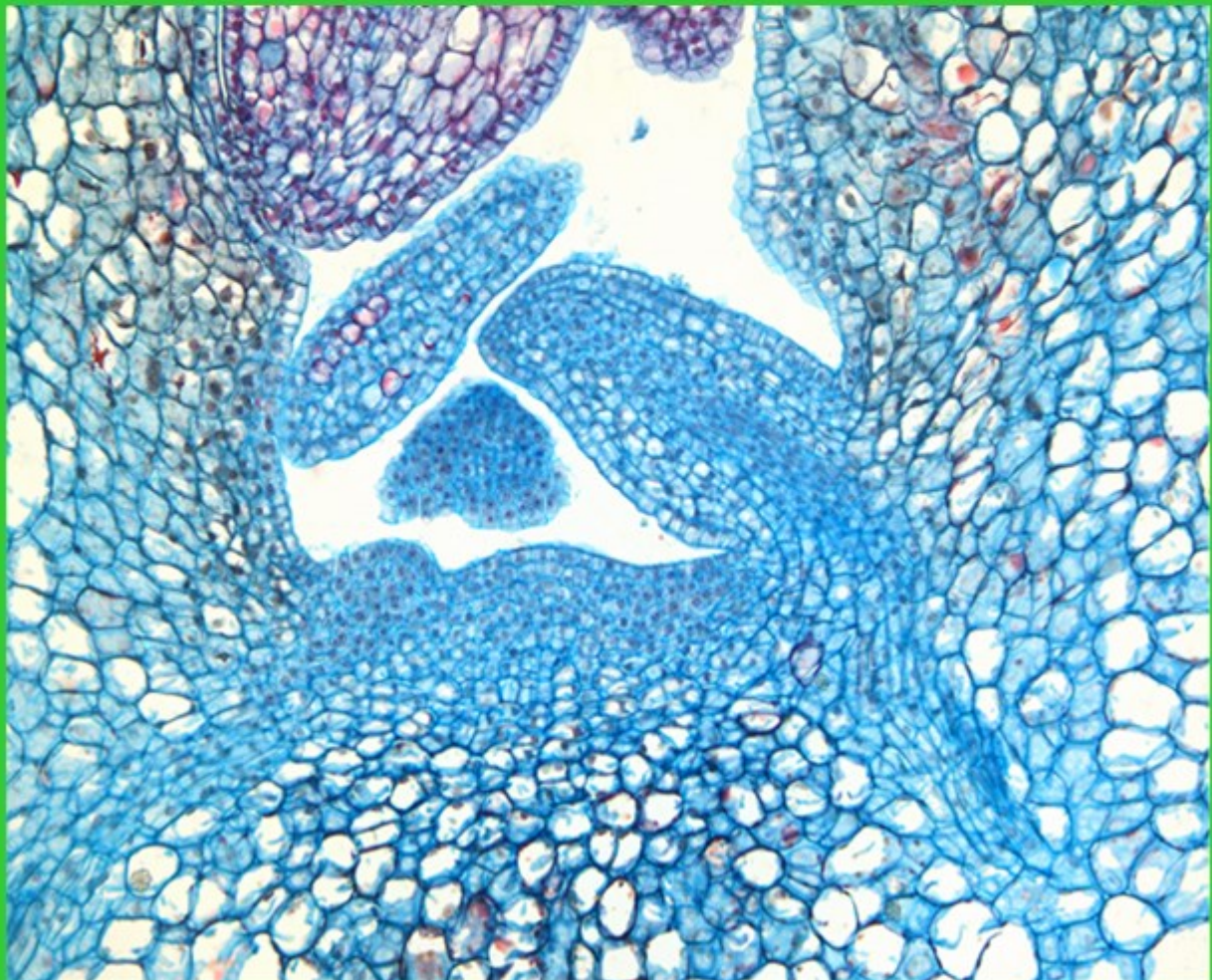


Mario Albino de Oliveira Neto

**Ontogênese da Região da Axila Foliar e
Filogenia Molecular de Didiereaceae: A
História de um Caráter e suas Implicações
Filogenéticas em Portulacineae.**



São Paulo
2014

Mario Albino de Oliveira Neto

Ontogênese da Região da Axila Foliar
e Filogenia Molecular de Didiereaceae:
A História de um Caráter e suas
Implicações Filogenéticas em
Portulacineae.

Axillary Bud Ontogenesis and Molecular Phylogeny of
Didiereaceae: a Character History and its Phylogenetic
Implications in Portulacineae.

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gladys Flávia de
Albuquerque Melo-de-Pinna

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica

OLIVEIRA-NETO, MARIO ALBINO DE

**ONTOGÊNESE DA REGIÃO DA AXILA FOLIAR
E FILOGENIA MOLECULAR DE
DIDIEREACEAE: A HISTÓRIA DE UM
CARÁTER E SUAS IMPLICAÇÕES
FILOGENÉTICAS EM PORTULACINEAE.**

132 páginas

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

1. Anatomia 2. Filogenia 3. Didiereaceae
I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof^a. Dr^a.
Gladys Flávia A. Melo de Pinna

Para minha mãe e avó.

AGRADECIMENTOS

Ao **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo** por me proporcionar sete anos (incluindo graduação e mestrado) onde eu aprendi muito e fiz muitas amizades. Ao **Laboratório de Anatomia Vegetal**, onde grande parte dos meus dias foram passadas durante os últimos quatro anos, por me proporcionar estrutura para desenvolver o mestrado. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pelo financiamento do meu mestrado.

À orientadora **Gladys Flávia de Albuquerque Melo de Pinna**, por compartilhar comigo a sua paixão pela anatomia e desenvolvimento vegetal, por me transmitir a sua visão de que a Ciência deve ser feita de maneira colaborativa e por acreditar em mim e me confiar uma missão, que nem eu mesmo acreditei que conseguiria. Agradeço também à grande amiga para a vida toda **Flávia**, por me acolher em sua equipe de pesquisa da melhor maneira possível, pelas longas discussões científicas e filosóficas que nos renderam muitos momentos (guardados com o maior carinho) e pelo bom humor sempre contagiante!

Aos técnicos do Laboratório de Anatomia Vegetal **Gisele Costa**, **Tássia Cristina dos Santos** e **Irwandro Pires**, pelos favores e auxílio em diversos momentos e por manter o laboratório sempre em funcionamento.

À **Dr^a. Cornelia Klak** e o **Dr. Peter Bruyns**, do Bolus Herbarium da Universidade de Cape Town, por me receberem em seu laboratório, pela colaboração no trabalho e pela amizade. Ao **Dr. Terry Hedderson**, por me receber no Bolus Herbarium e pela amizade.

Aos professores do Departamento de Botânica IB-USP **Prof^a. Nanuza Luiza de Meneses**, **Prof. Diego Demarco** e **Prof^a. Lúcia Garcez Lohmann**, por aceitarem participar da minha banca de qualificação e pelas valiosas sugestões.

Aos professores do Departamento de Botânica do IB-USP, **Prof^a. Nanuza Luiza de Meneses**, **Prof. Gregório Ceccantini**, **Prof^a. Veronica Angyalossy**, **Prof^a. Berta Lange de Morretes**, **Prof. Diego Demarco**, **Prof. José Rubens Pirani**, **Prof. Renato de Mello-Silva** e **Prof. Paulo Takeo Sano**, pelos ensinamentos.

Aos professores das disciplinas que cursei durante o mestrado **Prof^a. Gladys Flávia Melo de Pinna**, **Prof. Marcelo Dornelas**, **Dr. Gilberto Ocampo**, **Prof. Ricardo Ribeiro Rodrigues**, **Prof. Vinicius Castro Souza**, **Dr^a. Natália Macedo Ivanauskas** e **Prof. Jorge Yoshio Tamashiro** (“Tamashake”) pelos ensinamentos teóricos e práticos e pelos incontáveis momentos de diversão.

Aos grandes amigos da equipe da **Prof. Gladys Flávia Melo-de-Pinna, José Hernandez, Aline Siqueira Nunes, Rafael Cruz, Ariane Lazarini, Marília Duarte, Renata Lemos, Fernanda Cordeiro, Juliana Castelo Branco, Maria Cristina Zampieri, Emília Arruda, Carla Verna, Lígia Keiko, Amanda Schiersner e Francisco Aires**, principalmente pela amizade, mas também, por todos os incontáveis favores, pelas experiências compartilhadas e pelos momentos de descontração nos mais diversos locais, até na Bahia! Em especial ao **José Hernandez** pela orientação durante a iniciação científica e o **Rafael Cruz** pelo auxílio com as análises de reconstrução do caráter ancestral.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, **Caian Gerolamo, Carolina Lopes, Keyla Rodrigues, Giuliano Locosselli, Gustavo Burin, Luiza Teixeira, Júlio Majcher, Karina Beterchine, Marcelo Pace, Mariana Victorio, Raquel Koch, Yasmin Hirao, e Vitor Barão**, por todos os momentos de descontração na sala de Pós, copa, laboratório e pelos corredores do departamento.

Ao **Prof. Dr. José Rubens Pirani** e à **Juliana El Ottra** do Laboratório de Sistemática Vegetal por permitirem o uso do fotomicroscópio.

Ao meu pai **Celso Albino de Oliveira**, pelo amor incondicional, e ao meu irmão **Celso Albino de Oliveira Filho**, pelo exemplo de como enxergar a vida de uma maneira positiva mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha mãe **Ana Rosa Batista Pereira Albino de Oliveira** e avó **Nair Batista Pereira**, às quais eu dedico esta dissertação. A mãe pelo amor e apoio incondicional e por me aguentar mesmo nos momentos finais da dissertação e à avó pelo arroz, feijão e carne moída com gosto de infância e história de vida que serve de exemplo a ser seguido, duas guerreiras!

Muito obrigado a todos!!!

RESUMO

Recentes análises filogenéticas, baseadas em dados moleculares, indicaram que Didiereaceae s.s. é filogeneticamente relacionada a gêneros tradicionalmente pertencentes à Portulacaceae s.l.. Sendo incluídos os gêneros *Ceraria*, *Portulacaria* e *Calyptrorhiza* em Didiereaceae e essa dividida em três subfamílias: Didieroideae (11 espécies), Portulacarioideae (7 espécies) e Calyptrorhizoideae (1 espécie). Análises moleculares apresentaram alto suporte para o monofiletismo da família e circunscrição das três subfamílias, contudo, nenhuma dessas análises elucidou completamente as relações entre os gêneros. Com a expansão de sua circunscrição, a família se tornou mais heterogênea, surgindo assim, a necessidade da investigação de características para o estabelecimento de sinapomorfias ou para corroborar suas relações dentro de Portulacineae. Diante disso, o presente trabalho realizou análises de Inferência Bayesiana e Máxima Parcimônia para sete sequências diferentes do DNA do cloroplasto, *trnA-trnB*, *trnL-trnF*, *trnT-trnL*, *trnS-trnG*, *trnQ^{UUG}-rps16*, *rps16* e *rpl16*, para todas as 19 espécies de Didiereaceae e investigou a ontogênese foliar e da região de sua axila para Didieroideae e Portulacarioideae. Os resultados das análises filogenéticas corroboraram o monofiletismo da família e de suas três subfamílias, além de elucidar as relações internas em Didieroideae e Portulacarioideae. Os dois gêneros de Portulacarioideae, *Portulacaria* e *Ceraria*, não são monofiléticos e as espécies de *Ceraria* foram transferidas para *Portulacaria*. Também foi caracterizado o desenvolvimento dos diferentes padrões de variações morfológicas da folha e das folhas modificadas em espinhos e profilos. A partir dos resultados do desenvolvimento e da filogenia molecular, foi feita uma análise de reconstrução da região da axila foliar para o ancestral de Didiereaceae, que indicou a presença de braquiblastos portadores de profilos na axila foliar do ancestral comum. Como consequência, foram estabelecidas homologias entre esses profilos e os profilos de Talinaceae e espinhos de Cactaceae.

Palavras-chave: Didiereaceae, ontogênese foliar, filogenia molecular, braquiblasto, Caryophyllales

ABSTRACT

Recent phylogenetic analysis, based on molecular data, indicated that Didiereaceae *s.s.* is phylogenetic related to former Portulacaceae *s.l.* genera. The genera *Ceraria*, *Portulacaria* and *Calyptrotheca* were included in Didiereaceae and the family was divided in three subfamilies: Didieroideae (11 species), Portulacarioideae (7 species) and Calyptrothecoideae (1specie). Molecular analyses presented high statistical support to the monophyletism of the Didiereaceae and its division in three subfamilies, however, none of these analyses elucidated the relations among genera. With the expansion of its circumscription, the family became rather heterogenic, resulting in the need to investigate characteristics to the establishment of synapomorphies to the family or corroborate its relations inside Portulacineae. Therefore, we performed Bayesian Inference and Maximum Parsimony analyses for seven different chloroplast DNA regions, *trnA-trnB*, *trnL-trnF*, *trnT-trnL*, *trnS-trnG*, *trnQ^{UUG}-rps16*, *rps16* and *rpl16*, for all 19 species of Didiereaceae and investigated the leaf and leaf axil region ontogenesis for Didieroideae and Portulacarioideae. Our analyses corroborated the monophyly of the Didiereaceae and of its three subfamilies and elucidated internal relationships between the Didieroideae and the Portulacarioideae. The two genera of the Portulacarioideae, *Portulacaria* and *Ceraria*, are not monophyletic and the 5 accepted species for *Ceraria* are transferred to *Portulacaria*. Also, the ontogenesis for different morphological patterns of leaf and spines and prophyll were characterized. Based on the ontogenetical results and the molecular phylogeny, was made the reconstruction to the ancestor character for the leaf axil of Didiereaceae. This analysis indicated the presence of brachyblasts bearing prophylls in the leaf axil of the common ancestor. As a consequence, homologies between these prophylls and Talinaceae prophylls and Cactaceae spines were established.

Keywords: Didiereaceae, leaf ontogenesis, molecular phylogeny, brachyblast, Caryophyllales

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO 1. Phylogenetic Relationships in Didiereaceae from Chloroplast DNA Sequences.	27
Introdução	30
Material e métodos	33
Resultados	36
Discussão	37
Referências	46
Figuras	53
CAPÍTULO 2. Ontogênese foliar e da Região Axilar em Portulacarioideae e Didieroideae: a História de um Caráter e Suas Implicações Dentro de Portulacineae.	61
Introdução	64
Material e métodos	67
Resultados	69
Discussão	80
Referências	93
Figuras	99
CONSIDERAÇÕES FINAIS	129

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

Didiereaceae pertencente à ordem Caryophyllales, sendo composta por 19 espécies distribuídas em 7 gêneros: *Alluaudia* Drake, *Alluaudiopsis* Humbert, *Decaryia* Choux, *Didierea* Baillon, *Portulacaria* Jaquin, *Ceraria* Phearson & Stephens e *Calyptrorhiza* Gilg (Applequist & Wallace, 2003). Seus representantes apresentam hábito arbustivo ou arbóreo, com caule lenhoso e moderadamente suculento, com a presença de ramos reduzidos e contraídos na axila foliar e folhas lineares decíduas e suculentas (Nyffeler, 2008).

Porém, nem sempre a classificação proposta para a família Didiereaceae compreendeu todas as espécies e gêneros aceitos atualmente. Didiereaceae s.s. tradicionalmente compreendia em sua classificação apenas 4 gêneros (*Alluaudia*, *Alluaudiopsis*, *Decaryia* e *Didierea*), todos endêmicos da região semi-árida de Madagascar, e notórios pelas suas adaptações ao clima seco, como a presença de espinhos em braquiblastos e folhas decíduas na estação seca (Rauh, 1998). Os gêneros *Portulacaria*, *Ceraria* e *Calyptrorhiza*, endêmicos das regiões sul e leste do continente africano, tradicionalmente pertenciam à família Portulacaceae s.l., que apresentava aproximadamente 500 espécies distribuídas em 30 gêneros (McNeill, 1974).

Somente no final do século XX, filogenias baseadas em caracteres morfológicos e anatômicos para os representantes da subordem Portulacineae, vieram sugerir o parafiletismo de Portulacaceae s.l., relacionando alguns de seus gêneros a outras famílias da subordem (Carolin, 1987; Hershkovitz, 1993). De acordo com as filogenias propostas, os gêneros *Calyptrorhiza*, *Portulacaria* e *Ceraria*, formariam

um clado, estando esse filogeneticamente relacionado às famílias Didiereaceae *s.s.* e Basellaceae.

A hipótese, baseada em caracteres morfo-anatômicos, de Portulacaceae *s.l.* parafilética (Carolin, 1987; Hershkovitz, 1993), foi fortemente corroboradas por filogenias baseadas em dados moleculares do início do século XXI (Applequist e Wallace, 2001; Nyffeler, 2007; Nyffeler & Eggli, 2010; Ocampo & Columbus, 2010).

Applequist & Wallace (2000) utilizaram sequências de genes do DNA do cloroplasto para estabelecer uma filogenia para Didiereaceae *s.s.* (Fig. 1). Além das 11 espécies tradicionalmente pertencentes à família, os autores analisaram também alguns representantes das famílias Portulacaceae *s.l.* e Basellaceae. Apesar de não elucidar completamente as relações internas de Didiereaceae *s.s.*, os dados indicaram a formação de um clado, fortemente sustentado pelos dados moleculares, composto por Didiereaceae *s.s.* e os gêneros *Portulacaria*, *Ceraria* e *Calyptrorhiza*, sendo o último gênero filogeneticamente mais próximo de Didiereaceae *s.s.* do que de *Portulacaria* e *Ceraria*. Contudo somente em Applequist & Wallace (2003), os autores expandiram a classificação de Didiereaceae incorporando esses três gêneros à família.

Apesar de relativamente pequena em número de taxa, quando comparada a outras famílias da subordem, Didiereaceae foi dividida em três subfamílias: Didieroideae (com os gêneros tradicionalmente pertencentes à Didiereaceae *s.s.*: *Alluaudia*, *Alluaudiopsis*, *Decaryia* e *Didierea*), Portulacarioideae (com os gêneros *Portulacaria* e *Ceraria*) e Calypthrothecoideae (contendo apenas o gênero *Calyptrorhiza*). Essa divisão é devido às diferenças reprodutivas, morfológicas e de distribuição geográfica entre os representantes das diferentes subfamílias (Applequist & Wallace, 2003).

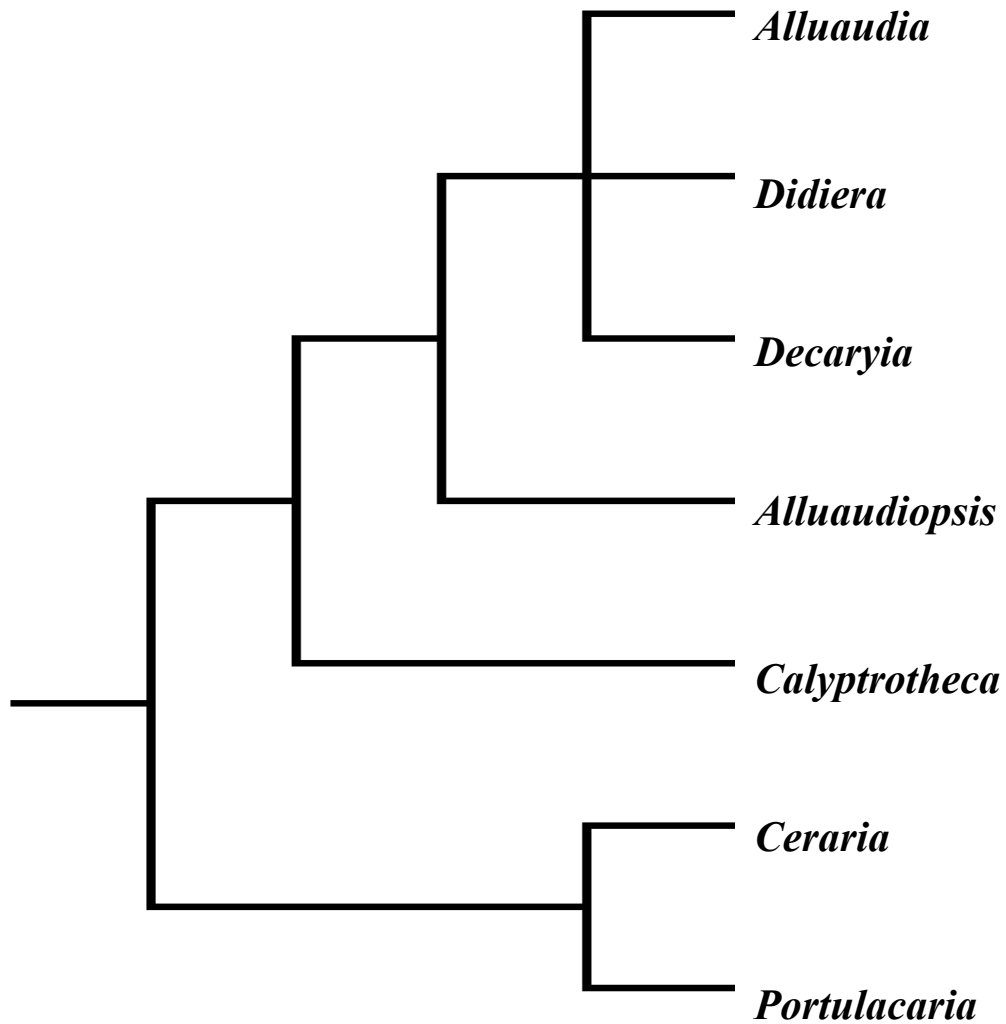


Fig. 1: Cladograma mostrando a relação filogenética entre gêneros de Didiereaceae. Baseado em filogenia proposta por Applequist & Wallace (2000).

Dentro de Caryophyllales, Didiereaceae em conjunto com as famílias Basellaceae, Cactaceae, Halophytaceae, Hectorellaceae e Portulacaceae, formam um grupo monofilético altamente derivado denominado, subordem Portulacineae (Nyffeler & Eggli, 2010). Apesar do monofiletismo dessa subordem ser altamente sustentado pelos dados moleculares, as relações filogenéticas entre os seus

representantes ainda são controversas (Fig. 2) (Applequist & Wallace, 2001; Nyffeler, 2007; Nyffeler & Egli, 2010).

O gene *ndhF* do cloroplasto não esclarece o posicionamento exato de Didiereaceae dentro de Portulacineae, incluindo a família em uma tricotomia junto com Basellaceae e o clado formado pelos gêneros de Portulacaceae *s.l.* do oeste da América (Applequist & Wallace, 2001). Já as sequências *ndhF*, *matK* e *nad1*, dos genomas do cloroplasto e mitocondrial, posicionam Didiereaceae como grupo-irmão do clado denominado ACPT, formado pelos gêneros *Talinum*, *Portulaca*, a tribo Anacampseroteae e Cactaceae (Nyffeler, 2007). Contudo, os valores que sustentam a relação de Didiereaceae como grupo irmão de ACPT são baixos.

Recentemente, Nyffeler & Egli (2010) realizaram um trabalho mais abrangente, analisando as sequências *matk* e *ndhF* do genoma do cloroplasto de 64 espécies da subordem Portulacineae. Não houve grande diferença com relação à filogenia proposta anteriormente, embora Didiereaceae tenha sido incluída em uma politomia com o clado ACPT e Basellaceae. Contudo, foi estabelecida uma nova classificação taxonômica para os representantes da família Portulacaceae *s.l.*, considerada parafilética, agrupando seus gêneros em novas famílias ou incorporando alguns de seus gêneros a outras famílias relacionadas, de maneira a restarem apenas grupos monofiléticos. Para o clado ACPT, especificamente, os autores propõe a formação de três novas famílias, Talinaceae: com os gêneros *Talinum*, *Talinella* e *Amphipetalum*; Portulacaceae: contendo apenas um gênero, *Portulaca*; e Anacampserotaceae: com os gêneros *Anacampseros*, *Grahamia* e *Talinopsis*; em conjunto com Cactaceae.

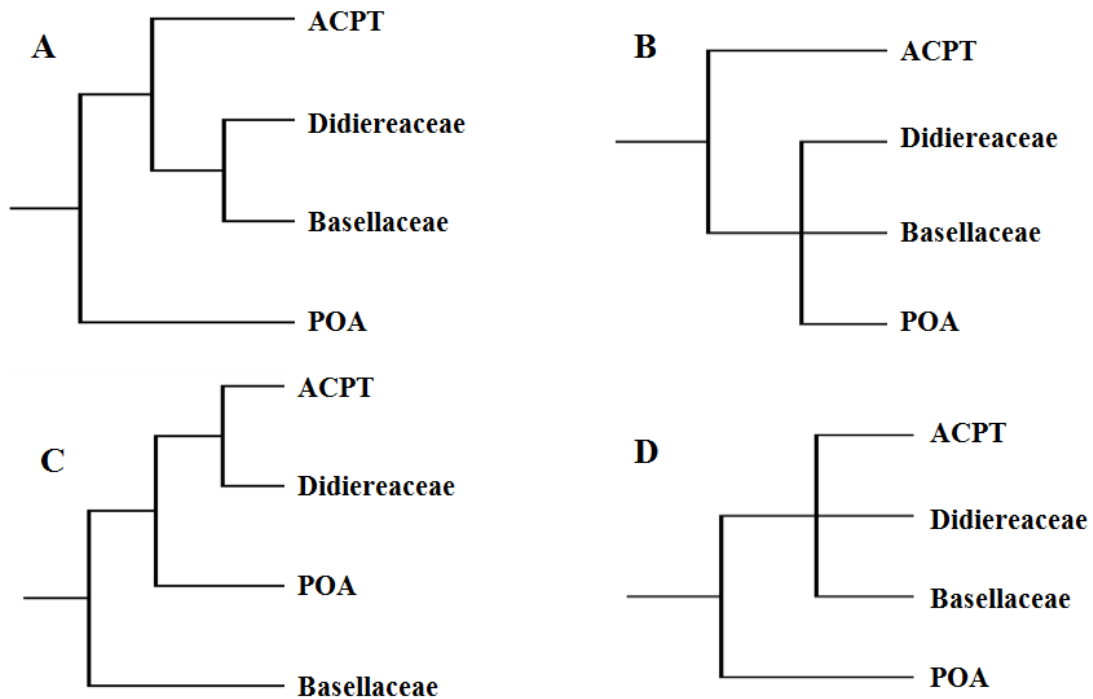


Fig. 2: Hipóteses de relações filogenéticas entre alguns representantes da subordem Portulacineae. POA representa os gêneros antes pertencentes à família Portulacaceae endêmicos da região oeste da América. A: Hershkovitz (1993), baseado em modelo cladístico de dados morfo-anatômicos. B: Applequist & Wallace (2001), baseado em dados moleculares, gene *ndhF* do cloroplasto. C: Nyffeler (2007), baseado em dados moleculares, sequências *ndhF*, *matK* e *nad1* dos genomas do cloroplasto e mitocondrial. D: Nyffeler & Eggli (2010), baseado em dados moleculares, sequências *matk* e *ndhF* do cloroplasto.

