristema marginal de cada lado do primórdio, e através da atividade deste meristema a lâmina foliar é produzida, com seu formato dorsiventral característico (Esau 1960; Fahn, 1990).

Desta maneira, folhas com diferentes morfologias surgem como resultados de diferentes padrões de desenvolvimento, especialmente perceptíveis na atividade do meristema marginal, que pode ter período de atividade prolongado, lâminas foliares de diversos tamanhos, ou mesmo estar ausente, resultando em folhas com morfologias cilíndricas (Esau, 1960; Gibson & Nobel, 1986).

Quais mecanismos estão envolvidos na formação dos diferentes padrões morfológicos observados em folhas de Portulacineae? Seriam eles os mesmos para seus diferentes clados constituintes? Este trabalho tem como objetivo documentar a histogênese foliar em espécies de Portulacaceae e Talinaceae, contribuindo assim para o conhecimento acerca da evolução do grupo.

Materiais e métodos

Para o presente trabalho foram selecionadas espécies de *Portulaca* (*P. werdermannii* Poelln., *P. halimoides* L., *P. mucronata* Link., *P. hirsutissima* Camb.), bem como *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. O material botânico foi coletado nos municípios de Santana do Riacho (MG), Mucugê (BA) e Seabra (BA). Material testemunho foi depositado no herbário do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo.

Ápices caulinares contendo vários primórdios foliares, assim como folhas completamente desenvolvidas, foram fixados em FAA 50 (formaldeído, ácido acético glacial e etanol 50% - Johansen, 1940), sendo após 48 horas, armazenadas em etanol

70%. As amostras foram então desidratadas em série etanol/álcool butílico terciário (50-100%) e posteriormente incluídas em parafina (Ruzin, 1999). Seções histológicas transversais seriadas foram obtidas com auxílio de micrótomo rotativo. O material foi desparafinado com acetato de butila, corado com fucsina básica e azul de Astra (Kraus *et al.*, 1998), e montado em lâminas permanentes.

Folhas completamente desenvolvidas também foram incluídas em Histoiresina®. Após desidratadas até etanol 100%, as amostras foram submetidas às soluções de pré-infiltração e infiltração, pelo período de sete dias (em cada etapa). Após emblocamento, seções (de até 3 µm) foram realizadas em micrótomo rotativo e coradas com azul de Toluidina O (O'Brien *et al.*, 1965).

O registro fotográfico foi realizado com o uso do Sistema de Digitalização de Imagem IM50 acoplado ao microscópio Leica DMLB.

Resultados

Com base na atividade e na posição do meristema marginal durante o desenvolvimento foliar, as folhas das cinco espécies estudadas foram classificadas em dois grupos: **Grupo 1.** *Portulaca werdermannii* e *P. halimoides*; **Grupo 2.** *P. mucronata*, *P. hirsutissima* e *Talinum paniculatum*.

Grupo 1 (Portulaca halimoides e P. werdermannii):

A partir de seções transversais do ápice caulinar (Figs. 1A-B), foi possível descrever diferentes estágios de desenvolvimento dos primórdios foliares, devido à reduzida região internodal apresentada em todo o eixo caulinar.

No início do desenvolvimento do primórdio foliar, já se observa diferenciação das células da protoderme (Figs. 1C-D) e do meristema fundamental, que ocorre do

interior para o exterior (centrifuga). Nas células mais próximas do cordão procambial central ocorre processo de expansão celular e vacuolação, enquanto as células mais externas permanecem com características meristemáticas, formando assim o meristema marginal, distribuído uniformemente ao longo da circunferência do primórdio (Figs. 1C-F).

Após essa diferenciação inicial, torna-se distinta a hipoderme, uma camada de células adjacente à epiderme cujas divisões celulares se dão principalmente no plano anticlinal (Fig. 2 A-C), podendo eventualmente acontecer divisões periclinais (Fig. 1D, seta). Nesta fase, podem ser observadas drusas em algumas células do mesofilo (Fig. 2C).

Desde os primeiros estágios de diferenciação já é possível observar uma bainha de células, externamente adjacente ao cordão procambial, correspondendo à endoderme (Figs. 1C-D). Nesta fase, a endoderme apresenta atividade meristemática, com divisões preferencialmente periclinais (Figs. 1E; 2B-D). Assim, o aumento do mesofilo se dá por diferentes processos: (1) divisões da endoderme; (2) divisões do meristema marginal; (3) divisões difusas das células do mesofilo em diferenciação; (4) alongamento celular.

Com relação ao sistema vascular na região central, o cordão procambial já está diferenciado desde os primeiros estágios de desenvolvimento, inicialmente com a diferenciação dos elementos condutores do xilema e floema, e finalmente do periciclo.