Sem uma forte sustentação estabelecida pelos dados moleculares para elucidar as relações filogenéticas entre representantes de Portulacineae, tais correlações são corroboradas por meio de dados morfológicos e anatômicos, que possam representar homologias entre as famílias (Nyffeler, 2007; Ogburn & Edwards, 2009; Nyffeler & Eggli, 2010).

As análises das características morfo-anatômicas tendem a corroborar as filogenias que posicionam Didereaceae como grupo-irmão do clado ACPT, devido a

características compartilhadas somente entre esses grupos (Ogburn & Edwards, 2009; Nyffeler & Eggli, 2010). Sendo como principais: a presença de estômatos paralelocíticos nas folhas, células com tanino e esclereides pericíclicas (Nyffeler, 2007; Ogburn & Edwards, 2009).

Outras estruturas que podem representar uma importante homologia entre Didiereaceae e o clado ACPT, são ramos reduzidos pelos entre-nós contraídos (braquiblastos) que portam folhas e podem portar também espinhos, formados na região da axila foliar dos representantes de Didieroideae, muito semelhantes à aréola de Cactaceae (Rauh, 1983; Nyffeler & Eggli, 2010). A aréola representa uma importante sinapomorfia para a família Cactaceae (Gibson & Nobel, 1986) e é caracterizada como sendo uma gema axilar que produz espinhos e gloquídeos ao invés de folhas comuns (Boke, 1980). As aréolas se situam em uma base foliar expandida e persistente e podem dar origem a estruturas reprodutivas, ramos ou até mesmo raízes (Gibson & Nobel, 1986). Tendo sua formação originada pela gema axilar semelhante à formação dos primórdios foliares, os espinhos são considerados folhas modificadas e, por tanto, a aréola de Cactaceae é considerada um ramo modificado. Vale destacar que estruturas intermediárias entre folhas e espinhos foram descritas por Boke (1944), para *Opuntia cylindrica*, corroborando essa hipótese.

Em Didiereaceae, nos representantes da subfamília Didieroideae, seus ramos reduzidos e contraídos formam um número de quatro espinhos e em seguida iniciam a formação de folhas (Nyffeler, 2008). A arquitetura desses ramos é semelhante a da aréola de Cactaceae, com a diferença que no ramo-reduzido de Didieroideae ocorre a formação de um número pequeno e determinado de espinhos, além de não haver formação de tricomas (Rauh, 1956 apud, Nyffeler & Eggli, 2010, p.231).

Outra característica que pode representar uma importante sinapomorfia morfológica entre Didiereaceae e o clado ACPT, é a presença de perfilos formados na região da axila foliar. Em análises prévias foram observadas estruturas reduzidas e filiformes presentes na axila foliar de *Portulacaria* e *Ceraria*. Estruturas semelhantes foram descritas como perfilos em representantes de Talinaceae (Nyffeler, 2007; Ogburn & Edwards, 2009; Nyffeler & Eggli, 2010). Perfilos ocorrem em qualquer ramo lateral, sendo a primeira ou cada uma das duas primeiras folhas do mesmo, geralmente ocupando uma posição determinada no ramo em relação à folha tectriz, folha formada diretamente do meristema apical caulinar (Font Quer, 1979; Ferri *et al.*, 1981). Em *Talinum* (Talinaceae), os perfilos são folhas modificadas caracterizadas pela base vascularizada; ápice lignificado; presença da gema axilar e origem nos flancos da gema que originará o ramo reduzido (Hernandes *et al.*, submetido). Essas estruturas formadas na axila de *Talinum*, assim como tricomas e cerdas formados na axila de *Portulaca* e *Anacampseros*, podem representar remanescentes de um ramo reduzido altamente condensado, sendo assim homólogos à aréola de Cactaceae, podendo representar uma sinapomorfia para ACPT (Nyffeler & Eggli, 2010).

Contudo, semelhanças estabelecidas a partir de caracteres morfo-anatômicos devem ser analisadas cuidadosamente, uma vez que, estruturas morfológicamente semelhantes podem não ter mesma origem, se tratando de convergência. Sendo necessário um estudo de desenvolvimento para o estabelecimento preciso de homologias primárias, ainda mais se tratando de um grupo com tanta diversidade morfológica, como é o caso da subordem Portulacineae.

A importância de estudos que abordem a subordem Portulacineae do ponto de vista morfo-anatômico, sobretudo com enfoque filogenético, vem sendo ressaltada há

algum tempo na literatura. Em seu trabalho Hershkovitz (1993) cita a ausência de dados anatômicos e morfológicos para o estabelecimento de relações mais conclusivas entre as famílias de Portulacineae. Applequist & Wallace (2001) chamam a atenção para a necessidade de estudos morfológicos e anatômicos que possam corroborar a filogenia molecular e estabelecer sinapomorfias entre os gêneros dentro das novas classificações. Mais recentemente, Nyffeler (2007) cita que o estudo das características morfológicas e anatômicas dos grupos mais próximos de Cactaceae pode levar a um melhor entendimento da evolução das características xerofíticas nos cactos.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo: (i) construir uma filogenia molecular que esclareça as relações internas de Didiereaceae; (ii) caracterizar, anatomicamente e descrever a ontogênese da folha e da região da axila foliar para Didieroideae e Portulacarioideae; e (iii) reconstruir o caráter ancestral para a região da axila foliar e inferir sobre a evolução desse caráter em Didiereaceae, de maneira a propor homologias entre Didiereaceae e outros representantes de Portulacineae, que possam corroborar as relações da família na subordem.

Para tanto este trabalho é dividido em 2 capítulos. No primeiro capítulo é realizada uma filogenia molecular, baseada em 7 sequências do DNA do cloroplasto, de maneira a elucidar as relações internas entre gêneros e espécies de Didiereaceae. No segundo capítulo, é feito um estudo anatômico e ontogenético da folha e da região de sua axila para 7 representantes de Didieroideae e 7 representantes de Portulacarioideae. Ainda neste capítulo, é apresentada uma proposta de reconstrução dos caracteres da região da axila foliar para o ancestral de Didiereaceae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Applequist, W. L. & Wallace, R. S. 2000. Phylogeny of the Madagascan endemic family Didiereaceae. **Plant Systematic and Evolution** **221**: 157-166.
- Applequist, W. L. & Wallace, R. S. 2001. Phylogeny of the Portulacaceous Cohort Based on *ndhF* Sequence Data. **Systematic Botany** **26**: 406 - 419.
- Applequist, W. L. & Wallace, R. S. 2003. Expanded circumscription of Didiereaceae and its division into tree subfamilies. **Adansonia series** **3, 25**: 13-16.
- Boke, N. H. 1944. Histogenesis of the Leaf and Areole in *Opuntia cylindrica*. **American Journal of Botany** **31**: 299 - 316.
- Boke, N. H. 1980. Developmental morphology and anatomy in Cactaceae. **American Institute of Biological Sciences** **30, nº 9**: 605 – 610.
- Carolin, R. 1987. A Review of the Family Portulacaceae. **Australian Journal of Botany** **35**: 383 - 412.
- Ferri, M. G.; Menezes, N. L. & Monteiro, W. R. 1981. **Glossário ilustrado de botânica**. Livraria Nobel S.A., São Paulo.
- Font Quer, P. 1979. **Diccionario de Botánica**. Editorial Labor S.A., Barcelona.
- Gibson, A.C. & NOBEL, P.S. 1986. **The Cactus Primer**. Harvard University Press, Cambridge.
- Hernandes, J.; Oliveira-Neto, M.A. & Melo-de-Pinna, G.F.A. Blastozone positioning during leaf development and its relation to leaf morphologies in Portulacineae (Caryophyllales). Submetido.

- 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.
- McNeill, J. 1974. Synopsis of a Revised Classification of the Portulacaceae. **Taxon** **23**: 725 – 728.
- 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. 2008. Variations on a theme: repeated evolution of succulent life forms in the Portulacineae (Caryophyllales). **Haseltonia** **14**: 26-36.
- 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.
- Ocampo, G. & Columbus, J. T. 2010. Molecular phylogenetics of suborder Cactineae (Caryophyllales), including insight into photosynthetic diversification and historical biogeography. **American Journal of Botany** **97**: 1827 -1847.
- 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.

Rauh, W. 1983. The morphology and systematic position of the Didiereaceae of Madagascar. **Bothalia 14**: 839 – 843.

Rauh, W. 1998. Succulent and Xerophytic Plants of Madagascar. **Strawberry Press**, Mill Valey, California, U.S.A.

CAPÍTULO 1

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS IN DIDIEREACEAE FROM
CHLOROPLAST DNA SEQUENCES.

Phylogenetic Relationships in Didiereaceae from Chloroplast DNA Sequences.

Mario Oliveira-Neto¹, Cornelia Klak², Gladys Flavia Melo-de-Pinna¹ & Peter Bruyns²

1. Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, Laboratório de Anatomia Vegetal, Rua do Matão, Travessa 14, nº 277, Cidade Universitária, CEP 05508-090, São Paulo - SP, Brasil
2. Bolus Herbarium, Department of Biological Sciences, University of Cape Town, Rondebosch 7701, South Africa

Resumo: Didiereaceae é uma família relativamente pequena de Portulacineae, composta por 19 espécies. Apesar do pequeno número de espécies, Didiereaceae é dividida em três subfamílias: Didieroideae (11 espécies), Portulacarioideae (7 espécies) e Calypthrothecoideae (1 espécie). Essa divisão é corroborada por diferenças morfológicas e reprodutivas, assim como pela distribuição disjuntiva dos gêneros. Análises moleculares apresentaram alto suporte para o monofiletismo da família e circunscrição das três subfamílias, contudo, nenhuma dessas análises elucidou completamente as relações entre os gêneros. Embora, poucas sequências plastidiais foram consideradas, e as análises não foram representativas para todos os gêneros e espécies. Sendo assim, nós realizamos análises de Inferência Bayesiana e Máxima Parcimônia para sete sequências diferentes do DNA do cloroplasto, *trnA-trnB*, *trnL-trnF*, *trnT-trnL*, *trnS-trnG*, *trnQ^{UUG}-rps16*, *rps16* e *rpl16*, para todas as 19 espécies de Didiereaceae. Nossas análises corroboraram o monofiletismo da família e de suas três subfamílias com alto suporte estatístico, além de elucidar as relações internas em Didieroideae e Portulacarioideae. Os dois gêneros de Portulacarioideae, *Portulacaria* e *Ceraria* não são monofiléticos e as 5 espécies aceitas para *Ceraria* foram transferidas para *Portulacaria*.

Abstract: The Didiereaceae is a small family in the Portulacineae with 19 species. Notwithstanding the small number of species, Didiereaceae is divided into three subfamilies: Didieroideae (11 species), Portulacarioideae (7 species) and Calypthrothecoideae (1 species). This division is corroborated by several morphological and reproductive characteristics, as well as the disjunctive distribution of the genera. Molecular analyses have shown high support for the monophyly and circumscription of the three subfamilies, but none of these analyses has completely elucidated relationships among the genera. Moreover, few plastid sequences have been considered, and those that have are not representative for all species and genera. Therefore, we performed Bayesian Inference and Maximum Parsimony analyses for seven different chloroplast DNA regions, namely *trnA-trnB*, *trnL-trnF*, *trnT-trnL*, *trnS-trnG*, *trnQ^{UUG}-rps16*, *rps16* and *rpl16*, for all 19 species of the Didiereaceae. Our analyses corroborated the monophyly of the Didiereaceae and of its three subfamilies with high statistical support and also elucidated internal relationships between the Didieroideae and the Portulacarioideae. The two genera of the Portulacarioideae, *Portulacaria* and *Ceraria*, are not monophyletic and the 5 accepted species for *Ceraria* are transferred to *Portulacaria*.

Key words: Didiereaceae, phylogeny, morphology, Caryophyllales

INTRODUCTION

Since the inclusion of the genera *Calyptrotheca*, *Ceraria* and *Portulacaria*, formerly in the Portulacaceae *s.l.*, the Didiereaceae (Applequist & Wallace, 2003) has become a more heterogenous family. Especially *Calyptrotheca*, which is a monoecious, climbing or arborescent, woody shrub with large nonsucculent leaves and without brachyblasts, is morphologically very distinct from the rest of the family. In contrast, the other genera are mostly dioecious, small trees or woody shrubs with small, often deciduous succulent leaves born in brachyblasts (Applequist & Wallace, 2003; Nyffeler & Egli, 2010; Hershkovitz, 1993).

Traditionally, *Portulacaria*, *Ceraria* and *Calyptrotheca* belonged to the Portulacaceae *s.l.* (McNeill, 1974). The relation between *Portulacaria* and *Ceraria* was largely accepted (Pax & Hoffmann, 1934; McNeill, 1974; Nyanyano, 1986). The first to related *Portulacaria* and *Ceraria* with *Calyptrotheca* were Carolin (1987) and Hershkovitz (1993), the clade was supported by the presence of opposite leaves. However, this relation was considered controversial and *Calyptrotheca* was kept in a separate tribe, Calyptrotheceae, and *Portulacaria* and *Ceraria* in the Portulacarieae, because of the many autapomorphies of *Calyptrotheca*. Hershkovitz (1993) also suggested a relationship between the Portulacarieae and the Didiereaceae *s.s.* since both groups resemble each other in gross form and pattern of leaf venation.

Didiereaceae *s.s.* was composed of four genera: *Alluaudia*, *Alluaudiopsis*, *Decaryia* and *Didierea*, all of which are endemic to the southwestern, semiarid region of Madagascar (Rauh, 1998; Rowley, 1992). The systematic position of Didiereaceae *s.s.* in Portulacineae was controversial (Hershkovitz, 1989). For a long time, the most accepted relationship was between the Didiereaceae and the Cactaceae. This was a

consequence of morphological (Rauh, 1983) and serological (Cronquist, 1988) similarities between the families.

Even though the Didiereaceae *s.s.* and the Cactaceae share many characteristics, recent analyses of plastid DNA data, corroborated the hypothesis of Hershkovitz (1993), who held that the four genera of the Didiereaceae *s.s.* constitute a clade with *Calyptrotheca*, *Ceraria* and *Portulacaria* (Applequist & Wallace, 2000, 2001; Nyffeler, 2007; Nyffeler & Eggli, 2010; Ocampo & Columbus, 2010). In all of these analyses, *Ceraria* and *Portulacaria* constitute a clade which is sister to the four genera of the Didiereaceae *s.s.* and *Calyptrotheca*. Consequently, Applequist & Wallace (2003) included *Calyptrotheca*, *Ceraria* and *Portulacaria* in an expanded concept of the Didiereaceae, dividing the family into three subfamilies: Didieroideae, consisting of the four genera traditionally placed in the Didiereaceae; Calyptrothecoideae, including only *Calyptrotheca*; and Portulacarioideae, including *Ceraria* and *Portulacaria*.

Even in this expanded form, the Didiereaceae is still small relative to other families in the Caryophyllales and consists of 19 species in 7 genera (Applequist & Wallace, 2003; Nyffeler & Eggli, 2010). Nevertheless, its division into three subfamilies is justified by their disjunctive distributions and the distinctive morphology of the genera (Applequist & Wallace, 2003). The Didieroideae is endemic to the semiarid, southwestern part of Madagascar. *Calyptrotheca* has a very restricted distribution in tropical East Africa in northern Kenya, southern Somalia and southern Ethiopia. On the other hand, *Ceraria* and *Portulacaria* occur in southern Angola, Namibia and South Africa, mostly associated with arid areas on the margins of the Namib Desert of Angola, Namibia and South Africa, except for *Portulacaria afra*, which is widespread in drier areas on the eastern flank of South Africa.

Although the monophyly of the three subfamilies is highly supported, the relationships among their species are still unsolved. In the Didierioideae, all four genera are supported as monophyletic by molecular analyses (Applequist & Wallace, 2000) and can be characterized by morphological differences (Rauh, 1998; Rowley, 1992). Nonetheless, the relationships between the genera remain a source of controversy. *Decaryia* is less specialized in morphology, this is the only genus in the subfamily where the stem is not differentiated into long and short shoots (brachyblasts), been considered a probable basal genus in the subfamily (Rowley, 1992). On the other hand, phytochemical and molecular analyses indicate that *Alluaudiopsis* is the basal genus in the subfamily (Rabesa, 1982; Rauh, 1983; Applequist & Wallace, 2000). Therefore, *Didierea* is considered as the genus with the most specialized morphological and reproductive characteristics (Rowley, 1992). However, analyses of molecular data has so far not corroborated this position and in each case *Didierea* is in a polytomy with *Alluaudia* and *Decaryia* (Applequist & Wallace, 2000; Nyffeler & Egli, 2010).

In Portulacarioideae, the relationships within *Ceraria* and *Portulacaria* have never been studied in detail, and most molecular analyses involved only a few representatives of the subfamily (Applequist & Wallace, 2000, 2001; Nyffeler & Egli, 2010; Ocampo & Columbus, 2010). Hershkovitz & Zimmer (1997) had the most representative sampling for *Ceraria* and *Portulacaria* in their analysis. They found that these genera were not monophyletic and the species of both genera are mixed in the same clade, indicating that *Portulacaria* and *Ceraria* are not well circumscribed. In addition, some species first ascribed to *Portulacaria* were later transferred to *Ceraria*, as in the case of *C. namaquensis* and *C. pygmaea* (Phearson &

Stephens, 1912; Rowley, 1996), based only on some morphological similarities, without diagnostic features being found that could separate one genus from the other.

The aims of this chapter are (i) to improve the statistical support for internal nodes of the Didieroideae in Applequist & Wallace (2000); (ii) to elucidate the relationships within the subfamilies Didieroideae and Portulacarioideae and (iii) to provide a taxonomic overview of the Portulacarioideae that takes into account the results of our analyses.

MATERIAL AND METHODS

Taxon sampling – Twenty accessions of Didiereaceae were sampled, with more than one accession for *Alluaudia comosa* and *Didierea madagascariensis*. Except for *Calypstrotheca*, all Didiereaceae were accessioned. The sequences of *Calypstrotheca somalensis* for the regions *trnL-trnF*, *trnT-trnL* and *rpl16* were downloaded from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), and are the same as those found in Applequist & Wallace (2000). Furthermore, we included eleven samples from other Caryophyllales as outgroups, including representatives of the ACPT clade (5 species), Basellaceae (1 species), Moluginaceae (1 species), Phytolacaceae (1 species), Nyctaginaceae (2 species) and Aizoaceae (1 species). We generated 195 new sequences. Also, all sequences (regions *trnL-trnF*, *trnT-trnL* and *rpl16*) from Applequist & Wallace (2000) were downloaded from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) for the 15 species of Didiereaceae considered in this analysis, including those from *C. somalensis*, as cited above.

We used data from seven chloroplast DNA sequences: the intergenic regions *trnA-trnB*, *trnL-trnF*, *trnT-trnL*, *trnS-trnG*, and *trnQ^{UUG}-rps16* and the genes *rps16* and *rpl16*. We generated 195 new sequences.

Plant material, DNA extraction, PCR, sequencing and alignment – Total DNA was isolated from fresh leaf or silica-dried material using the 2XCTAB method outlined in Doyle & Doyle (1987). Samples were ground in 700µl of extraction buffer and a pinch of polyvinylpyrrolidone (PVP-40). In some cases, where initial polymerase chain reaction (PCR) amplification did not yield a product, the DNA was further purified by using the QIAquick™ PCR purification kit, following the manufacturer's instructions. We sampled 7 chloroplast regions. The *trnS-trnG* intergenic region was amplified using the primers *trnS* and *trnG* (Hamilton, 1999), and a portion of the chloroplast *trnQ^{UG}-rps16* intergenic spacer was amplified with the primers *trnQ^{UG}* and *rps16x1* (Shaw *et al.*, 2007). The *trnL-trnF* region (consisting of the adjacent *trnL* intron and *trnL-trnF* intergenic spacer) was amplified using primers c and f (Taberlet *et al.*, 1991). Primers used for amplification of *rps16* were *rpsF* and *rpsR2* (Oxelman *et al.*, 1997). The *rpl16* intron was amplified using primers *rpl16 71F* (Jordan *et al.* 1996) and *rpl16 1516R* (Kelchner & Clark, 1997). In addition, intergene spacer *trnA-trnB* was amplified using primers *psbJ* and *petA* (Shaw *et al.*, 2007), and part of the intergene spacer *trnT-trnL* was amplified using primers *trnT* (Shaw *et al.*, 2005) and *trnL* (Demesure *et al.*, 1995).

PCRs were performed using 0.75 units of KAPATaq DNA polymerase (Kapa Biosystems, Boston, Massachusetts, USA) in 30 µl volumes also containing 1x manufacturer's NH₄ buffer and 5 mM MgCl₂, 0.1 mM of each dNTP, 0.3 µM of each primer and 3 µl of unquantified DNA template. Thermal cycling was carried out on a Hybaid Sprint set to the following thermal conditions: initial denaturation at 97°C for 2 min, followed by 30 cycles of 97°C for 1 min, 52°C for 1 min, 72°C for 2 min, with a final polymerization step of 72°C for 7 min. The PCR products were cleaned using

the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). The PCR products were sequenced at Macrogen Europe (Amsterdam, Netherlands).

Data files were assembled using GeneDoc v.2.6.002 (Nicholas & Nicholas, 1997) and Chromas v.1.43 (McCarthy, 1996-1997). Sequences were aligned by eye. Gaps were coded using the simple index coding method of Simmons & Ochoterena (2000).

Phylogenetic analysis – We performed a combined analysis for the seven sequences from the chloroplast DNA. Cladistic analyses were performed using the maximum parsimony (MP) algorithm of PAUP* v.4.0b4 (Swofford, 2000). Characters were equally weighted, and states were unordered. Each data matrix was analyzed using 1000 replicates of random taxon-addition, TBR branch-swapping with MULPARS on, and all character transformations treated as equally likely (Fitch, 1971). A limit of 10 trees saved on each replicate was set to minimize time spent for swapping on local minima. All trees of shortest length found in the initial 1000 replicates were then used as starting trees for a second round of TBR branch-swapping. Node support was evaluated by use of the jackknife (10,000 replicates with 36.79% of characters deleted at each replicate, emulate “Jac” resampling, “Fast” stepwise-addition) as implemented in PAUP*. Only groups with jackknife support percentages (JK) greater than 50 were retained. Clades with $JK \geq 63$ are regarded as supported by the data, as they are supported at least by one uncontradicted character (Farris *et al.*, 1996).

In addition, we performed an analysis using Bayesian Inference (BI), with the index included. The analysis was conducted with MrBayes v.3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). The data were apportioned into the seven regions, with the *statfreq*, *revmat*, *shape*, and *pinvar* parameters all unlinked between the partitions. Following the recommendation of Huelsenbeck & Rannala (2004), the most complex

model, GTR+G+I, was implemented for each partition. Several analyses were conducted with Markov chains on each of two independent runs with the following settings: 107 generations, with trees sampled every 100th generation. After 107 generations, it was found that the standard deviation of split frequencies was below 0.01, and the analysis was discontinued. In each analysis, by examining the decrease in the standard deviation of the split frequencies, it was found that chains had achieved stability within the first quarter of the samples; thus, burn-in was set to 25,000. The most likely tree was selected from among those found. From 75,001 trees remaining after the burn-in was discarded, a 50% majority-rule consensus tree and posterior probabilities (PP) were calculated. Supports for the nodes in the tree selected were taken from these PP values.

RESULTS

Tree regions *trnS-trnG*, *trnQ^{UUG}-rps16* and *rpl16* are quite variable and could not be aligned for outgroups. These sequences were considered as missing data in the combined analysis. The same was considered for the four regions not analyzed in Applequist & Wallace (2000). Also, some small sequences from the other regions, including *trnL-trnF*, *trnT-trnL* and *rpl16*, were unalignable for some representatives of outgroups. These regions were considered, but their unalignable parts were eliminated from the analysis. A matrix of 65486bp in length was generated, and from this, 794 characters were found to be informative. For the maximum parsimony analysis, 540 trees were generated. The best tree overall presented a 1489 step length, and the consistency index (C.I.) and retention index (R.I.) of the analyses were 0.68 and 0.845, respectively. Both MP and BI analyses were congruent (Fig. 1).

The monophyly of Didiereaceae is highly supported in both analyses (Jk=83 and PP=1.00). Furthermore, the monophyly of the three subfamilies, Didieroideae,

Calyptrothecoideae and Portulacarioideae, is also highly supported in both analysis (JK=100 and PP =1.00 for each subfamily, except for Calyptrothecoideae, which is composed of one species). Didieroideae and Calyptrothecoideae are highly supported as sisters (JK=89 and PP=1.00).

All genera from Didieroideae are well supported as monophyletic: *Didierea* (JK=74 and PP=100) (*Decaryia* is monospecific); *Alluaudia* (JK=68 and PP=1.00) and *Alluaudiopsis* (JK=100 and PP=1.00). *Alluaudia* is divided into two clades: *A. procera* + *A. montagnacii* (JK=62 and PP=1.00) and *A. comosa* + *A. dumosa* + *A. ascendens* + *A. humbertii* (JK=95 and PP=1.00). Calyptrothecoideae is monospecific, as cited before, and the genera from Portulacarioideae did not prove to be monophyletic. *P. armiana* is highly supported as a sister to *C. namaquensis* (JK=98 and PP=1.00), and these two species, in turn, comprise a sister group of *C. longipedunculata* (JK=99 and PP=1.00). This clade is sister to a smaller clade formed by *C. fruticulosa* and *C. pygmaea* (JK=93 and PP=1.00 and JK=71 and PP=1.00, respectively). *C. carrissoana* is sister to this group (JK=59 and PP=0.96), and *P. afra* is sister to the rest of the family.