Em fases posteriores do desenvolvimento o meristema marginal se diferencia em algumas regiões, formando células parenquimáticas, enquanto algumas porções permanecem meristemáticas (Figs. 2B-E). Essas regiões meristemáticas residuais dão

origem aos cordões procambiais periféricos (bem como a conexão destes com o sistema vascular central) e seus tecidos associados (endoderme e mesofilo radiado). Desta maneira é estabelecida a rede de vascularização foliar.

Uma diferença marcante entre a histogênese foliar nas duas espécies é a duração do período no qual o meristema marginal é identificável anatomicamente. Enquanto que em *P. werdermannii* este forma um anel em torno de todo o mesofilo até o mesmo possuir várias camadas de células (Fig. 1F), em *P. halimoides* ocorre uma rápida diferenciação das células, inicialmente na porção abaxial (Fig. 2B).

Adjacentes aos cordões procambiais periféricos também é observada a endoderme com atividade meristemática. Estes se diferenciam em feixes vasculares enquanto a endoderme assume características de bainha Kranz e o mesofilo radiado se forma adjacente a esta, na região próxima à epiderme.

Ao final do desenvolvimento, as folhas das duas espécies apresentam seção transversal elíptica (Figs. 2E; 3A). A epiderme é composta por células relativamente grandes e com paredes anticlinais delgadas em relação às periclinais (Figs. 3B-D). Estômatos situados ao mesmo nível das demais células epidérmicas.

O mesofilo é constituído principalmente por parênquima aquífero, com células grandes e de paredes delgadas. Células contendo mucilagem podem ocorrer dispersos pelo mesofilo (Fig. 3A) e na hipoderme (Fig. 3D).

A endoderme que envolve o feixe vascular central não apresenta características que permitam uma fácil identificação, contudo os feixes periféricos possuem a endoderme diferenciada em bainha Kranz, com cloroplastos distribuídos de forma centrípeta (Figs. 3B; 3D). Diferentemente desta, as células do mesofilo radiado não apresentam distribuição polarizada dos cloroplastos.

A hipoderme, neste estágio, é interrompida pelo mesofilo radiado quando este se encontra adjacente à epiderme (Fig. 3E).

O sistema vascular é composto por um feixe colateral central e diversos pequenos feixes periféricos. Além de xilema e floema, o feixe central apresenta periciclo que, na região adjacente ao floema, possui paredes espessadas (Figs. 4A-B). Os feixes vasculares periféricos são extremamente reduzidos, apresentando poucos elementos condutores (Figs. 3B; 3D), com diferenciação de todas as células procambiais, caracterizando um feixe fechado. Diferente do observado no feixe vascular central, o qual apresenta atividade cambial (Fig. 4B)

Em regiões próximas à base da folha, ocorre redução no número de feixes periféricos (Fig. 4C), até que apenas dois deles estejam presentes, na região adaxial da folha (Figs. 4D-E). Na região da base, a folha apresenta apenas o feixe vascular central, estando ausente os periféricos (Fig. 4F).

Grupo 2 (*Portulaca hirsutissima*, *P. mucronata* e *Talinum paniculatum*):

Embora *P. mucronata* e *T. paniculatum* possuam internós relativamente alongados se comparados às demais espécies, em seção transversal próxima ao meristema apical é possível observar diversos primórdios foliares simultaneamente (Fig. 5A), assim como em *P. hirsutissima* (Fig. 5B).

No início do desenvolvimento as células da porção abaxial dos primórdios foliares logo perdem características marcadamente meristemáticas, tornando-se vacuoladas e aumentando seu volume (Fig. 5C), enquanto as células presentes na porção adaxial permanecem menores e com citoplasma denso. Diferentemente do

que ocorre nas espécies do grupo 1, as folhas logo assumem uma simetria dorsiventral, sendo facilmente distinguível uma face abaxial e uma adaxial.

Com o crescimento da região abaxial, por meio de divisões e alongamento celular, é possível desde os estágios iniciais de diferenciação observar a região que corresponderá à nervura central (Figs. 5D-F). Ao mesmo tempo, na região adaxial as células se dividem preferencialmente no plano anticlinal (Figs. 6A-B), que em conjunto com a atividade de porções meristemáticas que permanecem lateralmente à nervura central (meristema marginal) promovem o crescimento da lâmina foliar (Figs. 5D-F).

A camada de células adjacentes à epiderme, neste grupo, também se diferencia em uma hipoderme unisseriada como nas espécies do grupo 1, com divisões celulares ocorrendo predominantemente no plano anticlinal, em ambas as faces (abaxial e adaxial) (Figs. 6A-B).

Nesta fase do desenvolvimento também é possível observar a endoderme com atividade mitótica, sendo as divisões celulares predominantemente periclinais (Figs. 6A-B). Desta forma, a região da nervura central cresce por divisões celulares dispersas pelo mesofilo e por divisões da endoderme (assim como o mesofilo das espécies do grupo 1), enquanto a lâmina foliar cresce a partir do meristema marginal.

A diferenciação do cordão procambial central ocorre da mesma maneira que no grupo 1, ocorrendo inicialmente a formação de células condutoras do xilema e do floema, seguidas pela diferenciação do periciclo.

Conforme a lâmina foliar cresce, o meristema marginal permanece ativo nas bordas (Fig. 6A-C), enquanto suas derivadas mais externas continuam a se dividir

anticlinalmente (Fig. 6D) formando um tecido com aspecto paliádico. Na região central da lâmina foliar, as derivadas do meristema marginal se dividem em diferentes planos, resultando na formação de cordões procambiais. Diferente do que ocorre nas espécies do grupo 1, estes cordões procambiais são formados apenas na região adaxial da folha (Figs. 6D-F).

Embora todas as espécies deste grupo apresentem folhas com clara simetria dorsiventral, variações na atividade do meristema marginal produzem diferentes padrões morfológicos ao longo do desenvolvimento. Em *P. mucronata* há uma atividade uniforme do meristema marginal em ambas as faces (Fig. 7A). Já em folhas de *T. paniculatum* o meristema marginal apresenta intensa divisão celular na face adaxial, resultando desta maneira numa folha revoluta (Fig. 7B). Por fim, *P. hirsutissima* exibe um padrão único dentre as espécies observadas: a atividade do meristema marginal é acentuada na face adaxial, e reduzida no sentido lateral, produzindo uma lâmina foliar curta, e uma face adaxial convexa (Figs. 7C).

Ao final do desenvolvimento, as folhas apresentam simetria dorsiventral, composta pela região da nervura central e lâmina foliar (Figs. 7D-E). Neste estágio, com o crescimento diferencial de ambas as faces da lâmina foliar, as folhas de *T. paniculatum* se distendem e perdem a conformação revoluta.

O mesofilo é composto predominantemente por parênquima aquífero, apresentando feixes laterais reduzidos. Contudo, diferentemente das espécies do grupo 1, não foi observada anatomia Kranz nestas espécies. Células de mucilagem foram observadas em todas as espécies (Figs. 7D-E).

Embora sejam espécies de folhas sésseis, a região da base foliar apresenta organização semelhante a de um pecíolo, ou seja, feixe vascular restrito apenas à nervura central, e lâmina foliar reduzida (Figs. 8A-C).

Uma característica observada nesta região de *T. paniculatum* e *P. mucronata*, foi a organização radiada do sistema fundamental na região adaxial resultante de divisões periclinais (Figs. 8A-B).

Discussão

As diferentes morfologias foliares observadas nas espécies de Portulacaceae e Talinaceae estudadas surgem como resultado de diferentes padrões de desenvolvimento. A presença ou não de uma lâmina foliar achatada está intimamente relacionada à atividade mitótica e expansão das células após o estabelecimento do primórdio foliar.

Geralmente, a ocorrência de lâmina foliar achatada é decorrente da atividade do chamado meristema marginal, situação na qual células permanecem com características meristemáticas e com intensa atividade mitótica unicamente nas regiões laterais da nervura central, resultando no crescimento da folha em um plano apenas (Esau 1960; Fahn, 1990). Esta é a situação encontrada em *P. mucronata*, *P. hirsutissima* e *T. paniculatum*.

Por outro lado, folhas desprovidas de lâminas achatadas e sem uma dorsiventralidade óbvia, ocorrente em *P. werdermannii* e *P. halimoides*, surgem como resultado da persistência de células meristemáticas sub-epidérmicas ao redor de toda a circunferência do primórdio foliar. Desta forma, por meio de constantes divisões deste “envelope” meristemático, a folha cresce de maneira mais ou menos uniforme em todos os planos, resultando em uma morfologia cilíndrica.

Contudo, é importante ressaltar que o tamanho e formato da folha não são necessariamente definidos pela atividade do meristema marginal, mas estão ligados a processos dependentes e independentes de divisão celular (Fleming, 2002). Desta maneira, mesmo após o encerramento da atividade do meristema marginal, uma folha pode alterar sua forma ao longo do desenvolvimento através de crescimento alométrico, ou seja, expansão celular desigual em diferentes regiões do órgão (Dengler & Tsukaya, 2001).