The monophyly of ACPT is well supported (JK=74 and PP=1.00), and Didiereaceae, as sister to this clade, is also highly supported by BI, but not supported by MP (JK<50 and PP=1.00). At the same time, however, the sampling of outgroups was not good enough to determine the systematic position of Didiereaceae in the suborder.

DISCUSSION

1. Phylogeny of Didieraceae – Our MP and BI combined analysis of seven chloroplast DNA regions (*trnA-trnB*, *trnL-trnF*, *trnT-trnL*, *trnS-trnG*, *trnQ^{UUG}-rps16*, *rps16* and *rpl16*) highly supported the monophyly of Didiereaceae and its division

into the three subfamilies: Didieroideae, Calypthrothecoideae and Portulacarioideae. Our results are in accordance with expanded circumscription of Didiereaceae, as reported by Applequist & Wallace (2003). Although, their phylogenetic analysis (Applequist & Wallace, 2001), neither posterior phylogenetic analyzes from the mitochondrial and chloroplast genomes that corroborates Didiereaceae monophyly (Nyffeler, 2007; Nyffeler & Egli, 2010; Ocampo & Columbus, 2010), presented so high statistical support for the family as the present study.

Even though the plastidial DNA markers show a monophyletic expanded circumscription of Didiereaceae, phylogenies based on nuclear DNA only and those combined with chloroplast DNA markers do not corroborate this circumscription for the family (Hershkovitz & Zimmer, 1997; Arakaki *et al.*, 2012). The close relationship between Didieroideae and Calypthrothecoideae is not controversial, but the relationship of this clade with Potulacarioideae has not been corroborated. These two clades are separated by Basellaceae that can be positioned as sister to both, depending on the sequence analyzed, although these relationships also present poor statistical support. Our analysis presented the higher statistical support for the family (Jk=83 and PP=1.00). Even though our sample for outgroups is not representative, few taxa for other Caryophyllales families were sampled in our analysis.

The relationships within Didieareaceae presented higher support in our analysis. The most representative study for the family was Applequist & Wallace (2000). They sampled all taxa from Didieroideae and Calypthrothecoideae, but only three taxa from the seven Portulacarioideae species. Our analysis presented higher bootstrap values for all internal branches and solved all the polytomies not solved in the previous analysis. This higher support of our analyses results from the higher number of taxa sampled for Didiereaceae, with all 19 species sampled, including all

representatives from Portulacarioideae and more than one accession for some taxa, while in most studies, few taxa have been sampled. A more robust taxonomic sampling, even with incomplete sequences, could improve the phylogenetic accuracy and rescue an analysis from long-branch attraction (Crawley & Hilu, 2012). The higher statistical support is also because of a great number of different regions of chloroplast DNA analyzed with different rates of variation. Most analyses are based on only a few molecular markers, while the analysis of sequences of different modes and tempos of evolution can improve phylogenetic reconstruction for Caryophyllales (Crawley & Hilu, 2012).

Although the relationship between Calyptrothecoideae and Didieroideae is highly supported, *Calyptrotheca* is very distinct in morphoanatomy, living habit and reproductive characteristics from the rest of the family, which makes Didiereaceae very heterogeneous (Applequist & Wallace, 2003). Except for *Calyptrotheca*, most representatives from the other genera are slightly succulent trees or shrubs with reduced short-shoots formed in the axil of primary leaves. The short-shoots can bear spines and leaves in variable numbers, Didieroideae, or only leaves, Portulacarioideae (Nyffeler & Eggli, 2010). We also observed Portulacarioideae a pair of reduced prophylls in the leaf axil. In addition, the floral characteristics are the most divergent features between *Calyptrotheca* and the rest of the family. In *Calyptrotheca* flowers are large and showy, with numerous stamens (up to 60) and 6 ovules in the ovary, while in the rest of the family, the flowers are minute to small (except *A. marneriana*), the stamens are (4-)5-12, and one basal ovule in the ovary (Nyffeler & Eggli, 2010; see table 1). Moreover, most representatives of Portulacarioideae, except for *Portulacaria* and *C. carrissoana*, and Didieroideae are dioecious, while *Calyptrotheca* is monoecious (table 1). However, in Didieroideae and

Portulacarioideae, the unisexual flowers present sterile organs of the opposite sex (Erbar & Leins, 2006). This may indicate that monoecy is the plesiomorphic condition for the family, as exhibited in *Calyptrorhiza*, and that the six-ovuled ovary of the genus develops into one seed fruit, indicating a reduction that may have occurred in the rest of the family. The reason for higher stamen number in *Calyptrorhiza* flowers is still an unknown.

The settlement of synapomorphies for Didiereaceae is also a problem. Considering the floral morphology, all representatives of Didiereaceae present two bracts preceding the single perianth, although this is also present in *Basella* (Erber & Leins, 2006). While parallelocytic stomata, tannin deposits and mucilage ducts in the cortex and pericyclic sclereids are present in all Didiereaceae representatives (not know only for *Calyptrorhiza*), these characteristics are also present in some ACPT representatives, i.e., Anacampseroteae, *Portulaca* and *Talinum* (Ogburn & Edwards, 2009). Beyond these anatomical features, Portulacarioideae and Didieroideae also present similar leaf venation (Herskovitz, 1989) and similar epidermal wax pattern (Engel & Barthlott, 1988), although such characteristics are not known for *Calyptrorhiza*. In addition, as Nyffeler & Eggli (2010) pointed out in their study, the axillary outgrowths in ACPT represent a possible synapomorphy for the clade and also indicate a close relationship with Didiereaceae. The study of the leaf axil region in Didiereaceae might be very useful in further classifying this family, in particular because Portulacarioideae and Didieroideae both present contracted short-shoots (brachyblasts) with whorls of leaves and prophylls or leaves and spines (Fig. 2 & 3). The lack of anatomical and morphological studies for *Calyptrorhiza* makes it difficult to establish a pattern that represents the whole family.

According to Ocampo & Columbus (2010), the family and subfamily ages seem to be much older than their genera diversification. Didiereaceae dates from 12 mya, while the genera and species diversification began approximately 2 mya. In this analysis, representatives for Calypthrothecoideae were not included. In contrast, for Arakaki *et al.* (2012), the family is older, dating from 30 mya, although he did not consider enough representatives to estimate genera diversification. Anyway, Madagascar from 70 to 40 mya was far enough to the continent to prevent pollen exchange and seed dispersal (Landrum, 2002), thus representing a geographical isolation of the Didiereaceae *s.s.* ancestral. Considering the expanded circumscription of Didiereaceae, especially the close relationship between Didieroideae and Calypthrothecoideae, and the estimated age for the family, the most probable ancestral of Didieroideae was continental, and it was dispersed to Madagascar where the subfamily recently diversified, in accordance with the hypothesis of Applequist & Wallace (2001). The recent diversification of Didiereaceae subfamilies probable results from the recent increase in aridification over the last 10 -15 my in Africa (Klak *et al.*, 2004; Kadereit *et al.*, 2006), since they are mostly endemic to dry areas.

2. Relationships within Didieroideae. - The Didieroideae is the most notorious subfamily of Didiereaceae based on the uncommon xerophytic characteristic of its representatives, such as the presence of brachyblasts with spines, succulent leaves, and the columnar water-storing stem in some representatives of *Didierea* and *Alluaudia* (Rowley, 1992; Rauh, 1998). In this study, all four genera of this subfamily presented as monophyletic in accordance with the molecular analyses and morphological differences. This circumscription for the genera was not new, and it is in accordance with their original descriptions (Applequist & Wallace, 2000, 2001; Rauh, 1998). Rowley (1992) suggests *Decaryia* as a possible basal genus in

Didiereaceae *s.s.* by its simple morphology and its brachyblast which does not present a whorl of leaves, but this argument may not be valid since most members of Portulacarioideae also present brachyblasts with whorls of leaves, most likely representing the plesiomorphic character in Didiereaceae. In our study, *Alluaudiopsis* is the basal genus in the phylogeny, in accordance to phytochemical (Rabesa, 1982), molecular (Applequist & Wallace, 2000) and morphological (Rauh, 1998) data. Moreover, this is the only genus that exclusively presents shrub habit in the subfamily, and this may, in turn, represent the plesiomorphic condition in Didieroideae, since Portulacarioideae members are also shrubby or herbaceous, and *Calypstrotheca* is a woody shrub (Applequist & Wallace, 2000). Also, the flower of *A. marneriana* is bigger, showy and bisexual (Rowley, 1992), similar to that found in *Calypstrotheca*.

Alluaudia and *Didierea* are sisters, the most derived in our subfamily, and this clade is sister to Decaryia. These relationships were not solved in other phylogenetic analyses where the three genera were placed in a polytomy (Applequist & Wallace, 2000; Nyffeler & Eggli, 2010; Ocampo & Columbus, 2010). This close relationship between *Alluaudia* and *Didiereae* is also corroborated by habit (Rauh, 1998) and morphology (Rowley, 1992). Both genera present a very similar arborescent habit with columnar erect stem in advanced ages, and the morphology of the short-shoot is very similar with indeterminate number of spines, representing the most specialized condition in the family. These are also the most widespread genera in the family. Their representatives occur along almost all the semiarid southwest of Madagascar, while *Alluaudiopsis* and *Decaryia* are very restricted to some areas, e.g., *Decaryia* is very restricted to the southern and southeastern part of the island from Ampanihy to Tolanaro, and *Alluaudiopsis* occurs near Toliara (Rauh, 1998). *A. marneriana* was

considered extinct in its natural habitat (Rowley, 1992; Rauh 1998), but we registered the plant as growing to the north of Toliara, near Morombe.

Alluadia is the largest genus of Didieroideae. Rabesa (1982) divided *Alluadia* into two sections based on flavonoids and pollen characteristics: section *Alluadia* (*A. montagnacii*, *A. procera* and *A. ascendens*) and section *Androyella* (*A. humbertii*, *A. dumosa* and *A. comosa*). This division was corroborated by Applequist & Wallace (2000), reporting on molecular phylogeny, and also by the ploidy of species; all s. *Alluadia* representatives are $2n=240$ (Erbar & Leins, 2006). However, our analysis does not corroborate this division and indicates that *A. ascendens* is in s. *Androyella*. The species is similar to *A. humbertii* in morphology of the short-shoot, which first produces one spine and then a pair of leaves, although the stem of *A. humbertii* is thinner and more branched. The distribution of *A. ascendens* is also very similar to s. *Androyella* representatives, they are all restricted to the south of the island from Behara to Ampanihy. We agree that *A. ascendens* is morphologically similar to *A. procera* and *A. montagnacii* in growth form. Neither our sample from *A. ascendens* nor that of Applequist & Wallace (2000) was monophyletic in the respective analyses; however, their samples for *A. ascendens* and *A. montagnacii* and our sample for *A. montagnacii* combine to form a polytomy, indicating that the authors might misidentify the species. These two species are very similar in the juvenile stages in growth habit, branching pattern and leaf shape, making it very difficult to distinguish between them (Rauh, 1998). Based on these morphological similarities of *A. montagnacii* to *A. ascendens*, the similarities of *A. montagnacii* and *A. procera* inflorescences and the high chromosome number of the three species, Rowley (1992) proposed that *A. montagnacii* can be a hybrid of *A. ascendens* and *A. procera*.

3. Relationships within Portulacarioideae. – In our phylogenetic analysis, the genera *Ceraria* and *Portulacaria* were not found to be monophyletic. *P. armiana* and *P. afra* are separated by all *Ceraria* species as the most derived and most basal species in the subfamily, respectively. The paraphyly of *Portulacaria* and *Ceraria* is also corroborated by the nuclear DNA-ITS region (Hershkovitz & Zimmer, 1997). *P. armiana* is the most derived specie, together with *C. namaquensis*, and geographical distribution corroborates this relationship. Both species are endemic to Namaqualand in the south of Namibia (Van Jaarsveld, 1984; Harvey & Sonder, 1862). *C. longipedunculata*, which is sister to this clade, and *C. fruticulosa* also occur in the same region (Pearson & Stephens, 1912), indicating that the Gariiep Valley in Little Namaqualand in southern Namibia is the center of diversification for Portulacarioideae. The clade *P. armiana* + *C. namaquensis* + *C. longipedunculata* is sister to the clade *C. fruticulosa* + *C. pygmaea*. Although *C. pygmaea* has a broader distribution, it occurs from Namaqualand to the west coast of Cape Province in the RSA. *Ceraria carrissoana* is sister to the species cited above, and its distribution is more to the north in tropical Africa in southwest Angola (Exell & Mendonça, 1939). Finally, while *P. afra* is basal in the subfamily and its geographical occurrence corroborates this position, a large gap exists between the distribution of this and the other species, in the RSA from the East Cape and along the East Coast. Also, *C. fruticulosa* from Applequist & Wallace (2000) was not determined to be monophyletic with our sample for the same species. Their sample is sister to *C. namaquensis*.

Pearson & Stephens (1912) pointed out the differences between *Ceraria* and *Portulacaria*. According to these authors, *Ceraria* is dioecious and has a slightly flattened ovary and fruit which is at first 1-winged and later (nearly ripe, as seen only

in *C. fruticulosa*) fleshy and wingless; whereas the fruits of *Portulacaria* are 3-winged and dry. Although these characters are not consistent among all representatives, as *C. carrissoana* is a monoecious plant with bisexual flowers (table 1), it was described in the genus *Ceraria* by its great similarity to *C. fruticulosa* (Exell & Mendonça, 1939). *C. pygmaea* was first described by Pillans (1928) as *Portulacaria pygmaea*, although, according to Rowley (1996), H. Pillans transferred the species to *Ceraria* with no criterion specified for this transfer. Similarly, Harvey & Sonder (1862) described *C. namaquensis* as *Portulacaria namaquensis*, and Pearson & Stephens (1912) transferred it to *Ceraria* based on the differences pointed out above. As discussed before, dioecy is not a good criterion in Didiereaceae based on the abortive organs of the opposite sex present in the flower, in some bisexual flowers of *C. carrissoana*, abortive stamens are present, corroborating the hypothesis of monoecy being primitive in the family. Also, a similar characteristic among *P. afra*, *P. armiana*, and *C. pygmaea* is the absence of short-shoot in leaf axil and the node regions are marked by constriction. *C. carrissoana* presents an intermediary condition to this character whereby the axillary shoots are reduced, but the young leaves are elevated by the older leaf bases without internodes. The short-shoot is present in Didieroideae, indicating this character as plesiomorphic in the family. It is likely that the absence of short-shoot is a consequence of a reversion that occurred more than once independently on Portulacarioideae.

4. Taxonomic conclusions – Because of the phylogenetic results and the absence of determinant characters that might separate the genera *Portulacaria* and *Ceraria*, we included the five *Ceraria* Pearson & Stephens species in *Portulacaria* Jacq.. Morphologically, Portulacarioideae is well characterized. These plants are small to medium shrubs, woody at the base, with succulent flat to cylindrical leaves. The stem

might be differentiated into long and short shoots, and 4 prophylls are formed in the leaf axil. In the primary cortex, tannin deposits and mucilage ducts are present, as well as pericyclic sclereids. The species might be monoecious, with bisexual flowers, or dioecious, when vestigial organs of the opposite sex are present, with 2 sepals, 5 petals, stamens 4-10, ovary superior trilocular, one basal ovule, indehiscent fruit, pollen tricolpate.

Portulacaria pygmaea Pillans, The Journ. Of Bot. 66: 195. 1928 ≡ *Ceraria pygmaea* (Pillans) Rowley in Bradleya 14: 82. 1996.

Portulacaria namaquensis Sond., in Fl. Cap. ii: 386. 1862 ≡ *Ceraria namaquensis* (Sond.) Pear. & Steph. in Ann. S. Afri. Museum ix: 30. 1912.

Portulacaria fruticulosa (Pear. & Steph.) M. A. Oliveira-Neto & C. Klak **comb. nov.** ≡ *Ceraria fruticulosa* Pear. & Steph. in Ann. S. Afri. Museum ix: 30. 1912.

Portulacaria carrissoana (Exel. & Mend.) M. A. Oliveira-Neto & C. Klak **comb. nov.** ≡ *Ceraria carrissoana* Exell & Mendonça in Bol. Soc. Brot. ser. 2, 13: 307. 1939.

Portulacaria longipedunculata (Merxm. & Podlech) M. A. Oliveira-Neto & C. Klak **comb. nov.** ≡ *Ceraria longipedunculata* Merxm. & Podlech in Mitt. Bot. Staatssamml. München iv: 73. 1961.

REFERENCES

Applequist, W. L. & Wallace, R. S. 2000. Phylogeny of the Madagascan endemic family Didiereaceae. **Plant Systematic and Evolution** 221: 157-166.

- Applequist, W. L. & Wallace, R. S. 2001. Phylogeny of the Portulacaceous Cohort Based on ndhF Sequence Data. **Systematic Botany** **26**: 406 - 419.
- Applequist, W. L. & Wallace, R. S. 2003. Expanded circumscription of Didiereaceae and its division into tree subfamilies. **Adansonia series** **3, 25**: 13-16.
- Arakaki, M.; Cristin, P. A.; Nyffeler, R.; Lendel, A.; Eggli, U.; Ogburn, M. A.; Spriggs, E.; Moore, M. J. & Edwards, E. J. 2012. Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. **Proc. of National Academy of Science of U.S.A.** **108**: 8379 – 8384.
- Carolin, R. 1987. A Review of the Family Portulacaceae. **Australian Journal of Botany** **35**: 383 - 412.
- Crawley, S. S. & Hilu, K. W. 2012. Impact of missing data, gene choice, and taxon sampling on phylogenetic reconstruction: the Caryophyllales (Angiosperm). **Plant Syst. and Evolution** **298**: 297- 312.
- Cronquist, A. 1988. The Evolution and Classification of Flowering Plants. Second Edition. Bronx, NY: **The New York Botanical Garden**.
- Demesure B., Sodzi, N. & Petit, R. J. 1995. A Set of Universal Primers for Amplification of Polymorphic Non-Coding Regions of Mitochondrial and Chloroplast DNA in Plants. **Molecular Ecology** **4**: 129-131.
- Doyle, J. J. & Doyle J. S. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin** **19**: 11 – 15.
- Engel, T. & Barthlott, W. 1988. Micromorphology of epicuticular waxes in Centrosperm. **Plant Systematics and Evolution** **161**: 71-85.
- Erbar, C. & Leins, P. 2006. Floral ontogeny and systematic position of the Didiereaceae. **Plant Systematic and Evolution** **261**: 265–285.

- Exell A. W. & Mendonça F. A. 1939. Contribuições para o conhecimento da flora da África. **Boletim da Sociedade Broteriana 13**: 307-321.
- Farris, J. S., Albert, V. A., Källersjö, M., Lipscomb, D. & Kluge, A. G. 1996. Parsimony jack-knifing outperforms neighbor-joining. **Cladistics 12**: 99 -124.
- Fitch, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimal change for a specific tree topology. **Systematic Zoology 20**: 406 – 416.
- Hamilton, M. B. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. **Molecular Ecology 8**: 521–523.
- Harvey, W. H. & Sonders, O. W. 1862. **Flora Capensis vol. 2**: 385-386.
- Hershkovitz, M. A. 1989. Phylogenetic Studies in Centrospermae: A Brief Appraisal. **Taxon 38**: 602 – 608.
- 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 Cacti. **Taxon 46**: 217-232.
- Huelsenbeck, J. P. & Rannala, B. 2004. Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. **Systematic Biology 53**: 904 -913.
- Jordan, W. C., Courtney, M. W. & Neigel, J. E. 1996. Low levels of intraspecific genetic variation at a rapidly evolving chloroplast DNA locus in North American duckweeds (Lemnaceae). **American Journal of Botany 83**: 430–439.

- Kadereit, G., Mucina, L. & Freitag, H. 2006. Phylogeny of Salicornioideae (Chenopodiaceae): diversification, biogeography, and evolutionary trends in leaf and flower morphology. **Taxon** **55**: 617-642.
- Klak, C., Reeves, G. & Hedderson, T. A. J. 2004. Unmatched tempo of evolution in Southern African semi-desert ice plants. **Nature** **427**: 63-65.
- Kelchner, S. A., Clark, L. G., 1997. Molecular evolution and phylogenetic utility of the chloroplast rpl16 intron in *Chusquea* and the Bambusoideae (Poaceae). **Molecular Phylogeny Evolution** **8**: 385–397.
- Landrum, J. V. 2002. Four succulent families and 40 million years of evolution and adaptation to xeric environments: What can stem and leaf anatomical characters tell us about their phylogeny? **Taxon** **51**: 463-473.
- McCarthy, C. 1996-1997. Chromas, version 1.43. Brisbane, Australia: School of Biochemical molecular and Biomedical Science.
- McNeill, J. 1974. Synopsis of a Revised Classification of the Portulacaceae. **Taxon** **23**: 725 – 728.
- Nicholas, K. B. & Nicholas, H. B. Jr. 1997. GeneDoc, version 2.6.002: A tool for editing and annotating multiple sequences alignments. Distributed by the author. <http://www.nrbsc.org.gfx/genedoc/index.html>
- Nyanyano, B. L. 1986. Tribal and generic relationship and classification of the Portulacaceae (Centrospermae). Ph.D. dissertation, University of Reading.
- 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. & Egli, U. 2010. Disintegrating Portulacaceae: A new familial classification of the suborder Portulacineae (Caryophyllales) based on molecular and morphological data. **Taxon** **59**: 227 - 240.
- Ocampo, G. & Columbus, J. T. 2010. Molecular phylogenetics of suborder Cactineae (Caryophyllales), including insight into photosynthetic diversification and historical biogeography. **American Journal of Botany** **97**: 1827 -1847.
- 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.
- Oxelman, B., Lidén, M. & Berglund, D. 1997. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). **Plant Systematic and Evolution** **206**: 393–410.
- Pax, F. & Hoffmann, K. 1934. Portulacaceae. Pp. in: Engler, A. & Harms, H. (eds.), **Die natürlichen Pflanzenfamilien**, ed. 2, vol. 16c.: 234–262 Leipzig: Engelmann.
- Pearson, H. H. W. & Stephens, E. L. 1912. List of plants collected in the Percy Sladen Memorial expeditions. **Annals of S. Africa Museum** **ix**: 30 – 59.
- Pillans, H. 1928. *Novitates Africanae*. **The Journal of Botany** **66**: 195-202.
- Rabesa, Z. A. 1982. Definition of 2 Sections of the Genus *Alluaudia* Didieraceae. **Taxon** **31**: 736-737.
- Rauh, W. 1983. The morphology and systematic position of the Didiereaceae of Madagascar. **Bothalia** **14**: 839 – 843.
- Rauh, W. 1998. Succulent and Xerophytic Plants of Madagascar. **Strawberry Press**, Mill Valey, California, U.S.A.

- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed model. **Bioinformatics** **19**: 1572-1574.
- Rowley, G. D. 1992. Didiereaceae 'Cacti of the old world'. **The British Cactus and Succulent Society**, Kew, Richmond, England.
- Rowley, G. D. 1996. Taxonomic Innovations for the IOS Lexicon. **Bradleya** **14**: 82-83
- Shaw, J., Lickey, E. B., Beck, J. T., Farmer, S. B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K. C., Winder, C. T., Schilling, E. E., Small, R. L., 2005. The tortoise and the hare II, Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **American Journal of Botany** **92**: 142-166.
- Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E. & Small, R. L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. **American Journal of Botany** **94**: 275–288.
- Simmons, M. P., Ochoterena, H., 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. **Systematic Biology** **49**: 369–381.
- Swofford, D. L. 2000. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., 1991, Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology** **17**: 1105-1109.
- Van Jaarsveld, E. J. 1984. *Portulacaria armiana*: a new *Portulacaria* (Portulacaceae) from Southern Namibia. **Journal S. Africa Botany** **50**: 393- 399.

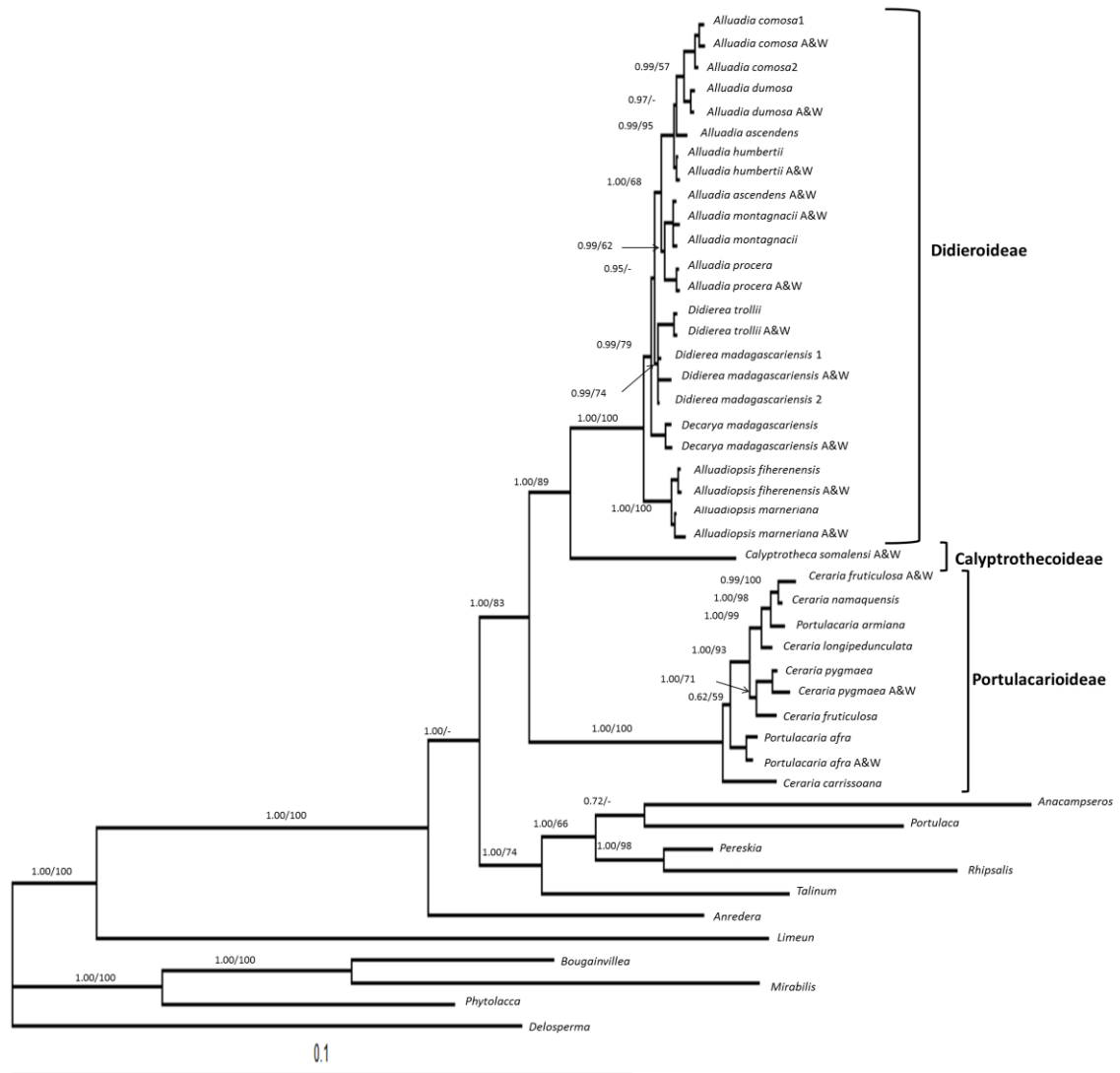


Fig. 1 - One of two trees from combined analyses of seven chloroplast sequences, shown as a phylogram. Numbers above or below the branches are posterior probability ($PP \geq 0.50$)/Jackknife percentages ($JK \geq 50$), respectively. Brackets indicate the three subfamilies of Didiereaceae.