De qualquer maneira, em Cactaceae o desenvolvimento foliar parece seguir os mesmos padrões encontrados nas espécies estudadas no presente trabalho. Embora a situação mais comum em Cactaceae seja a presença de folhas reduzidas, em *Pereskia* o desenvolvimento da lâmina foliar segue, no geral, um padrão semelhante àquele encontrado em *P. mucronata*, *P. hirsutissima* e *T. paniculatum*, comumente observado em outras eudicotiledôneas (Boke, 1954).

Por outro lado, o padrão de desenvolvimento encontrado nas espécies com folhas sem lâmina achatada (*P. halimoides* e *P. werdermannii*) se assemelha àquele encontrado em espécies de *Maihuenia* (Gibson, 1977) e *Opuntia* (Boke, 1944), com a presença de uma região meristemática ao redor de toda a circunferência da folha (embora Freeman [1970] não registre a presença desta região em *Opuntia basilaris*, relatando apenas divisões intercalares responsáveis pelo aumento do mesofilo).

Contudo, nestes trabalhos os autores afirmam a inexistência do meristema marginal. Boke (1944) denomina a porção meristemática que envolve a folha de meristema periférico (“peripheral meristem”), e limita o uso da terminologia “meristema marginal” a primórdios que desenvolvem lâminas achatadas (Boke, 1954). Boke (1944) comenta ainda que o comportamento deste “meristema

periférico” é muito semelhante àquele do meristema adaxial que ocorre em pecíolos, porém com distribuição ao redor de toda a circunferência da folha. Embora não seja explícito o motivo da utilização de um termo diferente para a designação do meristema que contribui para o crescimento do mesofilo, seja ele na forma de uma lâmina achatada ou não, este deve estar ligado ao fato de que, em folhas sem lâmina achatada, o meristema periférico sofre divisões preferencialmente periclinais, enquanto no meristema marginal propriamente dito ocorre uma organização mais complexa das divisões celulares (Boke, 1944; 1954).

Como alternativa ao uso da terminologia “meristema marginal”, alguns autores adotam o uso de “marginal blastozone”, com o argumento de que o termo enfatiza a importância desta região na morfogênese da folha (Hagemann & Gleissberg, 1996; Dengler & Tsukaya, 2001).

Optamos pelo uso de “meristema marginal” por ser um termo mais amplamente difundido. Além disso, não adotamos o termo “meristema periférico” por acreditarmos que a situação encontrada em folhas sem lâminas achatadas (i.e., a presença de uma zona meristemática ao redor de toda a circunferência da folha) trata-se apenas de uma variação do que é comumente encontrado ao longo do desenvolvimento de folhas que apresentam lâminas achatadas (zonas meristemáticas apenas na região da margem).

A variação na atividade meristemática durante as fases iniciais de primórdios foliares gerando folhas com diferentes morfologias é notável também em outros grupos. *Acacia longifolia* (Fabaceae), por exemplo, possui folhas com limbo expandido no sentido abaxial-adaxial, e não no sentido lateral, como normalmente encontrado em folhas de eudicotiledôneas. Nestas folhas, após o estabelecimento

do primórdio foliar não ocorre a instalação do meristema marginal, enquanto que o meristema adaxial apresenta atividade acentuada (Boke, 1940).

A mesma situação pode ser encontrada em folhas de algumas monocotiledôneas, como *Acorus calamus* L. (Araceae) onde o crescimento no eixo vertical da folha é resultado da baixa (ou nenhuma) atividade do meristema marginal e uma intensa atividade do meristema adaxial (Kaplan, 1970).

É notável que nas espécies sem um limbo achatado, ocorre uma menor expressão da dorsiventralidade. Nestas espécies, com o desenvolvimento de um limbo com formato próximo ao cilíndrico, o feixe vascular principal assume posição central, enquanto os feixes periféricos se distribuem uniformemente ao redor de todo o mesofilo, próximo à epiderme. Esta observação é semelhante aos dados obtidos por Ogburn & Edwards (2009) para outras espécies de Portulacineae. Neste trabalho os autores observam que folhas bifaciais exibem uma maior diferenciação entre mesofilo em paliádico e lacunoso, em relação a folhas que não possuem limbo achatado.

O mesmo arranjo dos feixes laterais aqui observado é descrito por Marinho & Estelita (1996) para *P. mucronata*, e por Voznesenskaya *et. al.* (2010) para *P. grandiflora* e *P. anillis*, estando, segundo os autores, provavelmente relacionado à anatomia Kranz e fotossíntese C4. É interessante notar que a anatomia Kranz foi observada apenas em espécies com folhas sem limbo achatado. Nestas espécies, a endoderme assume características de bainha Kranz, com cloroplastos distribuídos centrípetamente. A anatomia Kranz, juntamente com a disposição muito próxima dos feixes periféricos entre si, indica a possível ocorrência de fotossíntese C4 nestas espécies. A ocorrência de anatomia Kranz e fotossíntese C4 são bem relatadas para

o gênero *Portulaca*, sendo inclusive registrado um tipo intermediário de fotossíntese C3-C4 em algumas espécies (Nyananyo, 1988; Marinho & Estelita, 1996; Voznesenskaya *et. al.*, 2010).

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com Marinho & Estelita (1996) e Voznesenskaya *et. al.*(2010), ao não registrar da ocorrência de feixes vasculares próximos à face abaxial em folhas com lâmina achatada. Nessas espécies, os feixes laterais estão situados próximos a face adaxial ou na região mediana do mesofilo.

Os mecanismos que controlam a determinação da simetria foliar vêm sendo estudados, especialmente em plantas modelos como *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) e *Antirrhinum majus* (Plantaginaceae). Nestas espécies, a simetria dorsiventral está ligada à expressão de genes como *PHANTASTICA*, *PINHEAD*, *ARGONAUTE1*, *PHABULOSA* e genes da família *YABBY*, que em conjunto determinam o eixo adaxial-abaxial da folha (Leyser & Day 2003). Mutantes destes genes exibem abaxialização ou adaxialização das folhas, ou seja, células adaxiais apresentando características de células abaxiais e vice-versa. Alguns mutantes como, por exemplo, do gene *PHANTASTICA*, produzem folhas cilíndricas, com simetria radial, cujos tecidos apresentam apenas características das células abaxiais das folhas selvagens, ou seja, sem a diferenciação de feixes vasculares periféricos. Com base nestes modelos, podemos supor que o arranjo de feixes vasculares periféricos em algumas espécies de *Portulaca*, deve ser o resultado de um processo de adaxialização, relacionado a mudanças na expressão dos ortólogos destes genes.

Nas espécies estudadas, além da participação do meristema marginal e de divisões difusas, foi observada a participação da endoderme na produção de novas

células do mesofilo através de divisões periclinais. Esta atividade foi notada não apenas no feixe central, mas também nos feixes periféricos e laterais. Embora diversos autores descrevam a atividade meristemática da na raiz (Williams, 1947; Van Fleet, 1961; Menezes *et al.*, 2005), há pouquíssimos relatos em folhas, como em *Echinodorus paniculatus* Micheli (Alismataceae) (Menezes *et. al.*, 2005).

O fato da endoderme apresentar atividade meristemática em folhas de espécies tão distantes filogeneticamente talvez indique que esta seja uma situação muito comum, e que a falta de relatos na literatura esteja relacionada a pouca aceitação da presença deste tecido nas folhas.

Com os dados obtidos no presente estudo demonstramos que o desenvolvimento foliar em *Portulaca* e *Talinum* segue o mesmo padrão encontrado em Cactaceae, especialmente em relação à atividade meristemática responsável pela produção de novas células do mesofilo, podendo representar uma homologia entre estes grupos. Contudo, devemos lembrar que trabalhos com grupos não relacionados filogeneticamente relatam variações semelhantes na atividade meristemática presente na folha, levando à formação de folhas com morfologias similares. Sendo assim, o estabelecimento deste caráter como homologia dentro do grupo não é uma tarefa trivial. Maiores estudos, abrangendo não só outros clados de ACPT (como Anacampserotaceae), mas também grupos externos, poderão esclarecer esta questão.

Referências bibliográficas

Boke, N. H. 1940. Histogenesis and Morphology of the Phyllode in Certain Species of Acacia. **American Journal of Botany** **27**: 73 – 90.