Subfamily	Species	Occurrence	Oily	Carpels	Stamens	Petals	Bracts	Ovules	Fruit type	Seed
Didierioideae	<i>Didierea madagascariensis</i> Baill.	SW Madagascar	di (g)	3 (g)	8 (i)	4 (g)	2 (g)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)
	<i>Didierea trollii</i> Capuron & Rauh	SW Madagascar	di (g)	3 (g)	8 (g)	4 (g)	2 (g)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)
	<i>Alluaudia ascendens</i> Drake	SW Madagascar	di (g)	3 (g)	10-19 (i)	4 (g)	2 (g)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)
	<i>Alluaudia comosa</i> Drake	SW Madagascar	di (g)	3 (g)	8 (i)	4 (g)	2 (g)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)
	<i>Alluaudia dumosa</i> Drake	SW Madagascar	di (g)	3 (g)	10-19 (i)	4 (g)	2 (g)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)
	<i>Alluaudia humbertii</i> Choux	SW Madagascar	di (g)	3 (g)	(8)-10-(12) (i)	4 (g)	2 (g)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)
	<i>Alluaudia montagnacii</i> Rauh	SW Madagascar	di (g)	3 (g)	8-19-(i)	4 (g)	2 (g)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)
	<i>Alluaudia procera</i> Drake	SW Madagascar	di (g)	3 (g)	8 (i)	4 (g)	2 (g)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)
	<i>Decarya madagascariensis</i> Choux	SW Madagascar	di (g)	3 (g)	8 (i)	4 (g)	2 (g)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)
	<i>Alluaudiopsis fihrenensis</i> Humbert & Choux	SW Madagascar	di (g)	3 (g)	(7)-8-(9) (i)	4 (g)	2 (g)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)
Calyptrothecoideae	<i>Alluaudiopsis marnieriana</i> Rauh	SW Madagascar	di (g)	3 (g)	(9)-10 (g)	4 (g)	2 (g)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)
	<i>Calyptrotheca somaliensis</i> Glig	N Kenya/ S Somalia/ N Ethiopia	mono (a)	3 (h)	up to 60 (h)	5 (a)	2 (a)	6 (h)	indehiscente (a)	1 (a)
	<i>Ceraria carissoana</i> Exell & Mendonça	SW Angola	mono (a)	3 (f)	5 (f)	5 (f)	2 (f)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)
	<i>Ceraria fruticulosa</i> Pearson & Stephens	S Namibia to S. Africa Cape	di (a)	3 (e)	5 (e)	5 (e)	2 (a)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)
	<i>Ceraria longipedunculata</i> Merxm. & Podlech	SW Angola to NW Namibia	di (a)	*	*	*	2 (a)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)
	<i>Ceraria namaquensis</i> Pearson & Stephens	SW Angola to NW Namibia	di (a)	3 (c)	5-7 (c)	5 (c)	2 (c)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)
	<i>Ceraria pygmaea</i> (Pillans) G.D.Rowley	SW Namibia to NW S. Africa Cape	*	*	*	5 (a)	2 (a)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)
	<i>Portulacaria afra</i> Jacq.	South Africa from Cape to E Coast	mono (a)	3 (c)	5-7 (c)	5 (c)	2 (c)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)
	<i>Portulacaria armiana</i> van Jaarsv.	SW Namibia	*	*	*	5 (d)	2 (d)	1 (h)	dehiscente (a)	1 (a)

Table 1 - Circumscription of the Didieraceae and its division of three subfamilies. With region of occurrence and reproductive characteristics. Small letters between brackets corresponds to reference for the data. (a) Applequist & Wallace, 2003; (b) Applequist & Wallace, 2000; (c) Harvey & Sonder, 1862; (d) Van Jaarsveld, 1984; (e) Pearson & Stephens, 1912; (f) Exell & Mendonça, 1939; (g) Erbar & Leins, 2006; (h) Nyffeler & Egli, 2010; (i) Rowley, 1992; (*) no data available in literature.

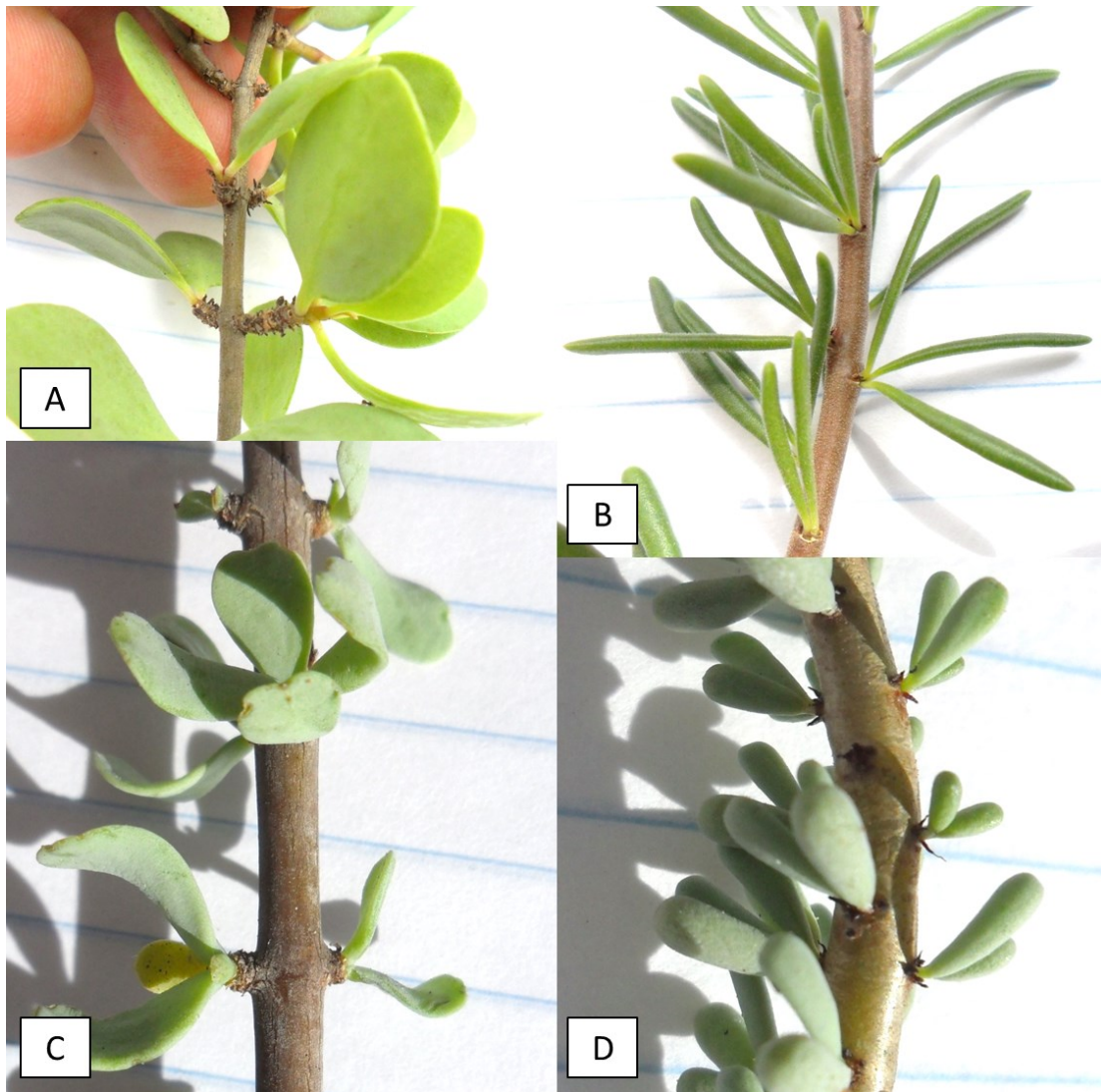


Fig. 2 - Morphology of the brachyblast in representatives of the Portulacarioideae. A – *Ceraria carrissoana*; B – *Ceraria longipedunculata*; C - *Ceraria fruticulosa*; D – *Ceraria namaquensis*.

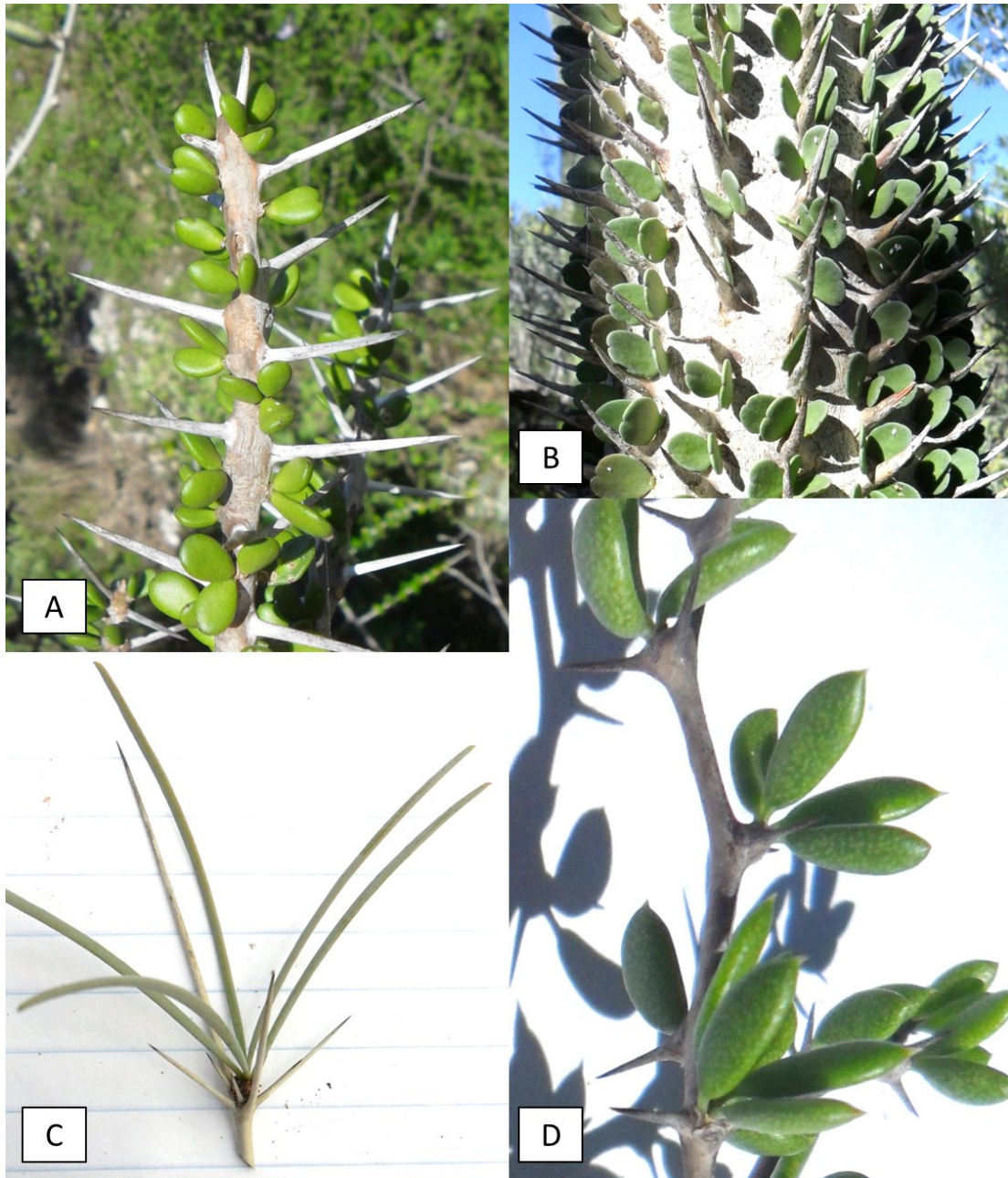


Fig. 3 - Morphology of the brachyblast in representatives of the Didieroideae. A – *Alluaudia comosa*; B - *Alluaudia montagnacii*; C – *Didierea madagascariensis*; D – *Alluaudiopsis marnieriana*.

CAPÍTULO 2

ONTOGÊNESE FOLIAR E DA REGIÃO AXILAR EM
PORTULACARIOIDEAE E DIDIEROIDEAE: A HISTÓRIA DE UM
CARÁTER E SUAS IMPLICAÇÕES DENTRO DE PORTULACINEAE.

ONTOGÊNESE DA FOLHA E DA REGIÃO AXILAR EM PORTULACARIOIDEAE E DIDIEROIDEAE: A HISTÓRIA DE UM CARÁTER E SUAS IMPLICAÇÕES DENTRO DE PORTULACINEAE.

Mario Oliveira-Neto¹ & Gladys Flavia Melo-de-Pinna¹

1. Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, Laboratório de Anatomia Vegetal, Rua do Matão, Travessa 14, nº 277, Cidade Universitária, CEP 05508-090, São Paulo - SP, Brasil

Resumo: A primeira relação filogenética proposta para Didiereaceae *s.s.* dentro de Portulacineae foi como grupo-irmão de Cactaceae. Tal proposta era baseada na homologia entre o braquiblasto de Didiereaceae *s.s.* e a aréola de Cactaceae. Contudo, análises filogenéticas, baseadas em dados moleculares, indicaram que tanto Didiereaceae *s.s.* quanto Cactaceae, são relacionados à gêneros pertencentes à Portulacaceae *s.l.* Com a inclusão dos gêneros *Ceraria*, *Portulacaria* e *Calyptrotheca* em Didiereaceae, a família se tornou mais heterogênea, surgindo assim, a necessidade da investigação de características para o estabelecimento de sinapomorfias ou corroborar suas relações dentro de Portulacineae. Diante disso, o presente trabalho investigou a ontogênese foliar e da região de sua axila para as subfamílias Didieroideae e Portulacarioideae (Didiereaceae). Como resultados, foi caracterizado o desenvolvimento dos padrões de variação morfológica da folha e das folhas modificadas em espinhos e profilos. A partir dos resultados e de uma proposta de filogenia molecular para Didiereaceae, foi feita uma análise de reconstrução da região da axila foliar para o ancestral da família, que indicou a presença de braquiblastos portadores de profilos na axila foliar do ancestral comum. Como consequência, foram estabelecidas homologias entre esses profilos e os profilos de Talinaceae e espinhos de Cactaceae.

Abstract: The first phylogenetic relation proposed to Didiereaceae *s.s.* in Portulacineae was as sister-group to Cactaceae. This proposal was based on the homology between Didiereaceae *s.s.* brachyblast and Cactaceae areola. However, phylogenetic analysis, based on molecular data, indicated that either Didiereaceae *s.s.*, either Cactaceae are related to former Portulacaceae *s.l.* genera. With the inclusion of the genera *Ceraria*, *Portulacaria* and *Calyptrotheca* in Didiereaceae, the family became rather heterogenic, resulting in the need to investigate characteristics to the establishment of synapomorphies to the family or corroborate its relations inside Portulacineae. Therefore, the present work investigated the ontogenesis of leaf and its axil region to the subfamilies Didieroideae and Portulacarioideae (Didiereaceae). As results, we characterized the development of leaf morphological patterns and modified leaves in prophylls and spines. Combining the ontogenetical results with a molecular phylogeny for Didiereaceae, was made an analyses of reconstruction to the leaf axil region for the ancestor of the family, indicating the presence of brachyblasts bearing prophylls in the leaf axil of common ancestor. Consequently, homologies were established between these prophylls and Talinaceae prophylls and Cactaceae spines.

Palavras chave: Didiereaceae, ontogênese foliar, profilos, espinhos, braquiblasto

INTRODUÇÃO

Os gêneros de Didiereaceae *s.s.*, *Alluaudia*, *Alluaudiopsis*, *Decaryia* e *Didierea*, (*i.e.* Didieroideae) são conhecidos entre especialistas e colecionadores de plantas suculentas devido ao seu risco de extinção (Rauh, 1998), e principalmente pelas suas notáveis adaptações ao ambiente xérico, tais como: células armazenadoras de água nos ramos jovens; queda de folhas jovens durante a estação seca; arquitetura não usual do caule, diferenciado em ramos longos (auxiblastos) e ramos reduzidos (braquiblastos); e a formação de espinhos (Rowley, 1992; Rauh, 1998).

Os braquiblastos de Didiereaceae *s.s.* se formam nas axilas de folhas decíduas do eixo primário, esses ramos reduzidos encontram-se inseridos no córtex do caule primário, exceto em *Didiereae* onde esses são elevados por podários (“podarium”) em suas bases. Eles produzem primeiramente espinhos (folhas modificadas) de maneira proléptica, em números e posições diferentes nos diferentes gêneros. Os braquiblastos também produzem folhas assimilatórias comuns, em seguida aos espinhos, quase sempre em pares. As folhas assimilatórias caem no início da estação seca, contudo os mesmos braquiblastos podem produzir novas folhas na próxima estação, os espinhos são perenes e produzidos somente no início da formação do braquiblasto (Rauh, 1983).

Os braquiblasto de Didiereaceae *s.s.* apresentam similaridades com a aréola de Cactaceae: (i) ambos são ramos reduzidos imersos no córtex, (ii) produzem folhas modificadas em espinhos, (iii) as inflorescências em Cactaceae e Didiereaceae *s.s.* descendem dos ramos reduzidos e (iv) e ambos podem se desenvolver em ramos longos (Rauh, 1983). Devido a essas características, Rauh (1983) considerou os braquiblastos de Didiereaceae *s.s.* homólogos à aréola de Cactaceae.

Devido as semelhanças compartilhadas entre Didiereaceae *s.s.* e Cactaceae, sendo elas: de caráter morfológico, homologia entre aréola e braquiblasto; anatômico, presença de drusas e idioblastos mucilaginosos no córtex primário; e fisiológico, possibilidade de enxerto de *Didierea* em *Pereskia* (Rauh, 1983), por muito tempo acreditou-se que o posicionamento de Didiereaceae *s.s.* dentro de Caryophyllales fosse como grupo irmão de Cactaceae (Rauh, 1983). Inclusive, Didiereaceae *s.s.* foi denominada por alguns pesquisadores como “Cactos do velho mundo” (Rauh, 1998; Rowley, 1992).

Contudo, estudos filogenéticos baseados em dados morfo-anatômicos para Portulacineae indicaram correlação entre Didiereaceae *s.s.* e os gêneros *Portulacaria*, *Ceraria* e *Calyptrorhiza* (Carolin, 1987; Hershkovitz, 1993). Sendo essa correlação entre Didiereaceae *s.s.* e os três gêneros tradicionalmente pertencentes à Portulacaceae *s.l.* corroborada e fortemente sustentada por dados moleculares (Applequist & Wallace, 2001; Nyffeler, 2007; Nyffeler & Eggli, 2010; Ocampo & Columbus, 2010). Baseados nesses dados, Applequist & Wallace (2003) expandiram a circunscrição de Didiereaceae incluindo os três gêneros na família. Os mesmos trabalhos indicaram que Cactaceae também forma um clado, altamente sustentado pelos dados moleculares, com gêneros tradicionalmente pertencentes à Portulacaceae *s.l.*, denominado de clado ACPT (Nyffeler, 2007). Contudo, nesse caso os gêneros não foram incluídos em Cactaceae, mas organizados em novas famílias, sendo elas: Talinaceae (*Talinum*, *Talinella*, *Amphipetalum*), Anacampserotaceae (*Anacampseros*, *Grahamia*, *Talinopsis*) e Portulacaceae *s.s.* (sendo *Portulaca* o único gênero mantido na família) (Nyffeler & Eggli, 2010).

Com a inclusão dos três gêneros antes pertencentes à Portulacaceae em Didiereaceae, a família passou a ser heterogênea quanto ao hábito, à morfologia e biogeografia dos seus representantes, sendo assim dividida em três subfamílias de acordo com essas características: Didieroideae (*Alluaudia*, *Alluaudiopsis*, *Decaryia* e *Didierea*), Calyptrothecoideae (*Calyptrotheca*) e Portulacarioideae (*Portulacaria* e *Ceraria*; as espécies de *Ceraria* foram transferidas para *Portulacaria*, capítulo 1) (Applequist & Wallace, 2003). Apesar dos representantes de Portulacarioideae e Calyptrothecoideae não apresentarem tantas adaptações morfológicas ao ambiente xérico como Didieroideae, as subfamílias apresentam algumas características anatômicas e morfológicas em comum (Nyffeler & Egli, 2010). Portulacarioideae e Didieroideae apresentam ductos de mucilagem no córtex e na medula; depósitos de tanino nas regiões mais antigas do caule; estômatos paralelocíticos; esclerênquima no córtex jovem; folhas decíduas e ramos reduzidos nas axilas das folhas primárias (Nyffeler, 2007; Ogburn & Edwards, 2009; Nyffeler & Egli, 2010). Entretanto, essas características também são compartilhadas por outros membros de Portulacineae, tornando difícil o estabelecimento de sinapomorfias para a família (Ogburn & Edwards, 2009; Nyffeler & Egli, 2010).

De acordo com Nyffeler & Egli (2010), a presença de tricomas e cerdas formados na axila foliar de *Anacampseros* e *Portulaca*, assim como a presença de profilos formados na axila foliar de *Talinum*, podem representar remanescentes de um ramo reduzido presente na axila foliar do ancestral comum de ACPT e assim homólogo à aréola de Cactaceae. Além disso, o estudo de características morfológicas e anatômicas nos grupos relacionados à Cactaceae pode levar ao entendimento da evolução da forma de vida dos cactos (Nyffeler, 2007). Apesar dos representantes de Portulacarioideae não formarem espinhos, esses também

apresentam braquiblastos na axila de folhas primárias e nós observamos, em análises prévias, a presença de perfis formados nesses braquiblastos. Sendo assim, da mesma forma que sugerido para ACPT, o estudo dessas características pode levar ao entendimento da evolução das adaptações ao ambiente xérico em Didiereaceae.

Apesar da nova classificação de famílias para Portulacineae ser altamente sustentada pelos dados moleculares, as relações internas na subordem ainda são controversas (Applequist & Wallace, 2001; Nyffeler, 2007; Nyffeler & Eggli, 2010; Ocampo & Columbus, 2010.). Em adição, a ausência de estudos morfológicos e anatômicos mais detalhados para Portulacineae não permite que os dados moleculares sejam corroborados, além de dificultar o estabelecimento de sinapomorfias para as novas classificações (Hershkovitz, 1993; Applequist & Wallace, 2001).

Sendo assim os objetivos deste trabalho são: (i) investigar a evolução da região da axila foliar dentro de Didiereaceae e (ii) a partir dos resultados obtidos, estabelecer possíveis homologias com os outros representantes de Portulacineae. Para isto, foram descritas a ontogênese da folha e da região axilar e, a partir dos resultados obtidos e da filogenia obtida no capítulo 1, reconstruído o caráter ancestral da região da axila foliar em Didiereaceae.

MATERIAIS E MÉTODOS

Análises Anatômicas. – Folhas e braquiblastos foram caracterizados morfológicamente para todas as 18 espécies de Didieroideae e Portulacarioideae (Tabela 1). As análises foram feitas baseadas em observações de material em campo e material fixado. As espécies antes pertencentes à *Ceraria* são aqui tratadas como

pertencentes à *Portulacaria* de acordo com Oliveira-Neto *et al.* (capítulo 1), *i.e.*, *P. carrissoana*, *P. fruticulosa*, *P. longipedunculata*, *P. namaquensis* e *P. pygmaea*.

Análises anatômicas e ontogenéticas foram realizadas para as folhas e braquiblastos e seus produtos (espinhos e perfilos) de 7 espécies de Didierioideae e 7 espécies de Portulacarioideae, incluindo representantes de todos os gêneros.

Para as análises anatômicas, amostras de ramos jovens foram coletadas e fixadas em FAA (formalina/ácido acético/álcool 50%) por 48h e conservadas em etanol 70%. As amostras foram desidratadas em série de etanol/t-butanol e embebidas em parafina (Ruzin, 1999). Secções foram realizadas utilizando micrótomo rotativo Reichertt-Jung AutoCut 2040, coradas com azul de astra 1% em etanol 50% e safranina 1% em etanol 50% (Kraus *et al.* 1998, modificado), e montadas em lâminas permanentes com bálsamo do Canadá. O registro fotográfico foi feito utilizando software Leica IM50 acoplado a microscópio Leica DMLB.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). – Para as análises em microscópio eletrônico de varredura o material foi desidratado em série etanólica crescente (50-100% EtOH) e submetido a ponto crítico com a utilização de gás carbônico (CPD 030, Balzer). As amostras desidratadas foram montadas em suportes metálicos (“stubs”) para serem metalizadas com ouro (Silveira, 1989). Os registros foram feitos utilizando microscópio Zeiss DSM 940.

Reconstrução do Caráter Ancestral. – Os dados para reconstrução do caráter ancestral estão na tabela 1, para os representantes do grupo externo os dados foram baseados na bibliografia (Gibson & Nobel, 1986; Ogburn & Edwards, 2009). As análises foram feitas utilizando o programa Mesquite ver. 2.75 (Maddison & Maddison, 2011), e estimados pelos métodos de máxima verossimilhança (MV;

Markov k -state 1 parameter model, que corresponde ao modelo Mk de Lewis [2001]) e de máxima parcimônia (MP), sobre uma árvore baseada na topologia de Oliveira-Neto *et al.* (capítulo 1).

RESULTADOS

Os principais caracteres morfo-anatômicos estão resumidos na tabela 1.

1. Tanino – Células parenquimáticas com acúmulo de tanino foram observadas em todas as espécies analisadas. Essas células podem ocorrer no córtex, medula, e no xilema do caule e da folha, podendo variar em quantidade e disposição dependendo da espécie. Sendo observadas nesses tecidos nas seguintes disposições: células isoladas (idioblastos); arranjo de células contínuas formando uma faixa no córtex (Fig. 1A) ou constituindo a maior parte dos tecidos fundamentais (Fig. 1B). Os depósitos de tanino são formados precocemente e podem ser observados em grande quantidade no caule primário (Fig. 1A-B) e nas folhas jovens, em alguns casos células contendo tanino foram observadas já nos primórdios foliares.

2. Cavidades de mucilagem – A presença de cavidades contendo mucilagem é outra característica constante, sendo observada em todas as espécies analisadas. As cavidades de mucilagem foram observadas no mesofilo ou no córtex do caule e braquiblasto (Fig. 1C – 1D). Essas cavidades são iniciadas por um processo esquizógeno, onde um pequeno grupo de células começa a secretar mucilagem nos espaços intercelulares (Fig. 1C). Contudo, o aumento em diâmetro das cavidades de mucilagem ocorre por processo lisígeno, por meio do rompimento da membrana das células adjacentes a cavidade (Fig. 1D). Longitudinalmente, o comprimento das cavidades pode variar de poucas camadas de células a toda extensão de um braquiblasto ou ramo (Fig. 1E). Em Portulacarioideae a quantidade e o tamanho das

cavidades de mucilagem podem variar de poucas e pequenas cavidades, como em *P. pygmaea*, a muitas e grandes cavidades, como em *P. afra*. Em Didierioideae, cavidades de mucilagem comumente ocorrem em regiões do córtex do braquiblasto entre o traço dos espinhos e o sistema vascular do braquiblasto (região da gema axilar do espinho), podendo envolver e consumir toda a região da gema (Fig. 1D).

3. Drusas – Em todas as espécies analisadas foram observados idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio (drusas) (Fig. 1F). Esses idioblastos foram observados no córtex, medula, epiderme e protoderme do caule e no mesofilo e na epiderme da folha.

4. Constrição na base da folha – Todas as espécies analisadas apresentaram uma constrição muito desenvolvida delimitando a região da lâmina e pecíolo e a região da base foliar constitutiva (Fig. 2A-C). Além da presença de constrição, a base da folha é expandida em quase toda a sua extensão, protegendo assim a gema axilar e seus produtos (Fig. 2D), exceto em *P. longipedunculata* e *P. namaquensis*.

5. Periderme – Nas espécies analisadas, exceto em *P. fruticulosa*, a formação da periderme é precoce se iniciando na região dos primeiros nós dos ramos jovens. A instalação do felogênio ocorre na epiderme (Fig. 3A). O felema consiste de células mortas e suberificadas (Fig. 3B).

6. Epiderme do caule e da folha – A epiderme é umas das estruturas mais variáveis dentro da família. Na maioria das espécies analisadas (*A. fiherenensis*, *A. comosa*, *P. carissoana*, *P. namaquensis*, *P. pygmaea*, *P. afra* e *P. armiana*) a epiderme da folha varia em sua extensão de uma a duas camadas de células de maneira aleatória (Fig. 3C). No caule a epiderme é sempre unisseriada.

Em Portulacarioideae foi observada a presença de mucilagem na epiderme da folha (Fig. 3D), ocorrendo nos indivíduos de *P. namaquensis*, *P. longipedunculata*, *P. carrissoana* e *P. armiana*. Além disso, foram observadas células papilosas e tricomas nas epidermes da folha e do caule (Fig. 3E-F) de *P. namaquensis* e *P. longipedunculata*. Os tricomas podem apresentar de duas a cinco células e variar de uma a duas células em sua base.

Em Didierioideae não foram observadas células epidérmicas mucilaginosas ou papilosas. Contudo, uma característica comum observada na subfamília é a presença de drusas na epiderme da folha. Em *A. comosa*, por exemplo, todas as células da epiderme da folha apresentam drusas, exceto pelas células estomáticas (Fig. 4A).

7. Ontogênese foliar - Portulacarioideae: As folhas em Portulacarioideae são suculentas e reduzidas, podendo variar de 0,5cm a 5cm, dependendo da espécie (exceto para *P. armiana* onde as folhas podem atingir mais de 10cm em comprimento). A morfologia da folha pode variar em cilíndrica a subcilíndrica (*P. namaquensis* e *P. pygmaea*), subcilíndrica (*P. longipedunculata*) e plana (*P. afra*, *P. armiana*, *P. carrissoana* e *P. fruticulosa*).

Os primórdios foliares apresentam inicialmente formato piramidal, com a base mais larga e ápice mais afilado (Fig. 4B), apresentando em secção transversal da região mediana formato trapezoidal (Fig. 4C). Na primeira etapa do desenvolvimento do primórdio, ocorre a diferenciação de uma protoderme bem delimitada e a instalação de um cordão procambial na região central do primórdio. Em seguida, as células da região abaxial se diferenciam, estruturalmente, apresentando células com grandes vacúolos e um lúmen maior em relação às células da região adaxial, que mantem o citoplasma mais denso, conferindo a identidade

dorsiventral ao primórdio (Fig. 4C). Na etapa seguinte, ocorre a instalação da blastozona marginal, que dará origem à lâmina foliar, nas laterais do primórdio (Fig. 4C – 4D). A atividade mitótica nessa região faz com que o primórdio apresente um formato mais plano, causado pelo alongado em suas extremidades (Fig. 4D-4E). A diferenciação no primórdio é basípeta, apresentando células vacuoladas e de maior volume no ápice, podendo ocorrer a formação de depósitos de tanino (Fig. 4E). Finalmente, ocorre a diferenciação e expansão das células da blastozona marginal em células alongadas no sentido dorsiventral, originando a lâmina foliar (Fig. 4F). As células da região da nervura central apresentam formato isodiamétrico, definido no primórdio foliar durante a diferenciação das células da região abaxial (Fig. 4D e 4F).

A blastozona marginal tem origem mista, sendo originada por divisões periclinais de células das regiões abaxiais e adaxiais (Fig. 4D e 5A). Em folhas jovens na região abaxial próxima a base, é possível observar células de lúmen grande, diferenciadas como idioblastos com tanino e canais de mucilagem, originadas no domínio abaxial do primórdio, e poucas células seriadas, de origem do domínio adaxial (Fig. 5B).

A ontogênese das folhas de morfologia cilíndrica e subcilíndrica é bem semelhante, com a diferenciação da protoderme, do procâmbio e das células da região abaxial do primórdio (Fig. 5C). Em seguida, também ocorre a formação de uma blastozona marginal de origem mista (Fig. 5C). Contudo, a atividade da blastozona marginal ocorre por um período de tempo reduzido e o mesmo padrão de expansão e diferenciação é observado em todas as regiões do sistema fundamental do primórdio, originando um mesofilo homogêneo e radiado (Fig. 5D – 5E).

Nas folhas de morfologia plana, o mesofilo formado é dorsiventral apresentando células parenquimáticas alongadas, constituindo um parênquima paliçádico (Fig. 4F). Já nas folhas de morfologias cilíndrica e subcilíndrica, o mesofilo pode ser radiado e as células parenquimáticas mais periféricas podem ser alongadas, constituindo um parênquima paliçádico, e as centrais isodiamétricas (Fig. 5D), ou toda a região do mesofilo ser constituída por células isodiamétricas, com paredes finas, caracterizando o parênquima aquífero (Fig. 5E). Pode ocorrer também a formação de cavidades de mucilagem e depósitos de tanino, sendo mais observados nas regiões subepidérmicas (Fig. 4F e 5D).

O sistema vascular nos três tipos de folha é bem semelhante, sendo composto por feixes vasculares colaterais, apresentando xilema para o lado adaxial e floema para o lado abaxial, sendo três feixes de maior calibre na região da nervura central e feixes vasculares de menor calibre compondo as nervuras secundárias (Fig. 4F, 5D e 5E).

Na região da base das folhas foi possível observar a presença de periderme, formada a partir do felogênio instalado no domínio abaxial (Fig. 5F).

Didieroideae: As folhas dessa subfamília também são suculentas e reduzidas, podendo variar em menores do que 5mm, em *A. dumosa*, a 10cm de comprimento, em *D. madagascariensis* e *A. fiherenensis*. A morfologia da folha pode variar em plana (*A. procera*, *A. humbertii*, *A. ascendens*, *A. montagnacii* e *De. madagascariensis*), subcilíndrica (*Di. madagascariensis*, *D. trollii*, *A. comosa*, *A. dumosa* e *A. marneriana*) e subcilíndrica a cilíndrica (*A. fiherenensis*).

A ontogênese da folha é bem similar ao que ocorre em Portulacarioideae, inicialmente ocorre a diferenciação da protoderme e do cordão procambial (Fig. 6A).

Contudo, diferente de *Portulacarioideae*, as células da região adaxial se diferenciam primeiro (Fig. 6A – 6B). A região abaxial também é predominante e se estende pela maior parte do primórdio, conferindo formato trapezoidal em secção transversal (Fig. 6A – 6C). A blastozona marginal que origina a lâmina foliar também é de origem mista (Fig. 6C) e a folha cresce em tamanho pela expansão e diferenciação de suas células (Fig. 6D).

A diferenciação e expansão das células do primórdio foliar podem originar diferentes morfologias da folha, sendo elas: plana, apresentando um mesofilo dorsiventral e células alongadas formando um parênquima paliçádico (Fig. 6D); subcilíndrica, com mesofilo radiado formado por células alongadas e isodiamétricas (Fig. 6E); cilíndrica com mesofilo homogêneo e radiado formado por células isodiamétricas (Fig. 6F). O sistema vascular é formado por feixes vasculares colaterais, sendo três feixes formando a nervura central e poucos feixes de menor calibre formando as nervuras secundárias (Fig. 6D – 6F). Como ocorre nas folhas de *Portulacarioideae*, a periderme está presente na base da folha, formada a partir do felogênio instalado no domínio abaxial.

8. Perfis – Em todas as espécies de *Portulacarioideae* foram observadas estruturas filiformes de tamanho reduzido, produzidas a partir da gema, perfis (Fig. 7A). Os perfis são as primeiras estruturas foliares originadas em pares, sendo em geral formados dois pares em cada gema axilar (Fig. 7B – D). Os primórdios de perfil podem variar de planos a piramidais (Fig. 7B) e em secção transversal o formato varia de elíptico a triangular, indicando a identidade dorsiventral já estabelecida (Fig. 7C–7D). No início do desenvolvimento a protoderme se estabelece, contudo, os primórdios de perfil não apresentam cordão procambial ou formação de blastozona

marginal (Fig. 7C–7D). As células do interior do primórdio do perfil se diferenciam com a formação de depósitos de tanino e células suberificadas, alternando com faixas de células não suberificadas (Fig. 4E, 7E e 7F). O desenvolvimento inicial dos perfis é apical, porém, sua diferenciação é basípeta e os perfis crescem em comprimento por meio da atividade de uma região meristemática em sua base (Fig. 4E e 7E). Essa região pode apresentar atividade por um maior período, formando perfis longos, como em *P. longipedunculata* (Fig. 7E), ou as células dessa logo se diferenciam, produzindo perfis mais curtos, como em *P. fruticulosa* (Fig. 7F).

9. Espinhos – Em todas as espécies de Didieroideae são formados espinhos a partir da gema na axila das folhas primárias (Fig. 8A). Os espinhos podem variar em comprimento, apresentando de 10cm, como em *Di. madagascarienses*, a poucos milímetros, como em *A. dumosa*. Apesar de variarem em tamanho, a anatomia e ontogênese dos espinhos apresenta o mesmo padrão em todas as Didieroideae.

Os espinhos são as primeiras estruturas formadas nos flancos da gema axilar. Eles apresentam crescimento inicial apical e o primórdio de espinho apresenta formato completamente cônico, sem identidade dorsiventral (Fig. 8B). A diferenciação é basípeta e logo no início do desenvolvimento as células apicais se diferenciam. No início do desenvolvimento se forma a protoderme e ocorre a instalação de cordões procambiais no centro do primórdio de espinho (Fig. 8C). Após a formação dos cordões procambiais, ocorre a formação de uma faixa de células com tanino no sistema fundamental circundando toda a região procambial (Fig. 8C-D). Diferente das folhas cilíndricas, não ocorre a formação das blastozonas marginais e o crescimento do espinho em comprimento se dá por diferenciação e expansão celular.

Na região entre o corpo do espinho e sua base há uma constrição, semelhante ao observado nas folhas (Fig. 8E). As células da base de cada espinho, na região abaixo da constrição, se expandem formando um tecido único (Fig. 8F). Durante a diferenciação do cordão procambial em células condutoras de xilema e floema, a faixa de células contendo tanino começa a lignificar formando um cordão de fibras ao redor do sistema vascular por toda a extensão do corpo do espinho (Fig. 9A-D).

A organização do sistema vascular do espinho é semelhante a um eustelo, com os feixes vasculares apresentando floema direcionado para o exterior do espinho e xilema para o centro (Fig. 9C-D). O estágio final do desenvolvimento do espinho consiste na formação de uma periderme interna à faixa de fibras, ao longo de toda a extensão do corpo do espinho (Fig. 9B e 9D).

Os espinhos apresentam uma gema na região axilar, cuja conexão vascular pode ser observada conforme acompanhamos os traços do espinho e da gema em direção à base do braquiblasto (Fig. 9E-F). Contudo, durante o desenvolvimento do braquiblasto, cavidades de mucilagem se formam na região da axila do espinho e a gema não pode mais ser observada em estágios mais avançados do desenvolvimento (Fig. 1D).

10. Braquiblasto - Portulacarioideae: Algumas espécies da subfamília apresentam um ramo condensado, pela ausência de entre-nós, na região da axila das folhas primárias, caracterizando-os como braquiblastos. O grau de condensamento do ramo pode variar de acordo com a espécie.

Em *P. longipedunculata* e *P. namaquensis* os entre-nós são ausentes e a base das folhas não é expandida, resultando em um braquiblasto que fica imerso no córtex do eixo primário (Fig. 10A). A gema axilar primeiro produz 4 perfis e na sequência

inicia a formação de pares de folhas decíduas (Fig. 10B). Nesse grupo, a não expansão da base das folhas faz com que o meristema apical do braquiblasto não se eleve. As folhas caem e novas folhas se formam na próxima estação, contudo, os perfis são perenes. Os perfis formados na axila das folhas do braquiblasto são ainda mais reduzidos em relação aos perfis formados na base do braquiblasto.

Em *P. carissoana* e *P. fruticulosa* a condição do ramo reduzido é intermediária. Os entre-nós também são ausentes, contudo, as folhas produzidas no ramo reduzido apresentam a base expandida, elevando o meristema apical do braquiblasto (Fig. 10C-D). As folhas do braquiblasto são decíduas, e os perfis formados na axila dessas folhas são tão desenvolvidos quanto os formados na axila das folhas primárias. Em *P. carissoana*, após a produção de um determinado número de folhas, os entre-nós podem se desenvolver como no eixo primário.

Portulacaria afra, *P. armiana* e *P. pygmaea* não formam braquiblastos na axila de suas folhas, nesses grupos foi observada constrição demarcando a região dos nós nos ramos laterais (Fig. 10E).

Didieroideae: Todos os representantes da subfamília apresentam um braquiblasto formado na axila das folhas primárias. Os braquiblastos portam espinhos em sua base e folhas em seu ápice, variando em número nas diferentes espécies (Fig. 11A-B). As folhas caem no início da estação seca e novas folhas são produzidas no início da próxima estação chuvosa, entretanto, os espinhos são perenes, sendo produzidos apenas no início da ontogênese do braquiblasto.

As bases dos espinhos se expandem e se fundem, formando um tecido parenquimático que envolve a região do meristema apical do braquiblasto (Fig. 11C).

A expansão das bases fundidas do espinho mantém o meristema apical imerso em uma cavidade (Fig. 11C–11F).

Os novos espinhos formados, assim como os primórdios foliares, iniciam sua ontogênese no interior da cavidade e conforme ocorre a expansão de suas bases esses vão sendo expostos para o exterior, terminando o processo de desenvolvimento no lado de fora da cavidade (Fig. 11C).

11. Reconstrução do Caráter Ancestral – Todas as análises de reconstrução do caráter ancestral para os caracteres com apenas um estado observado para Didiereaceae (presenças de constrição na base da folha, depósitos de tanino, idioblastos com drusas e cavidades de mucilagem), indicaram esses caracteres presentes no ancestral comum de Didiereaceae, tanto pelo método de máxima parcimônia (MP) quanto pelo método de máxima verossimilhança (MV), com probabilidade igual a 1. O caráter periderme precoce, ausente apenas em *P. fruticulosa*, também foi indicado na análise como presente no ancestral comum de Didiereaceae.

A reconstrução para o caráter base da folha expandida, ausente apenas em *P. longipedunculata* e *P. namaquensis*, indicou a presença do caráter no ancestral comum de Didiereaceae. Contudo, para o nó que representa o ancestral comum do clado formado por *P. longipedunculata*, *P. armiana* e *P. namaquensis*, os estados de caráter ausente e presente foram indicados como igualmente parcimoniosos por MP e com probabilidades muito próximas de 50% para MV. O mesmo ocorreu para o caráter tricomas, só que neste caso presente apenas em *P. longipedunculata* e *P. namaquensis*, sendo indicado como ausente no ancestral comum de Didiereaceae e

igualmente parcimonioso e de mesma probabilidade de ocorrer ou não no ancestral comum de *P. longipedunculata*, *P. armiana* e *P. namaquensis* (Fig. 12A).

O caráter epiderme da folha mucilaginosa, presente em *P. longipedunculata*, *P. armiana*, *P. namaquensis* e *P. carrissoana*, é indicado como ausente no ancestral comum de Didiereaceae e Portulacarioideae. Contudo ele apresenta probabilidades bem próximas de ter surgido de maneira independente no ancestral comum de *P. longipedunculata*, *P. armiana* e *P. namaquensis*, e no ancestral comum de *P. carrissoana* ou de ter surgido uma única vez no ancestral comum do clado formado por *P. longipedunculata*, *P. armiana*, *P. namaquensis*, *P. pygmaea*, *P. fruticulosa* e *P. carrissoana*, e ter sofrido reversão no ancestral de *P. pygmaea* e *P. fruticulosa*, ambas as hipóteses também são igualmente parcimoniosas (Fig. 12 B).

Para o caráter morfologia da folha, o estado de caráter do ancestral comum de Didiereaceae apresentava folhas planas, o mesmo resultado foi obtido para os ancestrais de Portulacarioideae e Didieroideae. As análises indicam o surgimento das folhas de morfologias cilíndricas/subcilíndricas mais de uma vez de maneiras independentes dentro da família (Fig. 13A). As análises de MP corroboraram os resultados obtidos pelo método de MV.

O caráter folha modificada apresenta 4 estados: (0) ausente; (1) espinhos vascularizados, (2) perfis e (3) espinhos lignificados. As análises indicaram o surgimento dos espinhos vascularizados no ancestral comum de Didieroideae e para o ancestral comum de Portulacarioideae a presença de perfis, estado de caráter já presente no ancestral de Didiereaceae (Fig. 13 B), com probabilidade de 0,88. O estado de caráter perfil também aparece como presente no ancestral comum de

Didiereaceae e do clado ACPT, também com a probabilidade de 0,88. As análises de MP corroboraram as análises de MV.

O caráter braquiblasto foi o único que não foi congruente entre os métodos de MP e MV. Para as análises de máxima verossimilhança, as probabilidades do braquiblasto presente nos ancestrais de Didiereaceae, Portulacarioideae, Didiereaceae + ACPT e do clado ACPT são de 0,69; 0,56; 0,57 e 0,43; respectivamente (Fig. 14A). Já a hipótese mais parcimoniosa para o surgimento dos braquiblastos é de que ele já estava presente no ancestral comum de Didiereaceae + ACPT e desapareceu de maneira independente mais de uma vez em Portulacarioideae: *P. afra*, *P. armiana* e *P. pygmaea*, e também em ACPT: *Talinum* e *Portulaca* (Fig. 14B).

DISCUSSÃO

Desenvolvimento da folha e suas variações - O desenvolvimento das folhas na maioria das Eudicotiledôneas consiste de três fases: iniciação foliar, morfogênese primária e morfogênese secundária e expansão (Dengler & Tsukaya, 2001). Na etapa de iniciação foliar o conjunto de algumas células do meristema apical origina, por divisões anticlinais e periclinais, o primórdio foliar. Durante a morfogênese primária as divisões celulares que ocorrem no primórdio foliar levam a formação do eixo foliar com simetria dorsiventral. Ocorre também a formação de um meristema marginal (blastozona marginal [Hegemann & Gleissberg, 1996]), cujas divisões celulares resultam na formação da lâmina foliar, caracterizando a morfogênese secundária. Durante a terceira e última fase, o crescimento e a diferenciação da folha jovem continuam, atingindo o tamanho e a forma da folha madura (Beck, 2005).

Para Didiereaceae foi possível observar que a ontogênese da folha apresenta todas estas etapas. Contudo, foram observadas folhas com três tipos de morfologia

diferente, sendo elas: plana, subcilíndrica e cilíndrica. Todas apresentaram a etapa de morfogênese primária bem semelhante, com a formação do primórdio foliar por crescimento apical, o estabelecimento da identidade aba-adaxial, formação da protoderme e do procâmbio e por fim a instalação da blastozona marginal. Contudo, durante a morfogênese secundária foram observadas diferenças no processo. Nos primórdios foliares em espécies que apresentam morfologia da folha cilíndrica/subcilíndrica a blastozona marginal é bem reduzida quando comparada à mesma região nos primórdios de espécies que apresentam folha plana.

Em adição, Fleming (2002) afirma que o tamanho e o formato da folha não são definidos unicamente pela atividade da blastozona marginal. Em acordo com essa afirmação, outra diferença observada entre os desenvolvimentos das folhas cilíndricas/subcilíndricas e planas de *Didiereaceae* está na diferenciação e expansão, etapa final do desenvolvimento, envolvendo as regiões da blastozona marginal e da nervura central. Nas espécies com folha de morfologia plana, as células da blastozona marginal se diferenciam em células menores e mais alongadas no sentido dorsiventral, originando a região da lâmina foliar, e na região da nervura central as células são maiores e isodiamétricas, originando duas regiões bem distintas na folha madura. Dentre as espécies com morfologia foliar cilíndrica/subcilíndrica, esta diferenciação entre as regiões da nervura central e da lâmina foliar observada nas folhas planas, não é tão evidente, uma vez que as células da nervura central e as resultantes da blastozona marginal têm o mesmo padrão de diferenciação, seja de forma homogênea ou heterogênea.

A expansão celular desigual nas diferentes partes do órgão é denominada crescimento alométrico (Dengler e Tsukaya, 2001). Podemos concluir que as folhas

planas e subcilíndricas/cilíndricas apresentam essas morfologias devido às variações observadas na atividade das suas blastozonas marginais e diferenças na etapa final do desenvolvimento, onde a diferenciação e expansão celular podem ser diferentes nas regiões da folha, alométrica, ou homogênea por todo o órgão, isométrica, respectivamente.

Segundo alguns autores (Yamaguchi *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2012), folhas com morfologia cilíndrica podem ser resultado da ausência de uma blastozona marginal em conjunto com intensa atividade mitótica na região abaxial do primórdio, originando um meristema que se estende ao redor de todo o primórdio, resultando em folhas com lâmina formada apenas pelo domínio abaxial. Este tipo de folha é denominado unifacial e seu desenvolvimento foi descrito para monocotiledôneas (Kaplan, 1970; Yamaguchi *et al.*, 2010) e Asteraceae (Ozerova & Timonin, 2009). Para outros grupos de Caryophyllales, entre eles Cactaceae (Gibson, 1977; Boke, 1944), Portulacaceae (Hernandes *et al.*, submetido) e Aizoaceae (Melo-de-Pinna *et al.*, submetido), também foram descritas folhas de morfologia cilíndrica, resultantes da atividade de uma região meristemática periférica presente no primórdio. Apesar de cilíndricas as folhas em Didiereaceae não são resultantes da atividade de um meristema periférico, pois estas apresentam formação de blastozona marginal durante seu desenvolvimento. Outra característica anatômica que sugere a não origem unifacial em Didiereaceae, diz respeito a organização dos feixes secundários e diferenciação dos tecidos xilemático e floemático. Em Didiereaceae, os feixes secundários estão dispostos lateralmente ao feixe central e o xilema está voltado para o lado adaxial e floema para o lado abaxial (feixes exoscópicos). Nas folhas unifaciais, por outro lado, os feixes vasculares secundários estão dispostos ao redor

dos feixes da nervura central e apresentam floema voltado para o exterior e xilema para o centro da folha (feixes endoscópicos).