- Boke, N. H. 1944. Histogenesis of the Leaf and Areole in *Opuntia cylindrica*. **American Journal of Botany** **31**: 299 – 316.
- Boke, N. H. 1954. Organogenesis of the Vegetative Shoot in *Pereskia*. **American Journal of Botany** **41**: 619 – 637.
- Dengler, N. G. & Tsukaya, H. 2001. Leaf morphogenesis in dicotyledons: Current issues. **International Journal of Plant Sciences** **162**: 459 – 464.
- Esau, K. 1960. **Anatomy of seed plants**. Wiley & Sons, New York.
- Fahn, A. 1990. **Plant anatomy**. 4.ed. Pergamon Press, Oxford.
- Fleming, A. J. 2002. The mechanism of leaf morphogenesis. **Planta** **216**: 17 – 22.
- Freeman, T. P. 1970. The Developmental Anatomy of *Opuntia basilaris*. II. Apical Meristem, Leaves, Areoles, Glochids. **American Journal of Botany** **57**: 616 – 622.
- Gibson, A. C. 1977. Vegetative Anatomy of *Maihuenia* (Cactaceae) with some Theoretical Discussions of Ontogenetic Changes in Xylem Cell Types. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** **104**: 35 – 48.
- Gibson, A. C. & Nobel, P. S. 1986. **The Cactus Primer**. Harvard University Press, Cambridge.
- Griffith, M. P. 2004. What Did the First Cactus Look like? An Attempt to Reconcile the Morphological and Molecular Evidence. **Taxon** **53**: 493 – 499.
- Griffith, M. P. 2008. *Pereskia*, Portulacaceae, Photosynthesis, and Phylogenies: Implications for Early Cactaceae. **Haseltonia** 37 – 45.
- Hagemann, W. & Gleissberg, S. 1996. Organogenetic capacity of leaves: The significance of marginal blastozones in angiosperms. **Plant Systematics and Evolution** **199**: 121 – 152.
- Herskovitz, M. A. 1991. Leaf Morphology of *Cistanthe* Spach (Portulacaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden** **78**: 1022 – 1060.
- Herskovitz, M. A. 1993. Revised Circumscriptions and Subgeneric Taxonomies of *Calandrinia* and *Montiopsis* (Portulacaceae) with Notes on Phylogeny of the Portulacaceous Alliance. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **80**: 333 – 365.
- Johansen, D. A. 1940. **Plant microtechnique**. 3.ed. Paul B. Hoeber Inc, New York.
- Kaplan, D. R. 1970. Comparative Foliar Histogenesis in *Acorus calamus* and its Bearing on the Phyllode Theory of Monocotyledonous Leaves. **American Journal of Botany** **57**: 331 – 361.

- Kraus, J. E.; Sousa, H. C.; Rezende, M. H.; Castro, N. M.; Vecchi, C. & Luque, R. 1998. Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials. **Biotechnic & Histochemistry** 73: 235 – 243.
- Leyser, O. & Day, S. 2003. **Mechanisms in Plant Development**. Blackwell Publishing, Oxford.
- Marinho, T. C. & Estelita, M. E. M. 1996. Anatomia e ultra-estrutura foliar das Portulacaceae da Serra do Cipó, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Botânica** 19: 61 – 65.
- Menezes, N. L.; Silva, D. C.; Arruda, R. C. O.; Melo-de-Pinna, G. F.; Cardoso, V. A.; Castro, N. M.; Scatena, V. L. & Scremin-Dias, E. 2005. Meristematic activity of the Endodermis and the Pericycle in the primary thickening in monocotyledons. Considerations on the "PTM". **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 77: 259 – 274.
- Nyananyo, B. L. 1988. Leaf Anatomical Studies in the Portulacaceae (Centrospermae) with Regards to Photosynthetic Pathways. **Folia Geobotanica & Phytotaxonomica** 23: 99 – 101.
- Nyffeler, R. 2007. The Closest Relatives of Cacti: Insights from Phylogenetic Analyses of Chloroplast and Mitochondrial Sequences with Special Emphasis on Relationships in the Tribe Anacampseroteae. **American Journal of Botany** 94: 89 – 101.
- Nyffeler, R.; Eggli, U.; Ogburn, M. & Edwards, E. 2008. Variations on A Theme: Repeated Evolution of Succulent Life Forms in the Portulacineae (Caryophyllales). **Haseltonia** 26 – 36.
- O'Brien, T.P.; Feder, N. & McCully, M.E. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368 – 373.
- Ogburn, R. M. & Edwards, E. J. 2009. Anatomical variation in Cactaceae and relatives: Trait lability and evolutionary innovation. **American Journal of Botany** 96: 391 – 408.
- Ruzin, S. E. 1999. **Plant Microtechnique and Microscopy**. Oxford University Press, New York.
- Stevens, P. F. (2001). **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 9, June 2008. Website <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> [Acessado em Agosto, 2010].
- Van Fleet, D. S. 1961. Histochemistry and function of the endodermis. **The Botanical Review** 27: 165 – 221.

Voznesenskaya, E. V.; Koteyeva, N. K.; Edwards, G. E. & Ocampo, G. 2010. Revealing diversity in structural and biochemical forms of C. **Journal of Experimental Botany** **61**: 3647 – 3662.

Williams, B. C. 1947. The structure of the meristematic root tip and origin of the primary tissues in the roots of vascular plants. **American Journal of Botany** **34**: 455–462.

Figura 1. Seções transversais do ápice caulinar de *Portulaca werdermannii* e *P. halimoides*. Primórdios foliares em diferentes estágios de desenvolvimento em *P. werdermannii* (A) e *P. halimoides* (B). Detalhes de primórdios foliares, mostrando estágios de diferenciação do meristema marginal (Mm) e da endoderme (En) em *P. werdermannii* (C, E-F) e *P. halimoides* (D). Notar divisão periclinal da hipoderme (ponta de seta). Barras = 400µm (A), 200µm (B, F), 30µm (C), 50µm (D-E).

Figura 2. Seções transversais de primórdios foliares de *Portulaca werdermannii* e *P. halimoides*. Estágios de diferenciação do sistema vascular periférico (Vp) e do fundamental em *P. werdermannii* (D-E) e *P. halimoides* (A-C). Notar hipoderme já diferenciada em A e B (Hp) e células da endoderme com divisão periclinal (En). Célula contendo drusa (seta branca) Barras= 50µm (A-D), 200µm (E).

Figura 3. Seções transversais da folha de *Portulaca halimoides* (A-B, E) e *P. werdermannii* (C-D). Neste estágio, não se observam regiões meristemáticas. Notar o amplo parênquima aquífero (Pa) e a anatomia Kranz (endoderme, En) associada ao mesofilo radiado (ponta de seta). Células contendo mucilagem (seta). Barras= 400µm (A, C), 100µm (D-E), 50µm (B).

Figura 4. A-B. Seções transversais da folha de *Portulaca halimoides* (A) e *P. werdermannii* (B). Detalhe do feixe vascular central sem a diferenciação da endoderme como bainha Kranz. C-F. Seções transversais da região basal da folha de *P. halimoides* (C,D) e *P. werdermannii* (E,F) mostrando a redução (em direção à base) das porções meristemáticas que darão origem a novos feixes periféricos (região tracejada). Notar divisões periclinais das células da endoderme (En). Barras= 50µm (A, C-D), 100µm (B, E-F).

Figura 5. Seções transversais do ápice caular de *Talinum paniculatum* (A,C,D), *Portulaca mucronata* (E) e *P. hirsutissima* (B,F). A-B. Primórdios foliares em diferentes estágios de diferenciação e base de folhas (asterisco). C-D. Detalhe dos primórdios foliares de *T. paniculatum*, sendo possível observar que as células da porção abaxial estão vacuoladas, em contraste com as células da face adaxial que apresentam citoplasma denso (meristema marginal, Mn). E-F. Primórdios foliares em estágios de diferenciação semelhante ao observado na figura D. Barras= 200µm (A, B), 50µm (C,F), 100µm (D, E).

Figura 6. Seções transversais de primórdios foliares de *Talinum paniculatum* (A), *Portulaca mucronata* (B-D, F) e *P. hirsutissima* (E). Notar nas figuras A e B, endoderme com atividade mitótica (En). Nas figuras B-F é possível observar que células derivadas do meristema marginal se dividem em diferentes planos, resultando na formação de cordões procambiais apenas na face adaxial, caracterizando uma simetria dorsiventral. Barras= 50µm (A-D, F), 100µm (E).

Figura 7. Seções transversais de primórdios foliares de *Portulaca mucronata* (A,D), *Talinum paniculatum* (B,E) e *P. hirsutissima* (C,F). Notar diferentes atividades do meristema marginal: em *P. mucronata* (A) há atividade uniforme em ambas as faces; *T. paniculatum* (B) com intensa divisão celular na face adaxial e *P. hirsutissima* (C) com atividade do meristema marginal acentuada na face adaxial, e reduzida no sentido lateral. D-F. Estágios posteriores de diferenciação da lâmina foliar. Neste estágio, com o crescimento diferencial de ambas as faces da lâmina foliar, as folhas de *T. paniculatum* se distendem e perdem a conformação revoluta (E). Nos feixes laterais não foi observada anatomia Kranz (D-F). Células de mucilagem foram observadas em toda região do mesofilo (setas). Barras= 200µm (A), 100µm (B, D), 50µm (C, E-F).

Figura 8. Seções transversais da região da base da folha de *Talinum paniculatum* (A, asterisco), *Portulaca mucronata* (B) e *P. hirsutissima* (C). Notar organização radiada do sistema fundamental na região adaxial resultante de divisões periclinais (A-B). Barras= 100 μ m (A-C).

Considerações finais

Considerações finais

A proposta inicial deste trabalho foi realizar um estudo morfo-anatômico da região da axila foliar, buscando caracteres potencialmente informativos para a filogenia do grupo ACPT. Durante as análises das lâminas histológicas, percebemos que tínhamos um excelente material para desenvolver um trabalho sobre histogênese foliar, aspecto pouco explorado na literatura do grupo. Desta forma, como produtos deste estudo, foram escritos dois capítulos no formato de manuscritos que serão submetidos à publicação.