Ogburn & Edwards (2013) classificam as folhas, em Caryophyllales, como folhas tridimensionais (3D), com disposição das nervuras secundárias ao redor da região da nervura central, e bidimensionais (2D), apresentando as nervuras secundárias dispostas lateralmente à região da nervura central, em secções transversais da folha. Os autores relacionam o surgimento do padrão de venação 3D no grupo como sendo diretamente relacionado ao grau de suculência da folha, pois o aumento de suculência pode impactar negativamente a fotossíntese na folha por aumentar a distância entre as nervuras e os tecidos que essas suprem. Ainda nesse trabalho foi estabelecido um limite hipotético entre a espessura da folha e a sua densidade de nervuras. Contudo, observamos em nossas análises que estes dois fatores não apresentam indícios de correlação para Didiereaceae. Todas as espécies observadas no presente trabalho apresentaram células de volume médio à grande no mesofilo, característico de folhas suculentas (Gibson, 1982), e, no entanto, as folhas apresentaram poucas nervuras secundárias de pequeno calibre e dispostas lateralmente à região da nervura central, equivalente ao padrão “2D” de Ogburn & Edwards (2013).

Em plantas modelo, a identidade dorsiventral do primórdio foliar é resultado da expressão diferencial dos grupos de genes *PHABULOSA*-like (PHB) e *KANADI* (KAN), de função antagônica, que atuam na diferenciação dos domínios abaxial e adaxial dos primórdios, respectivamente (Efroni *et al.*, 2010). Apesar dos primórdios foliares de Didiereaceae apresentarem identidade ada-abaxial logo no início de seu desenvolvimento, o domínio abaxial é predominante sobre o domínio adaxial,

provavelmente resultante da expressão predominante dos ortólogos dos genes PHB. Em secção transversal da região mediana do primórdio é possível observar que o domínio abaxial se expande por toda a parte convexa do primórdio, enquanto o domínio adaxial fica restrito a um conjunto de poucas células na parte reta do primórdio. Esta predominância do domínio abaxial fica ainda mais evidente no primórdio foliar de *A. procera*, além disso, nessa espécie as células da região adaxial se diferenciam antes, característico do domínio abaxial, enquanto as células da região abaxial se conservam meristemáticas por mais tempo, característico do domínio adaxial. Como consequência da predominância do domínio abaxial, em Didiereaceae a formação da blastozona marginal é de origem mista, resultante de divisões de células da região abaxial e adaxial do primórdio, quando o mais comum em Eudicotiledôneas é a blastozona marginal originada a partir de divisões na região adaxial do primórdio somente.

Os espinhos formados nos braquiblastos de Didieroideae são homólogos a folhas, sendo essa homologia estabelecida pelas seguintes características em comum: (i) formados a partir do meristema apical e (ii) presença de gema na axila do espinho. Contudo, diferente do desenvolvimento dos primórdios de folhas comuns, os primórdios espinhos não apresentam identidade dorsiventral e formação de blastozona marginal. Essas características poderiam indicar que o espinho como resultante do processo de abaxialização, caracterizando uma folha unifacial, porém, diferente dos primórdios de folhas unificiais, os primórdios de espinhos não apresentam nenhum meristema periférico. A ausência de uma meristema/blastozona periférico nos espinhos de Didiereaceae tem como consequência o seu diâmetro reduzido e ausência de nervuras secundárias nas margens.

O sistema vascular do espinho é formado somente pelos feixes da nervura central e sua organização é semelhante a um caule do tipo eustelo. No entanto, os feixes não estão uniformemente distribuídos, tendo um maior espaçamento na face adaxial. Isto poderia indicar um possível “vestígio” do domínio adaxial. Em *Arabidopsis thaliana*, mutantes *yabby* apresentam suas folhas convertidas em caule, apresentando a expressão do gene *WUSCHEL* (gene relacionado à manutenção do meristema apical caulinar) em seu ápice (Sarojan *et al.*, 2010). Se considerarmos a organização de eustelo do espinho e a presença de periderme ao longo do espinho, poderíamos considerar o espinho como uma folha modificada em caule. No entanto, o espinho apresenta crescimento determinado e folhas comuns em Didiereaceae apresentam periderme na região da base.

Algumas hipóteses sobre as alterações no desenvolvimento do espinho foram levantadas para explicar sua morfologia diferenciada, contudo elas são baseadas em alterações dos mecanismos de regulação gênica, que ainda são desconhecidos para Didiereaceae e grupos próximos. O estudo destes mecanismos em Didiereaceae e nos grupos próximos pode esclarecer as atuais dúvidas com relação às alterações nos processos de desenvolvimento que resultaram na morfologia e anatomia do espinho de Didieroideae.

Assim como os espinhos em Didieroideae, os perfilos observados em Portulacarioideae também são folhas modificadas. A homologia entre perfilos e folhas comuns também é estabelecida pela origem em comum nos flancos da gema axilar, contudo, diferente das folhas comuns e dos espinhos não foi observada gema na axila dos perfilos.

Comparando o desenvolvimento dos primórdios de perfilos ao de primórdios de folhas, observamos que os perfilos também apresentam o estabelecimento de identidade dorsiventral na morfogênese primária. No entanto, as células em seu interior se diferenciam precocemente, com a suberificação e acúmulo de tanino em algumas regiões, antes da instalação do cordão procambial e da blastozona marginal. A ausência de uma blastozona marginal nos primórdios de perfilos tem como consequência o não desenvolvimento de uma lâmina foliar. Porém, a simetria dorsiventral estabelecida no início da ontogênese do perfilo é responsável pela morfologia plana, mesmo sem a formação de blastozona marginal. O crescimento do perfilo em comprimento resulta da atividade do meristema basal, semelhante ao meristema basal que atua no desenvolvimento dos primórdios foliares (Beck, 2005).

Em resumo, espinhos, perfilos e folhas em *Didiereaceae* apresentam desenvolvimento semelhante ao padrão descrito para folhas de *Angiospermas* (Beck, 2005), porém, alterações em determinadas etapas de seus desenvolvimentos resultam nas diferentes morfologias dessas estruturas.

Reconstrução do caráter ancestral - As análises de reconstrução do caráter ancestral indicaram que o ancestral comum de *Didiereaceae* apresentava: folhas planas e reduzidas; constrição na região da base da folha; base da folha expandida; presença de perfilos; e braquiblastos na axila foliar. Além de periderme precoce, depósitos de tanino, idioblastos com drusas e cavidades de mucilagem.

Características observadas em *Didiereaceae* como redução no tamanho da folha, presença de idioblastos com tanino e cavidades de mucilagem distribuídas pelo corpo da planta representam importantes adaptações ao ambiente seco. De acordo com Gibson & Nobel (1986) e Fahn & Cutler (1992), a diminuição no tamanho da

folha e a queda das folhas na estação seca são fatores relacionados à diminuição na taxa de transpiração da planta. Com relação aos idioblastos contendo tanino, os autores citam que uma vez presentes ao redor do tecido condutor, essas células, aparentemente, dificultam a passagem de água evitando a sua perda pela superfície. Segundo Fahn & Cutler (1992), células contendo tanino presentes próximo ao sistema clorofiliano, podem representar uma proteção dos tecidos fotossintetizantes contra a insolação excessiva. Característica que foi observada em folhas de *P. namaquensis*, *P. carrissoana* e *A. procera*. E por fim, a mucilagem atua como importante fator na regulação da economia de água pela planta, isso se deve pela afinidade entre os polissacarídeos que a constituem e as moléculas de água (Fahn & Cutler, 1992; Gibson & Nobel, 1986).

Além dessas características, a extrema redução dos entre-nós nos ramos laterais (braquiblastos), representa a mais notável adaptação de Didiereaceae ao ambiente xérico. A presença de ramos reduzidos está ligada a sazonalidade do ambiente, onde as folhas do braquiblasto geralmente são decíduas, caindo no início da estação seca, e novas folhas são formadas após as primeiras chuvas (Gibson & Nobel, 1986). As folhas do braquiblasto de Didiereaceae seguem esse padrão e as novas folhas são formadas somente pela atividade do meristema apical do braquiblasto. Pode representar vantagem para a planta produzir ramos mais curtos, do ponto de vista energético, uma vez que as folhas vão estar presentes apenas no ápice.

A presença de idioblastos com drusas, característica constante para Didiereaceae, está relacionada à proteção contra herbívora (Ogburn & Edwards, 2009). Além dessa característica, em Didiereaceae, a presença de periderme precoce na base da folha e no caule, pode representar uma importante proteção mecânica. No entanto, a mais importante característica deste tipo está relacionada à proteção da

gema axilar e seus produtos. Os perfilos, presentes no ancestral de Didiereaceae, em conjunto com a base das folhas expandidas conferem proteção aos primórdios na região da gema axilar.

A presença de perfilos protegendo a região da gema axilar foi uma característica irradiada dentre os representantes de Portulacarioideae. Em adição, a subfamília apresentou maior diversificação, representada pelo surgimento de tricomas e células papilosas e a presença de mucilagem na epiderme, em algumas espécies. Além disso, ocorreram reversões no grupo como a ausência de ramo reduzido, da periderme precoce e base da folha expandida.

Já Didieroideae, é um grupo mais homogêneo para a característica braquiblastos, isso provavelmente se deve pelo surgimento dos espinhos em seu ancestral. Os espinhos conferem à Didieroideae uma proteção ainda mais eficiente para a região da gema axilar e seus produtos. A expansão da base das folhas e dos espinhos que se fundem formando tecido ao redor do meristema apical do braquiblasto, somada as formações de periderme e uma proteção de fibras, torna o meristema inacessível. Tanto que este tipo de proteção surgiu no ancestral comum de Didieorideae e se irradiou para todo o grupo sofrendo poucas variações.

Seguindo a proposta de que o ancestral de Didiereaceae seria continental e o ancestral de Didieroideae teria, posteriormente, se dispersado para Madagascar (Applequist & Wallace, 2001; Capítulo 1), as características apontadas como presentes no ancestral comum favoreceram o seu estabelecimento no ambiente xérico do continente africano. Os processos de aridificação se intensificaram na África nos últimos 10-15 m.a. (Klak *et al.*, 2004; Kadereit *et al.*, 2006). A idade da família é controversa, com análises baseadas na biogeografia de espécies de *Portulaca* nas ilhas do Havaí, indicando que o ancestral comum de Didiereaceae teria surgido à

aproximadamente 12 m.a. (Ocampo & Columbus, 2010), e análises que se baseiam em fósseis de diversas Angiospermas sugerindo que o ancestral date de aproximadamente 30 m.a. (Arakaki *et al.*, 2012). Porém, ambos os casos, corroboram a hipótese de que a intensificação desse processo climático teria beneficiado o ancestral de Didiereaceae.

Relações de Didiereaceae em Portulacineae – Uma das primeiras relações filogenéticas propostas para Didiereaceae *s.s.* (antes da inclusão dos gêneros *Portulacaria*, *Ceraria* e *Calypthrotheca* na família) foi como grupo irmão de Cactaceae (Rauh, 1983), um dos pontos apresentados para propor essa relação seria a homologia entre a aréola de Cactaceae e o braquiblastos de Didereaceae, sendo ambos considerados ramos reduzidos, portando folhas modificadas em espinhos.

Boke (1980) descreve o desenvolvimento dos espinhos em Cactaceae sendo iniciado por um curto período de crescimento apical seguido de um longo período de crescimento em comprimento proveniente da atividade do meristema basal/intercalar. A maturação ocorre com o processo de lignificação que inicia no ápice e progride em direção a base, envolvendo o meristema intercalar e seus tecidos adjacentes. Já em Didiereaceae, como observado, os espinhos crescem em comprimento por expansão e diferenciação celular, sem a presença de um meristema em sua base, e não sofrem lignificação em seu interior, sendo esses vascularizados. A partir dessas diferenças, é possível afirmar que a semelhança entre essas estruturas, que não compartilham os mesmos processos de desenvolvimento, não pode se considerada uma homologia que sustente a relação filogenética proposta por Rauh (1983).

A semelhança entre essas estruturas parece tratar-se de um caso de convergência morfológica. Em adição a isso, análises filogenéticas baseadas em dados morfo-anatômicos (Carolin, 1987; Hershkovitz, 1993) e moleculares

(Applequist & Wallace, 2001; Nyffeler, 2007; Nyffeler & Egli, 2010; Ocampo & Columbus, 2010) não corroboraram esta relação entre as famílias.

Segundo essas análises filogenéticas, Cactaceae forma um clado, denominado ACPT, em conjunto com as famílias Portulacaceae, Anacampserotaceae e Talinaceae, altamente sustentado por dados moleculares (Nyffeler e Egli, 2010). A relação mais provável para Didiereaceae dentro de Portulacineae é indicada como sendo grupo irmão de ACPT (Nyffeler, 2007; Nyffeler & Egli, 2010, Capítulo 1). Contudo, essa relação apresenta baixos valores estatísticos de sustentação. Sendo corroborada por características anatômicas compartilhadas entre esses grupos: presença de células com tanino, esclereides pericíclicas e estômatos paralelocíticos (Ogburn & Edwards, 2009). Além dessas características, nós também observamos neste trabalho para Didiereaceae a presença de drusas de oxalato de cálcio, cavidades de mucilagem, epiderme variando aleatoriamente de uma a duas células; características também observadas em algumas Cactaceae (Gibson & Nobel, 1986; Loza-Cornejo & Terrazas, 2003). No entanto, essas características não são observadas nas outras famílias de ACPT (Ogburn & Edwards, 2009; Hernandez *et al.*, em preparação). Uma característica presente no ancestral de Didiereaceae é a presença de constrição delimitando a base da folha, presente em todos os representantes analisados. Essa característica é observada em representantes de Talinaceae, Portulacaceae e nas subfamílias de Cactaceae, Pereskioideae e Opuntioideae (Boke, 1944; Gibson & Nobel, 1986; Hernandez *et al.*, submetido), e não é descrita para outras famílias de Portulacineae, podendo representar uma sinapomorfia para a relação ACPT + Didiereaceae.

Nyffeler & Egli (2010) propõe que estruturas presentes na região da axila foliar de ACPT (cerdas e tricomas em Portulacaceae e Anacampserotaceae e perfílos

em Talinaceae) seriam remanescentes de um ramo altamente reduzido presente no ancestral e, por tanto, homólogos à aréola de Cactaceae. Seguindo as idéias de Rauh (1983), os autores também propõe que esse ramo reduzido seria homólogo aos braquiblastos de Didierioideae, pontuando que as únicas diferenças entre esses e a aréola seriam o número definido de espinhos e a ausência de tricomas no braquiblasto. Como já discutido anteriormente, os espinhos em Didiereaceae e Cactaceae não podem constituir uma homologia desse tipo, devido às diferenças em seus processos ontogênicos. Contudo, nossas análises demonstraram que o ancestral de Didiereaceae já apresentava braquiblastos, corroborando parcialmente a proposta de Nyffeler & Egli (2010).

Os perfilos foram descritos inicialmente, em Portulacineae, para Talinaceae, como estruturas filiformes presentes na região da axila foliar (Ogburn & Edwards, 2009; Nyffeler & Egli, 2010). Posteriormente, foram caracterizados como estruturas homólogas aos espinhos formados na aréola de Cactaceae, pelas seguintes características: (i) origem na gema axilar; (ii) crescimento inicial apical seguido de crescimento pelo meristema basal/intercalar; (iii) lignificação iniciada no ápice; e (iv) formação no lado abaxial da gema axilar (Hernandes *et al.*, em preparação). A partir do observado em nossas análises, podemos concluir que os perfilos de Portulacarioideae, registrados pela primeira vez neste trabalho, são homólogos aos perfilos de Talinaceae, pelas seguintes características ontogênicas compartilhadas: (i) origem na gema axilar; (ii) crescimento inicial apical seguido de crescimento pelo meristema basal; e (iii) diferenciação iniciada no ápice progredindo em direção à base. Mesmas características utilizadas para estabelecer homologia entre espinhos de Cactaceae e perfilos de Talinaceae.

Sendo assim, corroborando a hipótese de Nyffeler & Egli (2010), podemos dizer que o ancestral comum de ACPT+Didiereaceae apresentava um ramo reduzido (braquiblasto) na região da axila foliar e acrescentar que provavelmente portava profilos ao invés de espinhos. A provável evolução desse caráter em ACPT é de que no ancestral essas estruturas seriam semelhantes aos profilos em Talinaceae e que se diversificaram nos espinhos presentes nas Cactaceae atuais. Contudo, é mais difícil assumir que o mesmo aconteceu em Didiereaceae, onde espinhos (Didieroideae) e profilos (Portulacarioideae), apesar de topologicamente ocuparem a mesma posição na planta (base dos braquiblastos), anatomicamente e ontogeneticamente são muito diferentes. Vale ressaltar que as diversificações das subfamílias são recentes, quando comparadas ao tempo de divergência entre elas (Ocampo & Columbus, 2010; Arakaki *et al.*, 2012), indicando que o processo de ontogênese dessas estruturas pode ter se modificado bastante ao longo desse caminho. O estudo desse caráter em Calypthrothecoideae (*Calypthrotheca somaliensis*), grupo-irmão de Didieroideae, pode ajudar a esclarecer essa dúvida, apresentando estruturas intermediárias, como observado em Cactaceae quanto a origem foliar dos espinhos (Boke 1980; Arruda 2010).

Em resumo, concluímos que ACPT e Didiereaceae compartilham várias características anatômicas que podem representar sinapomorfias que sustentam essa relação: drusas de oxalato de cálcio, cavidades de mucilagem, epiderme variando aleatoriamente de uma a duas células, presença de células com tanino. Além dessas características anatômicas, características morfológicas também parecem sustentar essa relação, dentre elas: constrição na base da folha e braquiblastos portando folhas e profilos.

REFERÊNCIAS

- Applequist, W. L. & Wallace, R. S. 2001. Phylogeny of the Portulacaceous Cohort Based on ndhF Sequence Data. **Systematic Botany** **26**: 406 - 419.
- Applequist, W. L. & Wallace, R. S. 2003. Expanded circumscription of Didiereaceae and its division into tree subfamilies. **Adansonia series** **3, 25**: 13-16.
- Arakaki, M.; Cristin, P. A.; Nyffeler, R.; Lendel, A.; Eggli, U.; Ogburn, M. A.; Spriggs, E.; Moore, M. J. & Edwards, E. J. 2012. Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. **Proc. of National Academy of Science of U.S.A.** **108**: 8379 – 8384.
- Arruda, E. 2010. **Histogênese de segmentos caulinares de espécies de Opuntioideae (Cactaceae)**. Tese de Doutorado do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Beck, C. B. 2005. **Plant Structure and development**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Boke, N. H. 1944. Histogenesis of the Leaf and Areole in *Opuntia cylindrica*. **American Journal of Botany** **31**: 299 - 316.
- Boke, N. H. 1980. Developmental morphology and anatomy in Cactaceae. **American Institute of Biological Sciences** **30, nº 9**: 605 – 610.
- Carolin, R. 1987. A Review of the Family Portulacaceae. **Australian Journal of Botany** **35**: 383 - 412.
- Dengler, N.G. & Tsukaya, H. 2001. Leaf morphogenesis in dicotyledons: current issues. **International Journal of Plant Science** **162(3)**: 459–464.

- Efroni, I.; Eshed, Y & Lifschitzb, E. 2010. Morphogenesis of Simple and Compound Leaves: A Critical Review. **The Plant Cell** **22**: 1019–1032.
- Fahn, A. & Cutler, D. E. 1992. **Xerophytes**. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Germany.
- Fleming, A.J. 2002. The mechanism of leaf morphogenesis. **Planta** **216**(1): 17–22.
- Gibson, A.C. 1977. Vegetative anatomy of *Maihuenia* (Cactaceae) with some theoretical discussions of ontogenetic changes in xylem cell types. **Bulletin of Torrey Botanical Club** **104**(1): 35–48.
- Gibson, A.C. 1982. The anatomy of succulence. In **Crassulacean Acid Metabolism: Proceedings of the Fifth Annual Symposium in Botany**, January 14–16, 1982, University of California, Riverside, I.P. Ting and M. Gibbs, eds. Rockville, MD, USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 1–17.
- Gibson, A.C. & NOBEL, P.S. 1986. **The Cactus Primer**. Harvard University Press, Cambridge.
- Hagemann, W., and Gleissberg, S. 1996. Organogenetic capacity of leaves: the significance of marginal blastozones in angiosperms. **Plant Systematic Evolution** **199**: 121–152.
- Hernandes, J.; Oliveira-Neto, M.A. & Melo-de-Pinna, G.F.A. Blastozone positioning during leaf development and its relation to leaf morphologies in Portulacineae (Caryophyllales). Submetido.
- 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.

- Kadereit, G., Mucina, L. & Freitag, H. 2006. Phylogeny of Salicornioideae (Chenopodiaceae): diversification, biogeography, and evolutionary trends in leaf and flower morphology. **Taxon** **55**: 617-642.
- 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**(3): 331–361.
- Klak, C., Reeves, G. & Hedderson, T. A. J. 2004. Unmatched tempo of evolution in Southern African semi-desert ice plants. **Nature** **427**: 63-65.
- 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.
- Loza-Cornejo, S. & Terrazas, T. 2003. Epidermal and hypodermal characteristics in North American Cactoideae (Cactaceae). **Journal of Plant Research** **11**: 27–35.
- Maddison, W.P. & Maddison, D.R. 2009. **Mesquite, A modular system for evolutionary analysis**. Version 2.72. <http://mesquiteproject.org>
- Melo-de-Pina, G.F.A.; Nunes, A.S.; Arruda, E.C.P. & Klak, C. Repeated evolution of endoscopic peripheral vascular bundles in succulent leaves of Aizoaceae (Caryophyllales). **Taxon** (sob revisão).
- 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. & Egli, U. 2010. Disintegrating Portulacaceae: A new familial classification of the suborder Portulacineae (Caryophyllales) based on molecular and morphological data. **Taxon** **59**: 227 - 240.
- Ocampo, G. & Columbus, J. T. 2010. Molecular phylogenetics of suborder Cactineae (Caryophyllales), including insight into photosynthetic diversification and historical biogeography. **American Journal of Botany** **97**: 1827 -1847.
- 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.
- Ogburn, R.M. & Edwards, E.J. 2013. Repeated origin of three-dimensional leaf venation releases constraints on the evolution of succulence in plants. **Current Biology** **23**: 1 - 5.
- Ozerova, L.V. & Timonin, A.C. 2009. On the evidence of subunifacial and unifacial leaves: developmental studies in leaf-succulent *Senecio* L. species (Asteraceae). **Wulfenia** **16**: 61--77.
- Rauh, W. 1983. The morphology and systematic position of the Didiereaceae of Madagascar. **Bothalia** **14**: 839 – 843.
- Rauh, W. 1998. Succulent and Xerophytic Plants of Madagascar. **Strawberry Press**, Mill Valey, California, U.S.A.
- Rowley, G. D 1992. Didiereaceae 'Cacti of the old world'. **The British Cactus and Succulent Society**, Kew, Richmond, England.
- Ruzin, S. E. 1999. **Plant Microtechnique and Microscopy**. Oxford University Press, New York.

- 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.
- Sarojan, R.; Sappl, P. G.; Goldshmidt, A.; Efroni, I.; Floyd, S. K.; Eshed, Y. & Bowmana, J. L. 2010. Differentiating Arabidopsis Shoots from Leaves by Combined YABBY Activities. **The plant cell** preview.
- Yamaguchi, T., Yano, S. & Tsukaya, H. 2010. Genetic framework for flattened leaf blade formation in unifacial leaves of *Juncus prismatocarpus*. **The Plant Cell** **22**: 2141--2155.
- Yamaguchi, T., Nukazuka, A. & Tsukaya, H. 2012. Leaf adaxial-abaxial polarity specification and lamina outgrowth: evolution and development. **Plant Cell Physiology** **53**: 1180--1194.

Subfamília	Espécie	Braquiblasto	Folha modificada	Morfologia da folha	Base da folha expandida	Construção na base da folha	Folha com epiderme muclaginosa	Células papilosas e Tricomas	Drusas	Células com tanino	Periderme precoce	Cavidade de muclagem
Didierioideae	<i>Didierea madagascariensis</i> Baill.	+	Espinho vascularizado	Subcilíndrica	+	+	-	-	+	+	+	+
	<i>Didierea trollii</i> Capuron & Rauh	+	Espinho vascularizado	Subcilíndrica	+	+	-	-	+	+	+	+
	<i>Alluaudia ascendens</i> Drake	+	Espinho vascularizado	Plana	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Alluaudia comosa</i> Drake	+	Espinho vascularizado	Subcilíndrica	+	+	-	-	+	+	+	+
	<i>Alluaudia dumosa</i> Drake	+	Espinho vascularizado	Subcilíndrica	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Alluaudia humbertii</i> Choux	+	Espinho vascularizado	Plana	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Alluaudia montagnacii</i> Rauh	+	Espinho vascularizado	Plana	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Alluaudia procer</i> Drake	+	Espinho vascularizado	Plana	+	+	+	-	+	+	+	+
	<i>Decarya madagascariensis</i> Choux	+	Espinho vascularizado	Plana	+	+	+	-	+	+	+	+
	<i>Alluaudiopsis fihirenensis</i> Humbert & Choux	+	Espinho vascularizado	Cilíndrica	+	+	+	-	+	+	+	+
Portulacarioideae	<i>Alluaudiopsis marmoriana</i> Rauh	+	Espinho vascularizado	Subcilíndrica	+	+	-	-	+	+	+	+
	<i>Portulacaria afra</i> Jacq.	-	Profilo	Plana	+	+	-	-	+	+	+	+
	<i>Portulacaria armiana</i> van Jaarsv.	-	Profilo	Plana	+	+	+	-	+	+	+	+
	<i>Portulacaria carrisoana</i> Oliveira-Neto & Klak	+	Profilo	Plana	+	+	+	-	+	+	+	+
	<i>Portulacaria fruticulosa</i> Oliveira-Neto & Klak	+	Profilo	Plana	+	+	-	-	+	+	-	+
	<i>Portulacaria longipedunculata</i> Oliveira-Neto & Klak	+	Profilo	Subcilíndrica	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Portulacaria namaquensis</i> Sond.	+	Profilo	Cilíndrica	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Portulacaria pygmaea</i> Pillans	-	Profilo	Cilíndrica	+	+	-	-	+	+	+	+

Tabela 1 – Síntese dos resultados obtidos a partir das análises morfológicas e anatômicas. (+) = caráter presente; (-) = caráter ausente e NA = caráter não analisado.