Os resultados obtidos foram discutidos em cada capítulo, mas alguns pontos relevantes merecem ser destacados como considerações finais do trabalho.

Capítulo 1: Homologias primárias no clado ACPT: um estudo da região da axila foliar em Portulacaceae e Talinaceae.

Com o desenvolvimento deste trabalho concluímos que existem outros caracteres, além de tricomas foliares, constantes nas espécies analisadas, assim como em Cactaceae e Anacampserotaceae, que parecem constituir sinapomorfias considerando-se o clado ACPT.

Futuros estudos envolvendo outros representantes do clado ACPT poderão esclarecer a extensão da ocorrência dos caracteres aqui levantados, permitindo assim definir a quais grupos cada caractere sustenta como sinapomorfia. Especial atenção deve ser dada a estudos de desenvolvimento das estruturas foliares derivadas da gema axilar em espécies de *Talinum*, que podem representar fonte de informações sobre a origem dos espinhos e da estrutura da aréola no grupo.

Capítulo 2: Histogênese foliar em espécies de Portulacaceae e Talinaceae.

Este capítulo proporcionou um conhecimento, ainda não disponível na literatura, sobre o desenvolvimento foliar em Portulacaceae e Talinaceae. Por meio de uma abordagem comparativa com outros representantes do clado ACPT, em especial da família Cactaceae, foi possível observar que este mesmo padrão de desenvolvimento é recorrente no grupo.

Também foi possível discutir que o termo “meristema periférico”, na realidade trata-se de uma variação da situação encontrada em outras angiospermas, definida como meristema marginal. Desta forma, acreditamos que os mecanismos envolvidos no desenvolvimento foliar apresentam um padrão estrutural, com pequenas variações do tema que resultam nas diferentes morfologias foliares encontradas na natureza.

Resumo

Trabalhos recentes vêm tentando resolver as relações filogenéticas na subordem Portulacineae. A família Portulacaceae, como tradicionalmente circunscrita, não constituía um grupo monofilético e recentemente foi desmembrada em diversas famílias menores. Algumas destas famílias, juntamente à família Cactaceae, formam o clado ACPT (Anacampsetotaceae, Cactaceae, Portulacaceae e Talinaceae), sustentado principalmente por dados moleculares, sendo poucos os caracteres morfológicos e anatômicos reconhecidos como sinapomorfias. A presente dissertação teve como objetivo documentar a anatomia e o desenvolvimento de folhas e da região da axila foliar em espécies de Portulacaceae e Talinaceae, discutindo os resultados com a literatura existente para outros grupos do clado ACPT. Técnicas usuais em anatomia vegetal foram usadas para analisar folhas e regiões nodais do ápice e base do caule. Como principais resultados, pudemos observar diversos caracteres presentes na região da axila foliar que representam homologias primárias dentro do clado ACPT. Além disso, descrevemos diferentes padrões de desenvolvimento foliar, relacionados especialmente com a atividade do meristema marginal, levando a diferentes morfologias foliares. Acreditamos que os dados aqui obtidos sejam relevantes para uma melhor compreensão da evolução das diferentes linhagens do clado ACPT, e que futuros estudos, abordando outros grupos com maiores detalhes, poderão testar estas hipóteses de homologias primárias aqui propostas.

Palavras-chave: Portulacineae; axila foliar; desenvolvimento foliar; anatomia; *Portulaca*; *Talinum*.

Abstract

Recent works attempt to resolve the phylogenetic relationships within suborder Portulacineae. The family Portulacaceae, as traditionally circumscribed, is not monophyletic, and was recently split into several smaller families. Some of these families, along with Cactaceae, form the ACPT clade (Anacampsetotaceae, Cactaceae, Portulacaceae and Talinaceae), sustained mainly by molecular data. Few morphological and anatomical synapomorphies are known for the group. This dissertation aims to investigate the anatomy and development of leaves and leaf axils in species of Portulacaceae and Talinaceae, discussing the results with existing literature for other groups of the ACPT clade. Usual techniques of plant anatomy were used to examine leaves and nodal regions of apical and basal portions of stems. As main results, we observed several characters present in the region of leaf axil that represent primary homologies within ACPT clade. In addition, we describe different patterns of leaf development, especially related to the activity of the marginal meristem leading to different leaf morphologies. We believe that these data are relevant to a better understanding of the evolution in different lineages of the ACPT clade. Future studies, addressing other groups in greater detail, will be able to test these hypotheses of primary homologies proposed here.

Key words: Portulacineae; leaf axil; leaf development; anatomy; *Portulaca*; *Talinum*.

Capa: Secção longitudinal do caule de *Portulaca halimoides*.