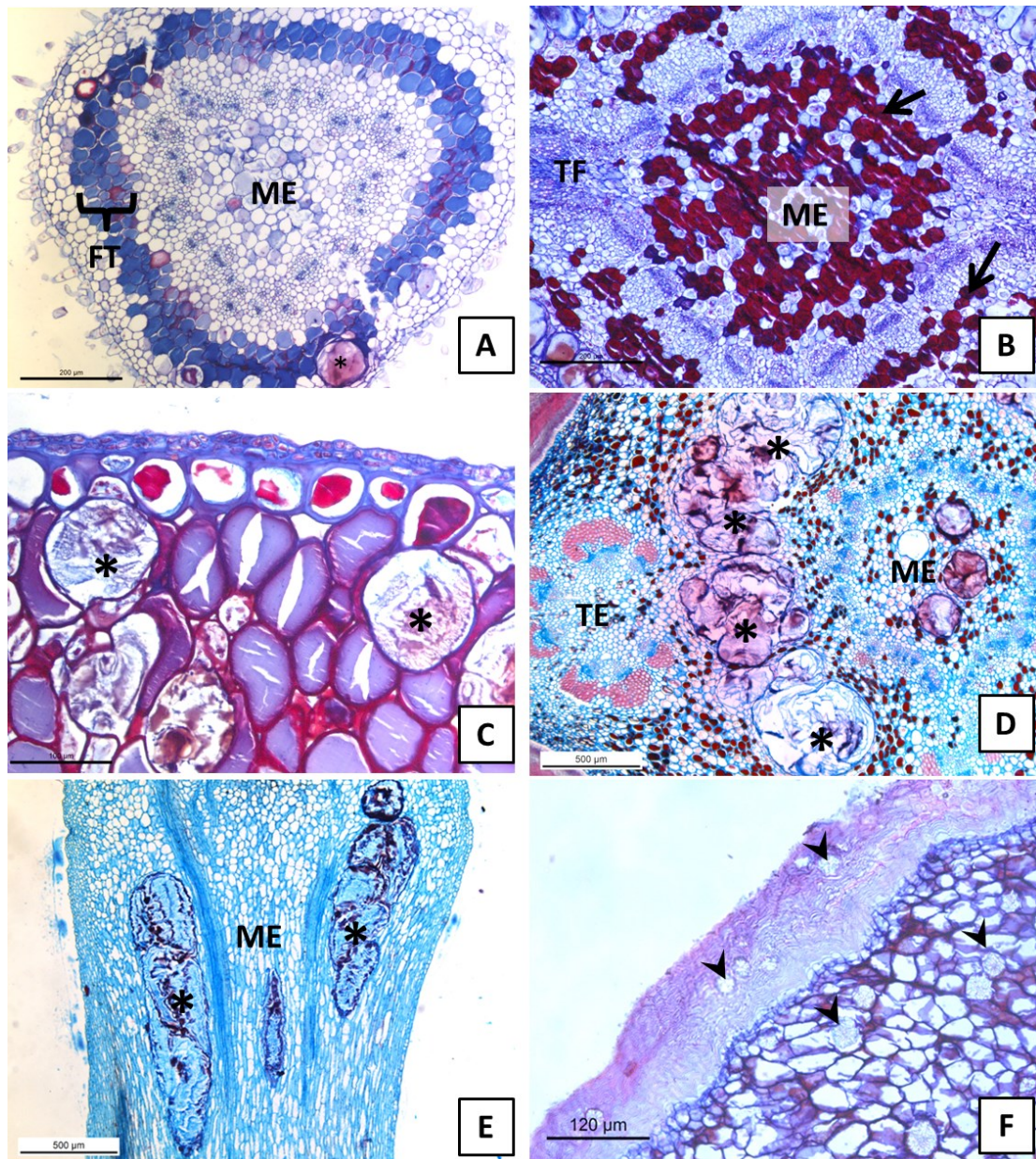


Fig. 1 – A – Secção transversal do caule jovem de *P. longipedunculata*. B – Secção transversal do caule jovem de *P. fruticulosa*, as setas indicam as regiões predominantemente constituídas por depósitos de tanino. C – Secção transversal do mesofilo da folha de *P. armiana*, asteriscos indicam cavidades de mucilagem se formando. D e E – Secções transversal e longitudinal do braquiblasto de *D. madagascariensis*, respectivamente, asteriscos indicam cavidades de mucilagem. F – Secção transversal do caule de *A. comoso*, cabeças de setas indicam idioblastos com drusas na periderme e no córtex. FT = faixa de depósitos de tanino; ME = medula; TE = traço do espinho e TF = traço foliar.

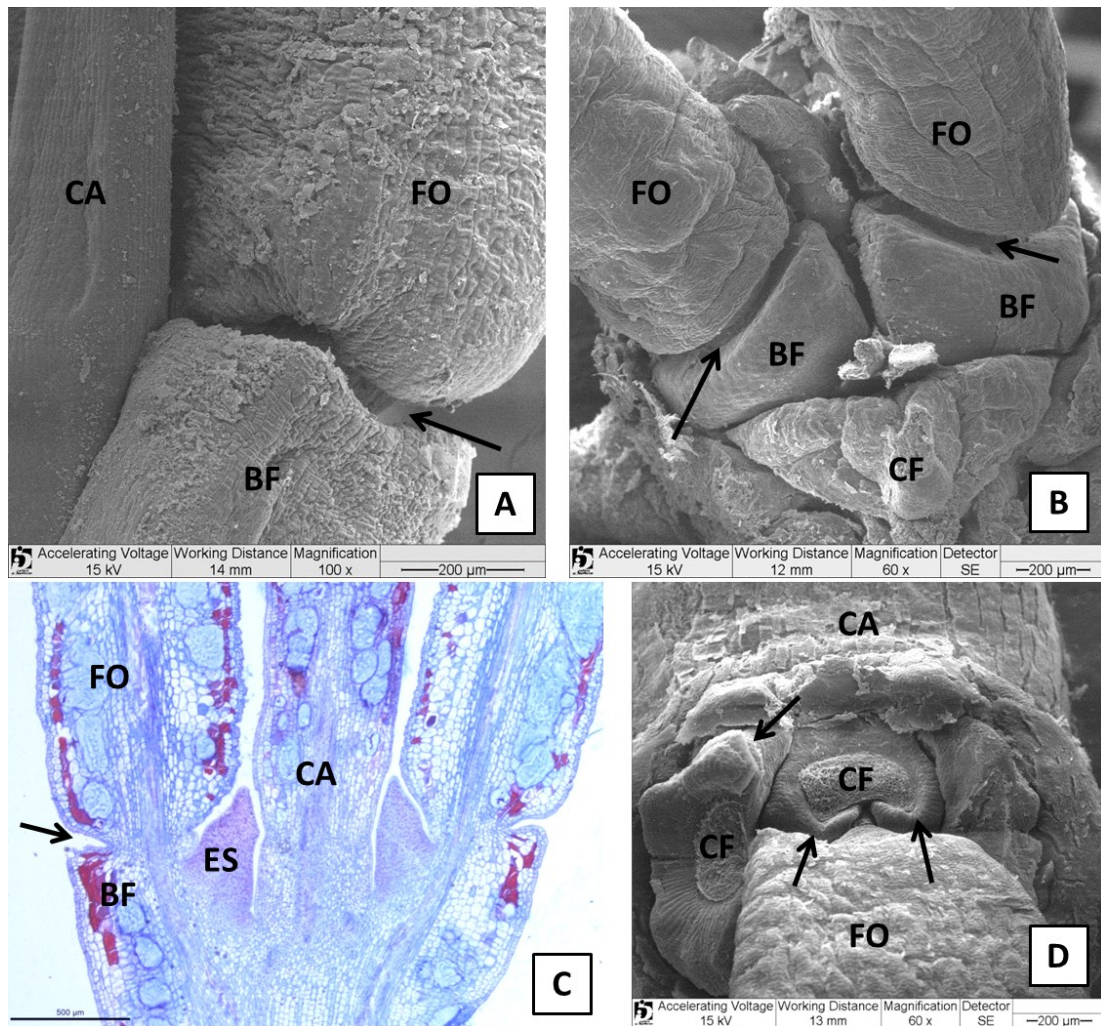


Fig. 2 – A e B – MEV da base da folha de *A. marneriana* e do ápice de ramo de *P. carrissoana*, setas indicam constrição. C – Secção longitudinal de ramo jovem de *A. fiherenensis*, setas indicam constrição. D – MEV de base de braquiblasto de *P. fruticulosa*, setas indicam bases expandidas das folhas. BF = base de folha; CA = caule; CF = cicatriz foliar; ES = espinho e FO = folha.

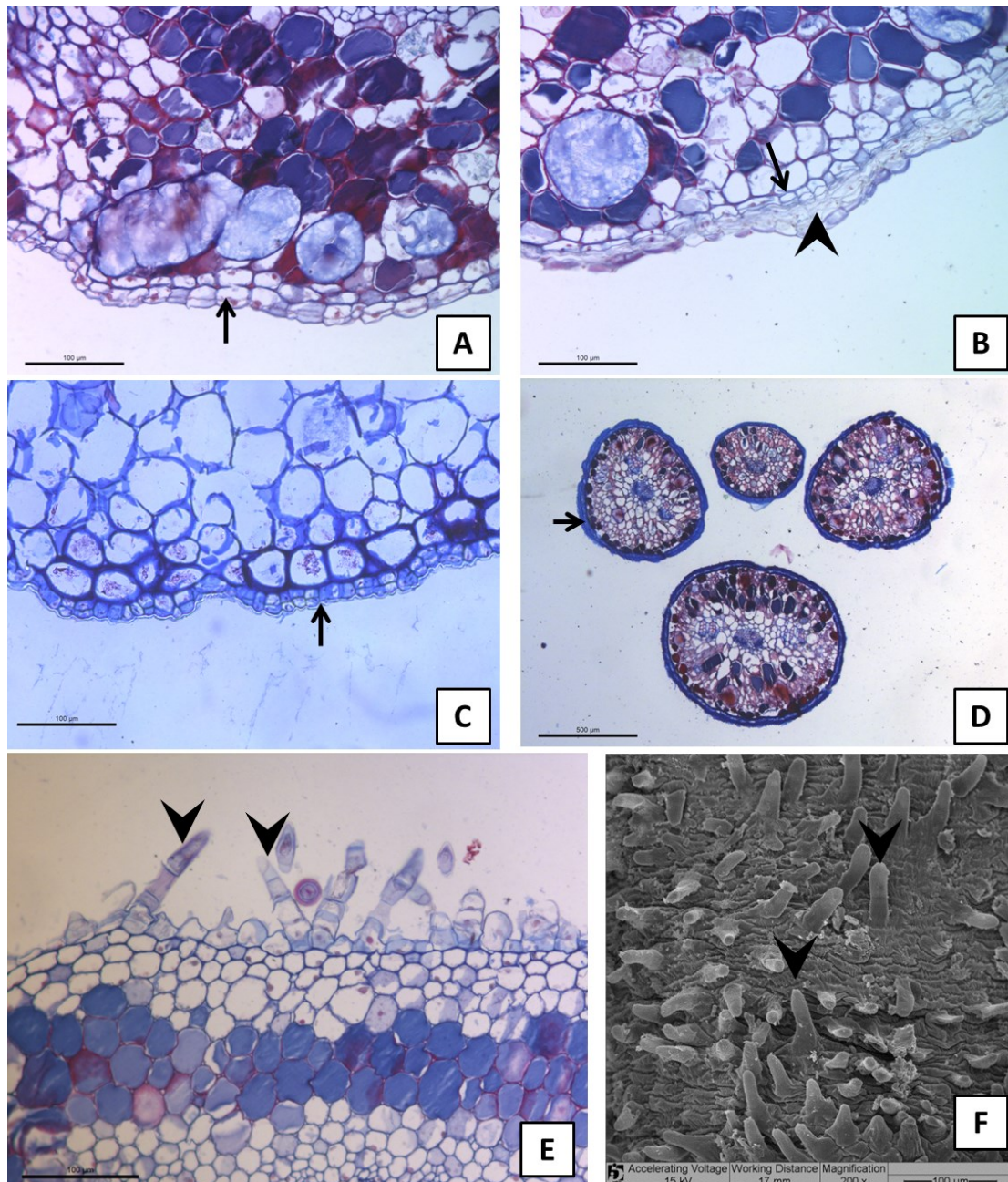


Fig. 3 – A e B – Secções transversais de caule jovem de *P. carrisoana*, seta indica felogênio e cabeça de seta indica felema. C – Secção transversal da folha de *P. pygmaea*, seta indica epiderme. D – Secção transversal de folhas de *P. namaquensis*, seta indica epiderme com mucilagem. E e F – Secção transversal do ramo jovem e MEV da epiderme de *P. longipedunculata*, respectivamente, cabeças de setas indicam tricomas.

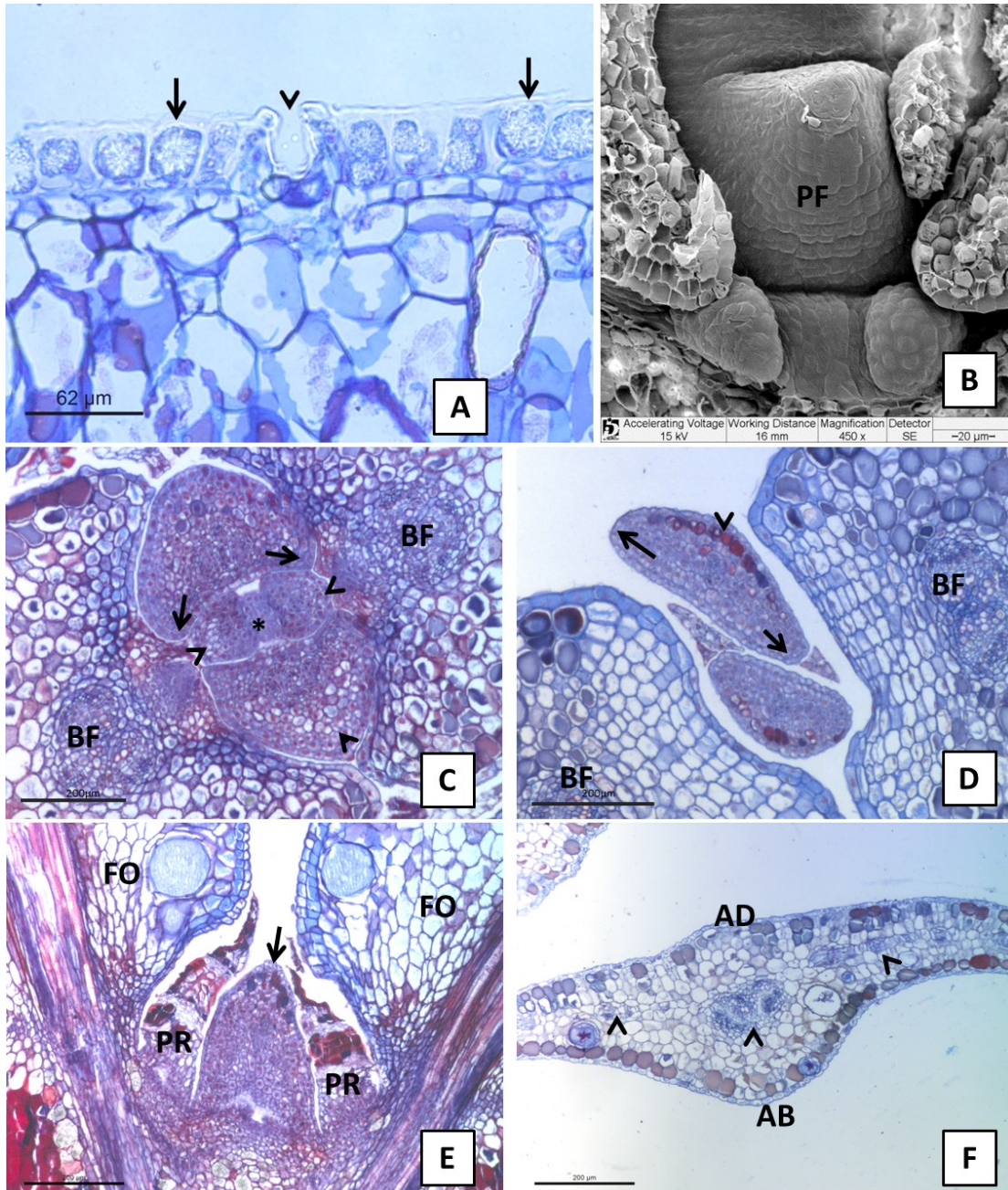


Fig. 4 – A – Secção transversal da folha de *A. comosa*, setas indicam células com drusas e cabeça de seta indica estômato. B – MEV do primórdio foliar de *P. fruticulosa*. C e D – Secções transversais de região do meristema apical caulinar (MAC) e par de primórdios de foliares de *P. carrissoana*, respectivamente, cabeça de setas indicam região abaxial dos primórdios, asterisco (*) indica o MAC e setas indicam blastozonas marginais. E – Secção longitudinal do MAC de *P. carrissoana*, seta indica ápice diferenciado do primórdio foliar. F – Secção transversal da folha de *P. carrissoana*, cabeças de seta indicam feixes vasculares. AB = lado abaxial; AD = lado adaxial; BF = base de folha; FO = folha; PF = primórdio foliar e PR = perfilo.

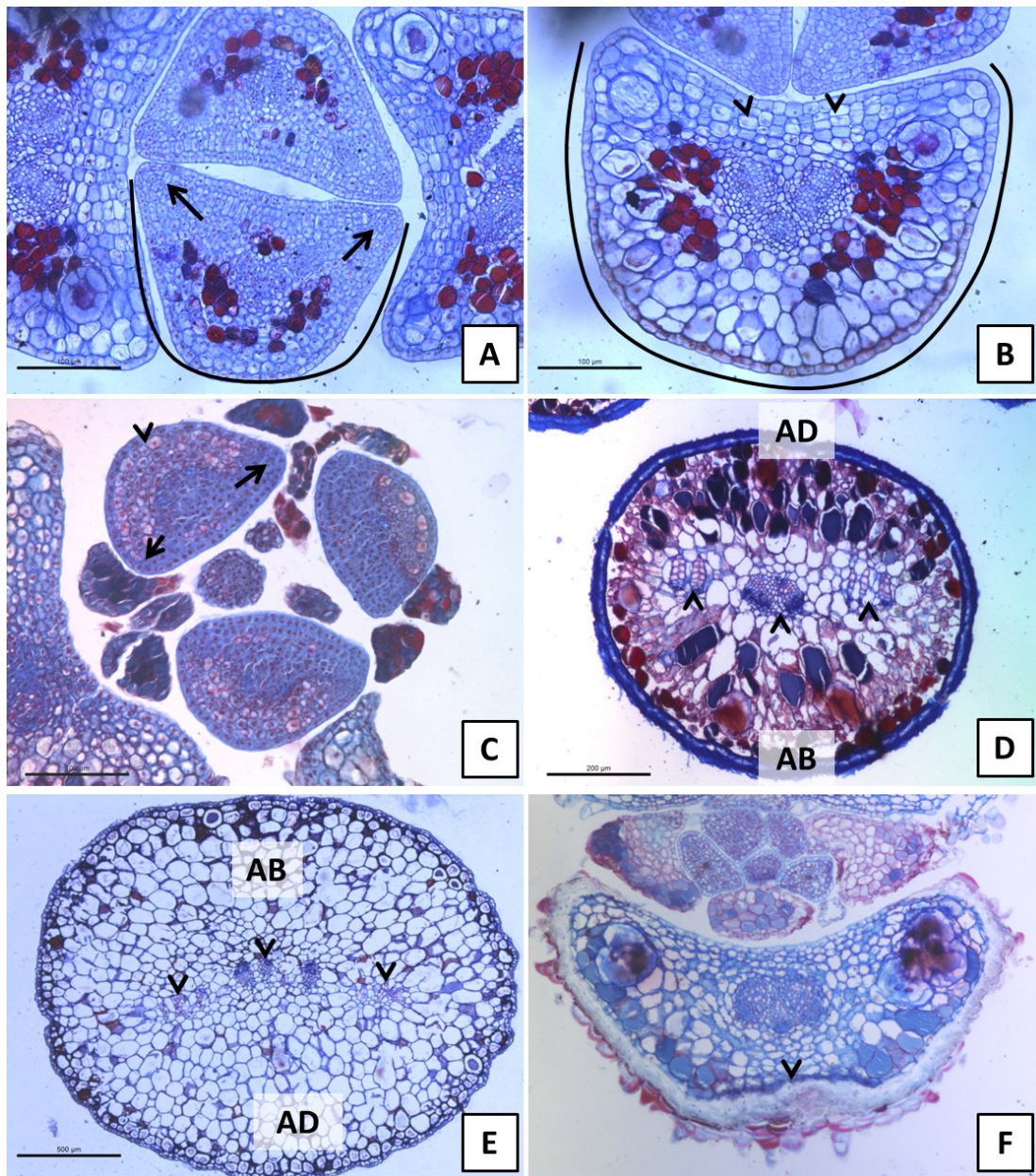


Fig. 5 – A e B – Secções transversais de primórdios foliares e base de folha jovem de *P. fruticulosa*, respectivamente, setas indicam blastozonas marginais, cabeças de setas indicam séries de células na região adaxial e linha preta indica região abaxial. C e D – Secções transversais de primórdios foliares e folha de *P. namaquensis*, respectivamente, setas indicam blastozonas marginais, cabeça de seta em C indica lado abaxial e cabeças de setas e D indicam feixes vasculares. E - Secção transversal de folha de *P. pygmaea*, cabeças de setas indicam feixes vasculares. F – Secção transversal de base de folha de *P. longipedunculata*, cabeça de seta indica periderme. AB = abaxial e AD = adaxial.

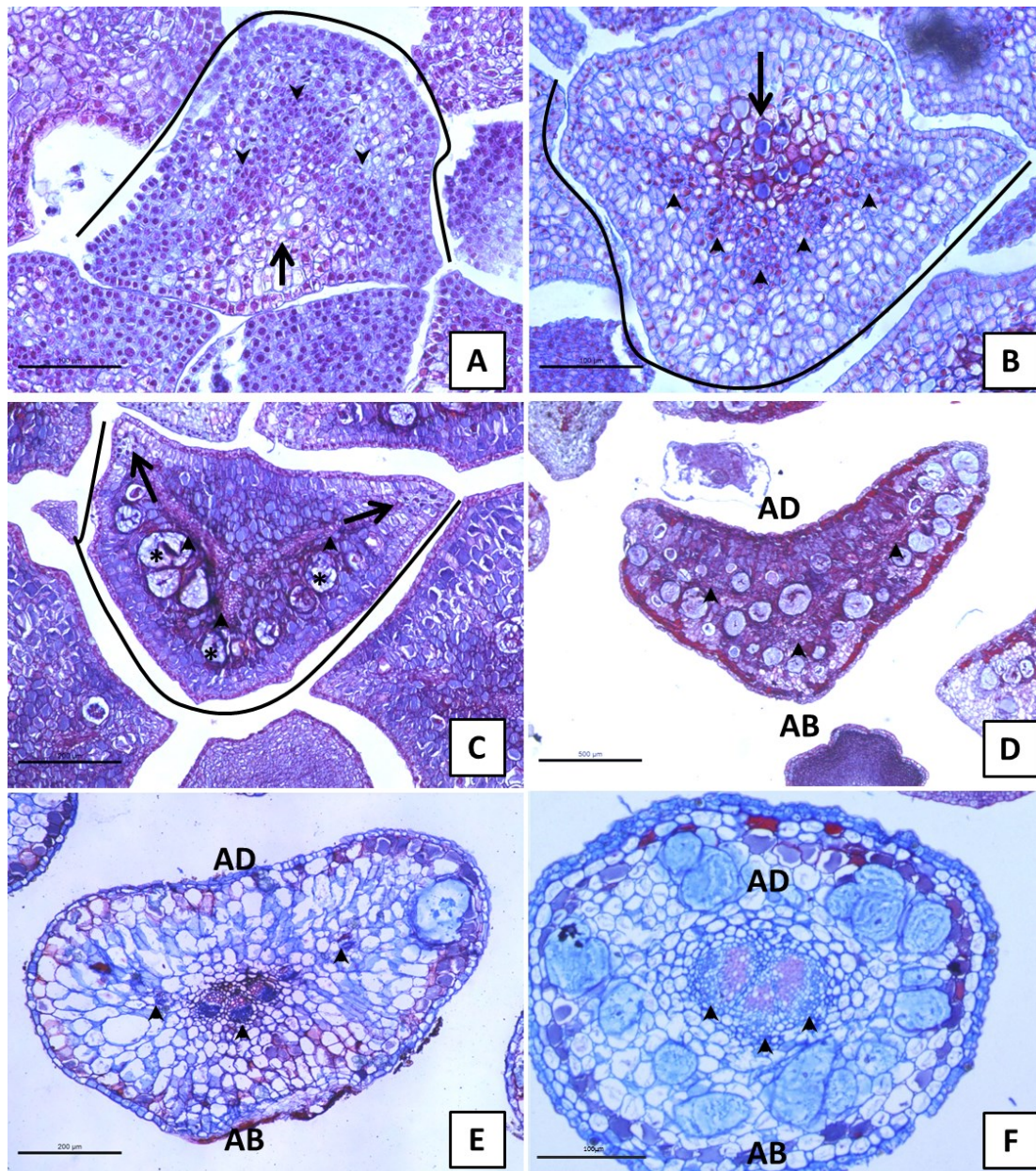


Fig. 6 – A a D – Secções transversais de primórdios foliares (A e B), folha jovem (C) e folha (D) de *A. procera*, setas indicam região adaxial (A e B) e blastozonas marginais (C), cabeças de setas indicam cordões procambiais (A, B e C) e feixes vasculares (D), asteriscos indicam cavidades de mucilagem e linha preta indica o domínio abaxial. E – Secção transversal da folha de *D. trollii*, cabeças de setas indicam feixes vasculares. F – Secção transversal da folha de *A. fiherenensis*, cabeças de setas indicam feixes vasculares. AB = lado abaxial e AD = lado adaxial.

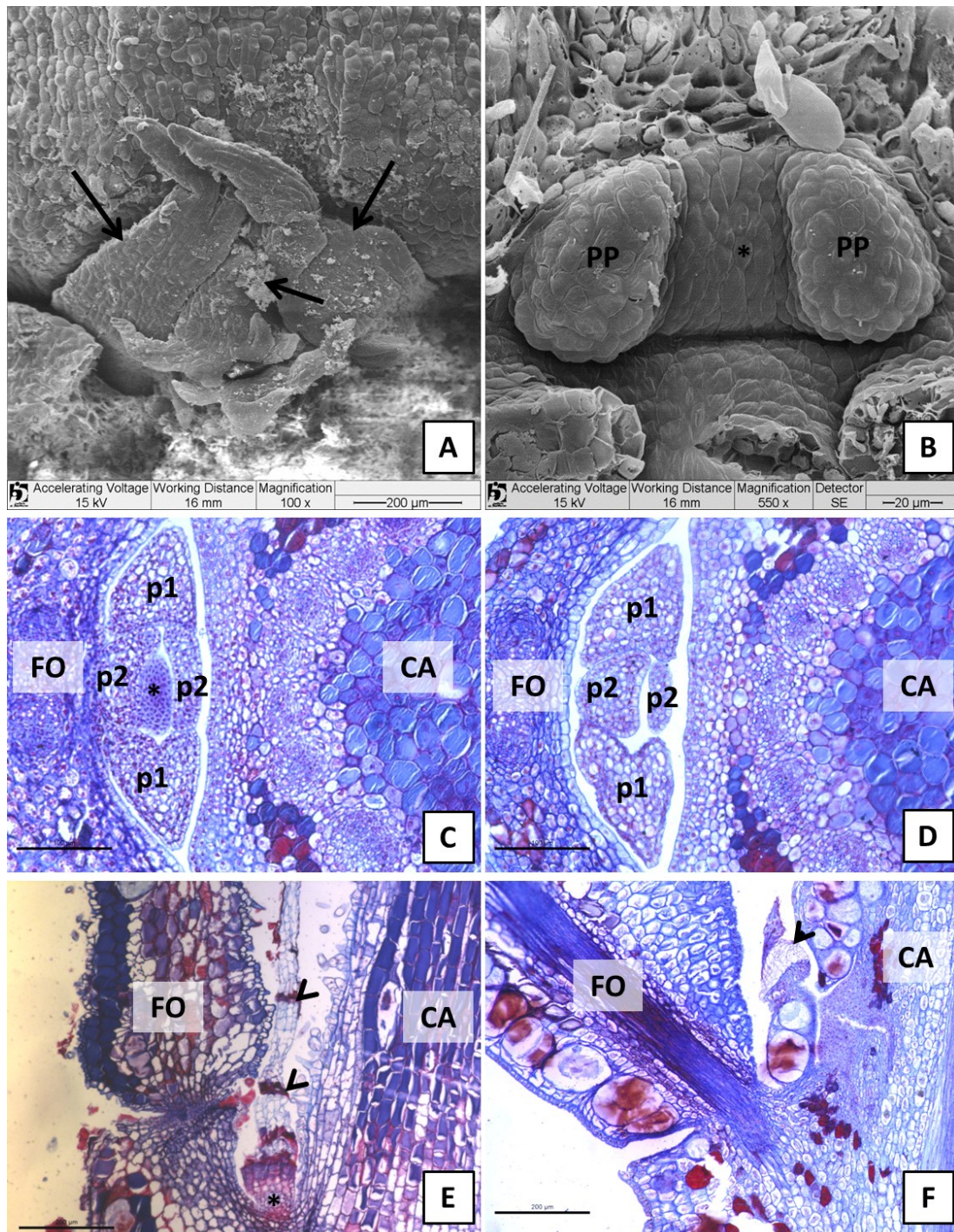


Fig. 7 – A – MEV da região da axila foliar de *P. pygmaea*, setas indicam perfis. B, C e D – MEV (B) e secções transversais (C e D) da região da axila foliar de *P. fruticulosa*, asteriscos indica a gema axilar. E – Secção longitudinal da região da axila foliar de *P. longipedunculata*, cabeças de setas indicam faixas de depósitos de tanino no perfil e asterisco indica base meristemática do perfil. F – Secção transversal da região da axila foliar de *P. fruticulosa*, cabeça de seta indica faixa de células suberificadas, presença de canais de mucilagem na base do perfil. CA = caule; FO = folha; PP = primórdio de perfil; p1 = perfil do primeiro par e p2 = perfil do segundo par.

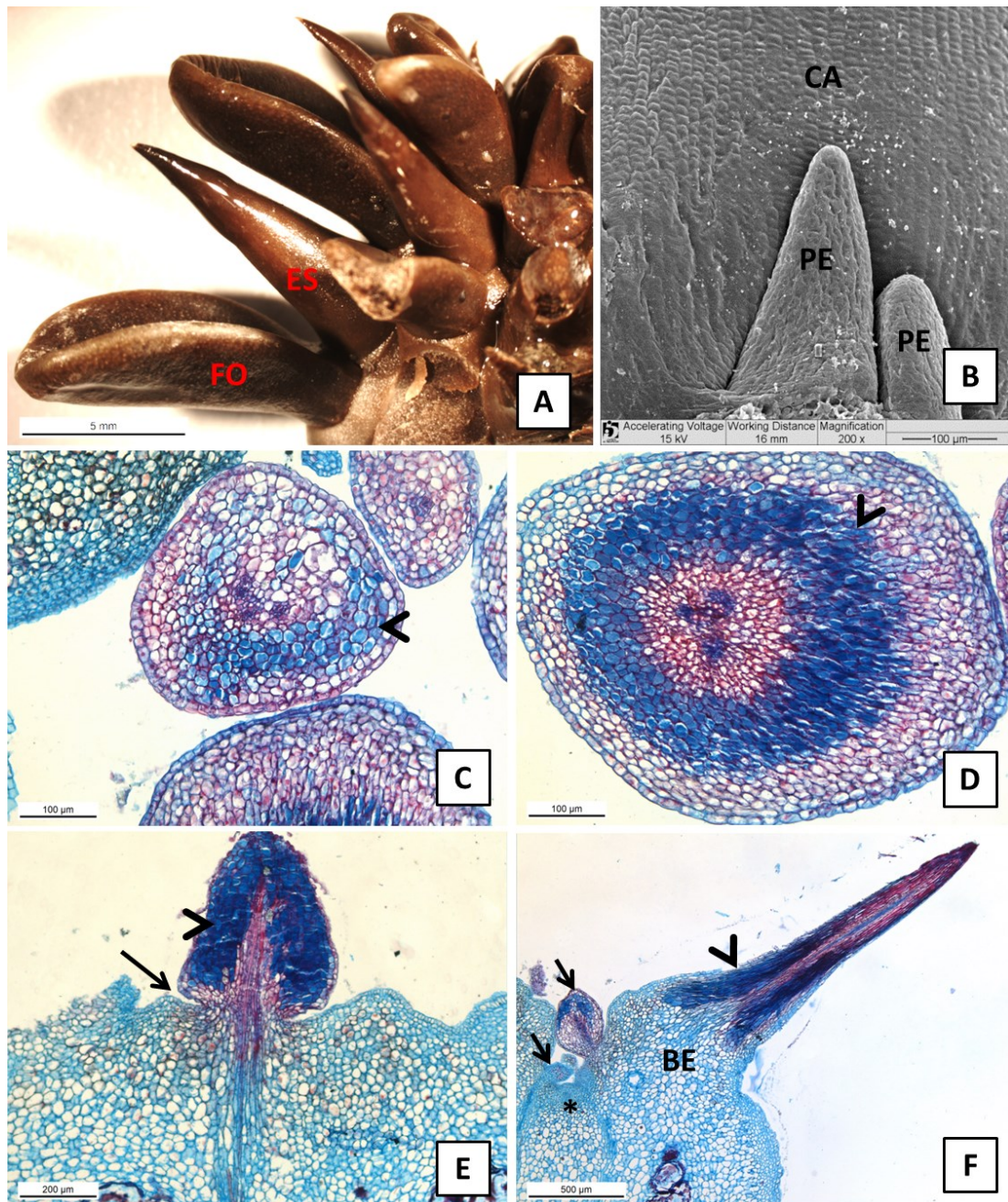


Fig. 8 – A – Ápice do ramo de *A. procera*. B – MEV da região da axila foliar de *A. marneriana*. C, D e E– Secções transversais (C e D) e longitudinal (E) de primórdio de espinho de *D. madagascariensis*, setas indicam constrição na base do primórdio, cabeças de setas indicam região de células com depósitos de tanino, presença de cordões procambiais internos a essa região. F – Secção transversal de região do ápice de braquiblasto de *D. madagascariensis* mostrando espinho jovem, setas indicam primórdios de espinhos, cabeça de setas indicam região de células com tanino e asterisco (*) indica o MAC. BE = base de espinho; CA = caule; ES = espinho; FO = folha e PE = primórdio de espinho.

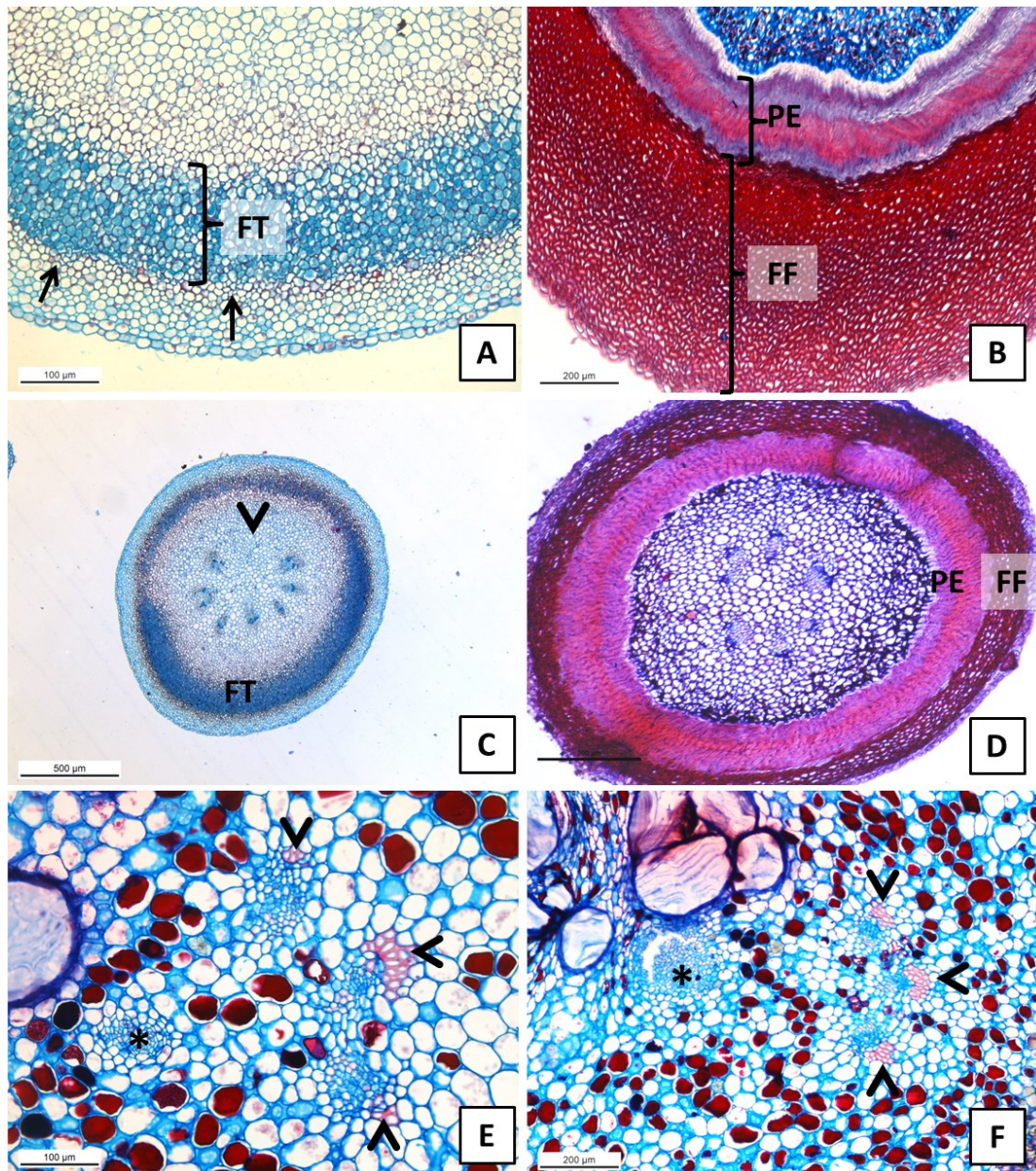


Fig. 9 – Secções transversais de *D. madagascariensis*: A e B – detalhe de espinho jovem e espinho, respectivamente, setas indicam células lignificadas; C e D – espinho jovem e espinho, respectivamente, cabeça de seta indica região de abertura do sistema vascular do lado adaxial do espinho; E e F – série de secções transversais do braquiblasto, mostrando conexão entre traço do espinho (cabeças de setas) e gema em sua axila (asteriscos). FF = faixa de fibras; FT = faixa de células com tanino e PE = periderme.

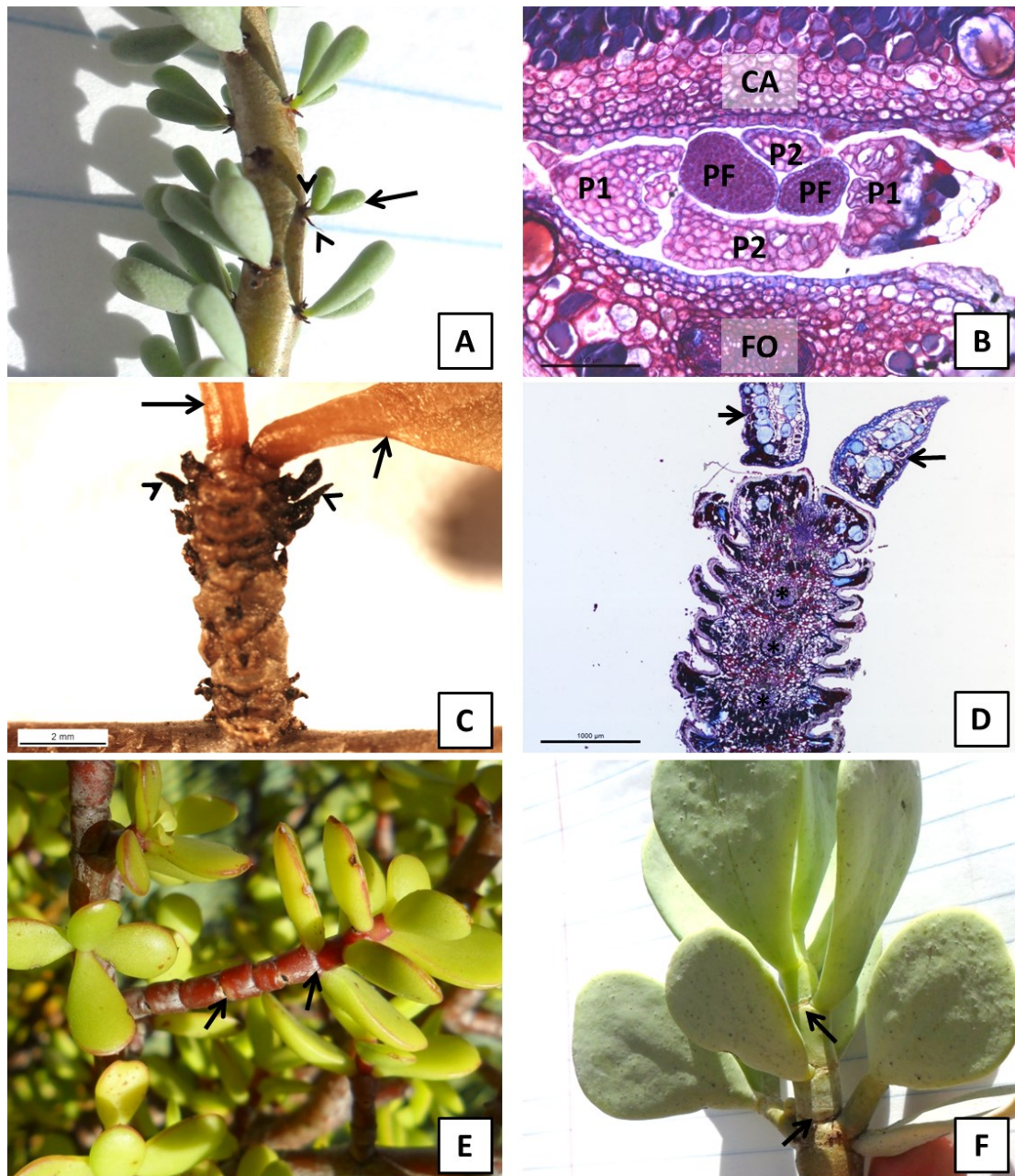


Fig. 10 – A e B – Ramo com braquiblastos em sua extensão e secção transversal da região da axila foliar de *P. namaquensis*, respectivamente, seta indica braquiblasto e cabeças de setas indicam perfis. C e D – Braquiblasto e secção longitudinal de braquiblasto de *P. carissoana*, respectivamente, setas indicam folhas, cabeças de setas indicam perfis e asteriscos indicam sistema vascular das bases das folhas. E – Ramo lateral de *P. afra*, setas indicam constrição na região do nó. F – Ramo lateral de *P. armiana*, setas indicam constrição na região do nó.

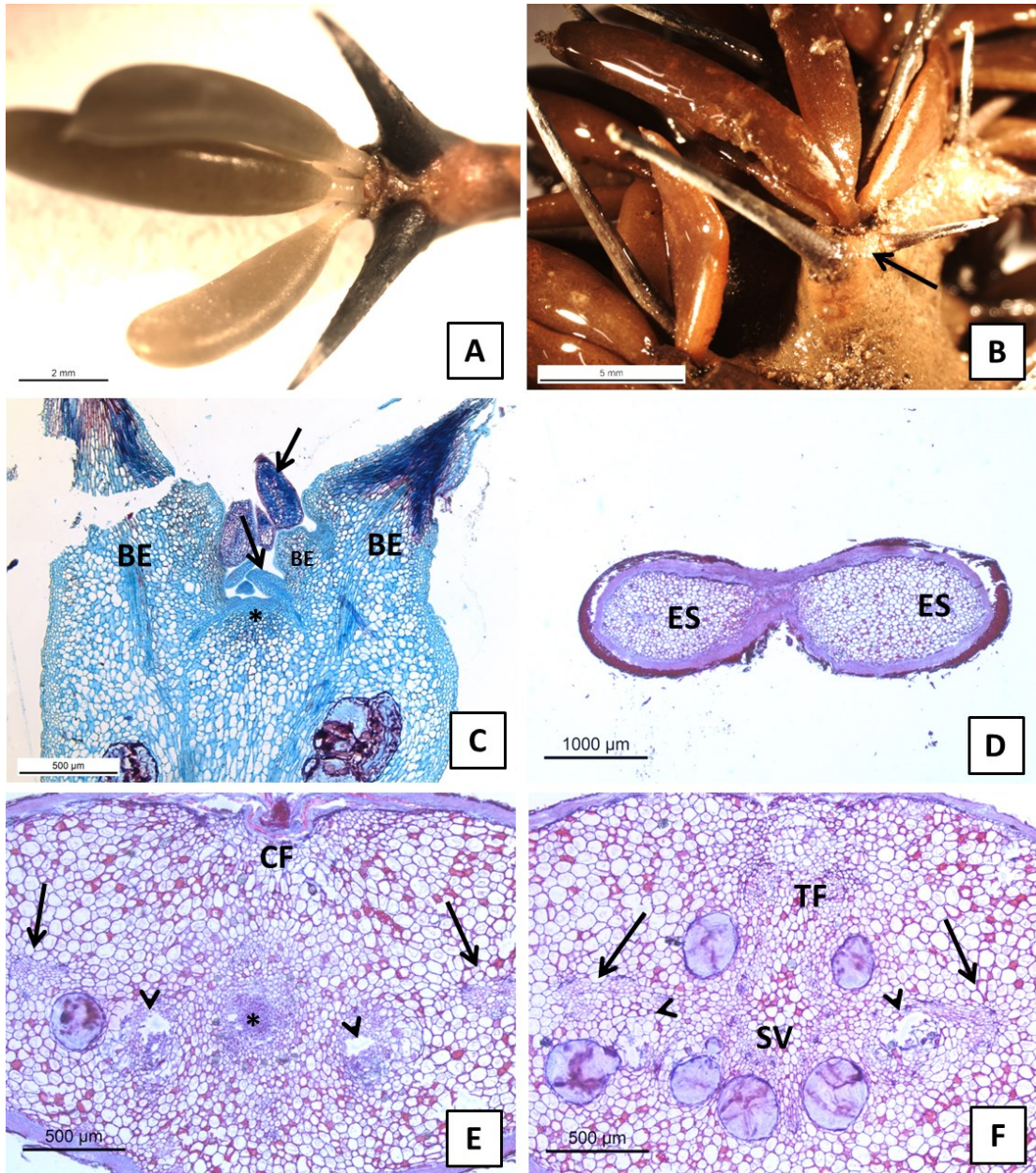


Fig. 11 – A – Braquiblasto de *A. marneriana*. B – Braquiblasto de *D. trollii*, seta indica base do braquiblasto. C – Secção longitudinal do braquiblasto de *D. madagascariensis*, mostrando as bases dos espinhos (BE) envolvendo a região do meristema apical (*). D, E e F – Séries de secções transversais do braquiblasto de *D. madagascariensis*: D - mostrando par de espinhos (ES); E - tecido formado por suas bases envolvendo o meristema apical do braquiblasto (*); traços de espinhos (setas) e as gema axilares dos espinhos (cabeça de setas) e F – conexão entre sistema vascular do braquiblasto (SV), traço dos espinhos (setas) e traço da folha primária (TF). BE = base de espinho; CF = cicatriz de folha primária; ES = espinho; SV = sistema vascular do braquiblasto e TF = traço da folha primária.

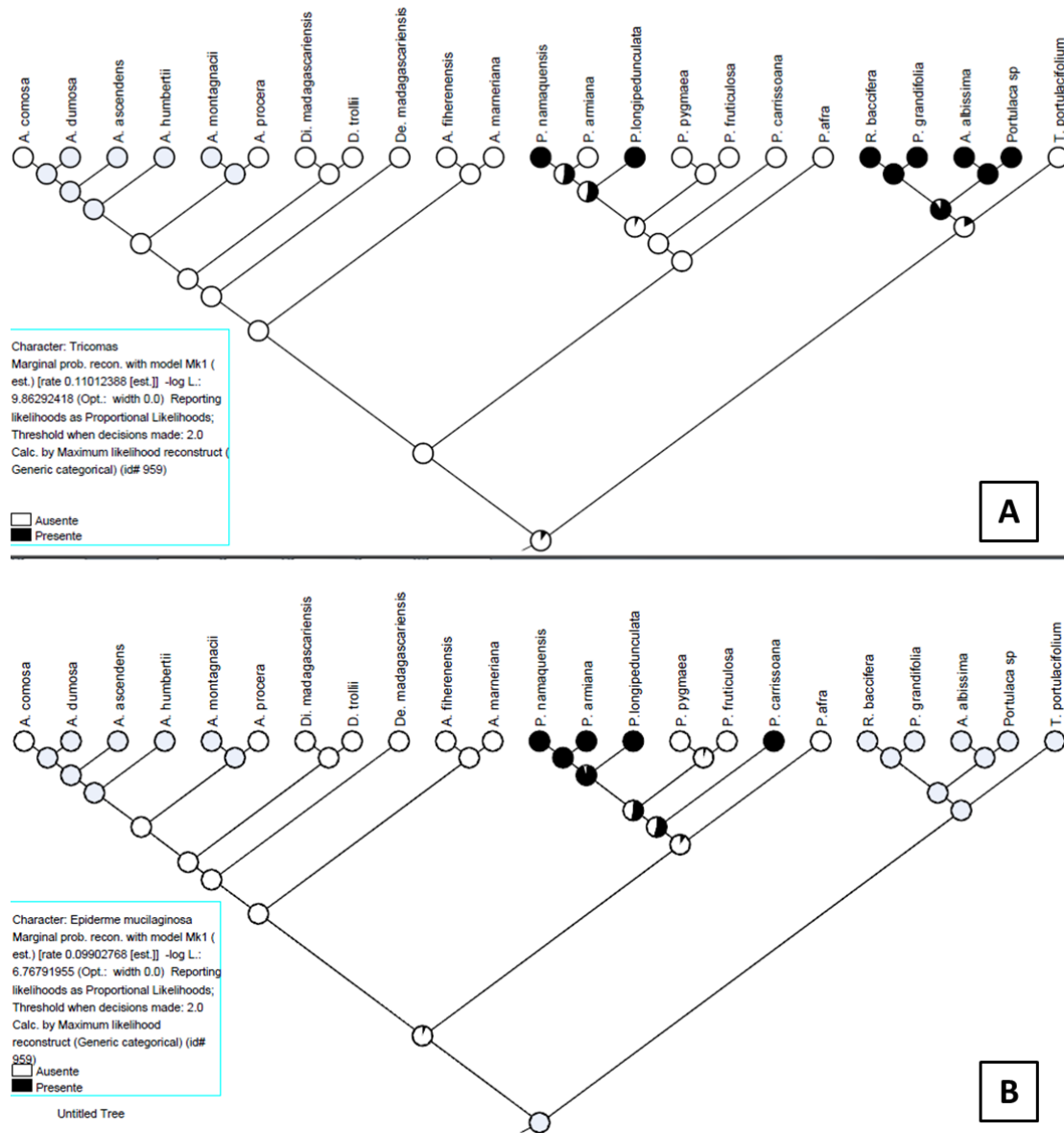


Fig. 12 – Reconstruções do estado de caráter ancestral. A – Caráter tricomas. B – Caráter epiderme da folha mucilaginoso. Estado de caráter representado pela cor branca igual ausência e estado de caráter representado pela cor preta igual presença.



Fig. 13 – Reconstruções do estado de carácter ancestral. A – Carácter morfologia da folha, estados de caracteres representados pelas cores: branco igual morfologia plana, verde igual morfologia subcilíndrica e preto igual morfologia cilíndrica. B – Carácter tipo de folha modificada, estados de caracteres representados pelas cores: branco igual ausente, azul igual perfis, verde igual espinhos vascularizados e preto igual espinhos lignificados.

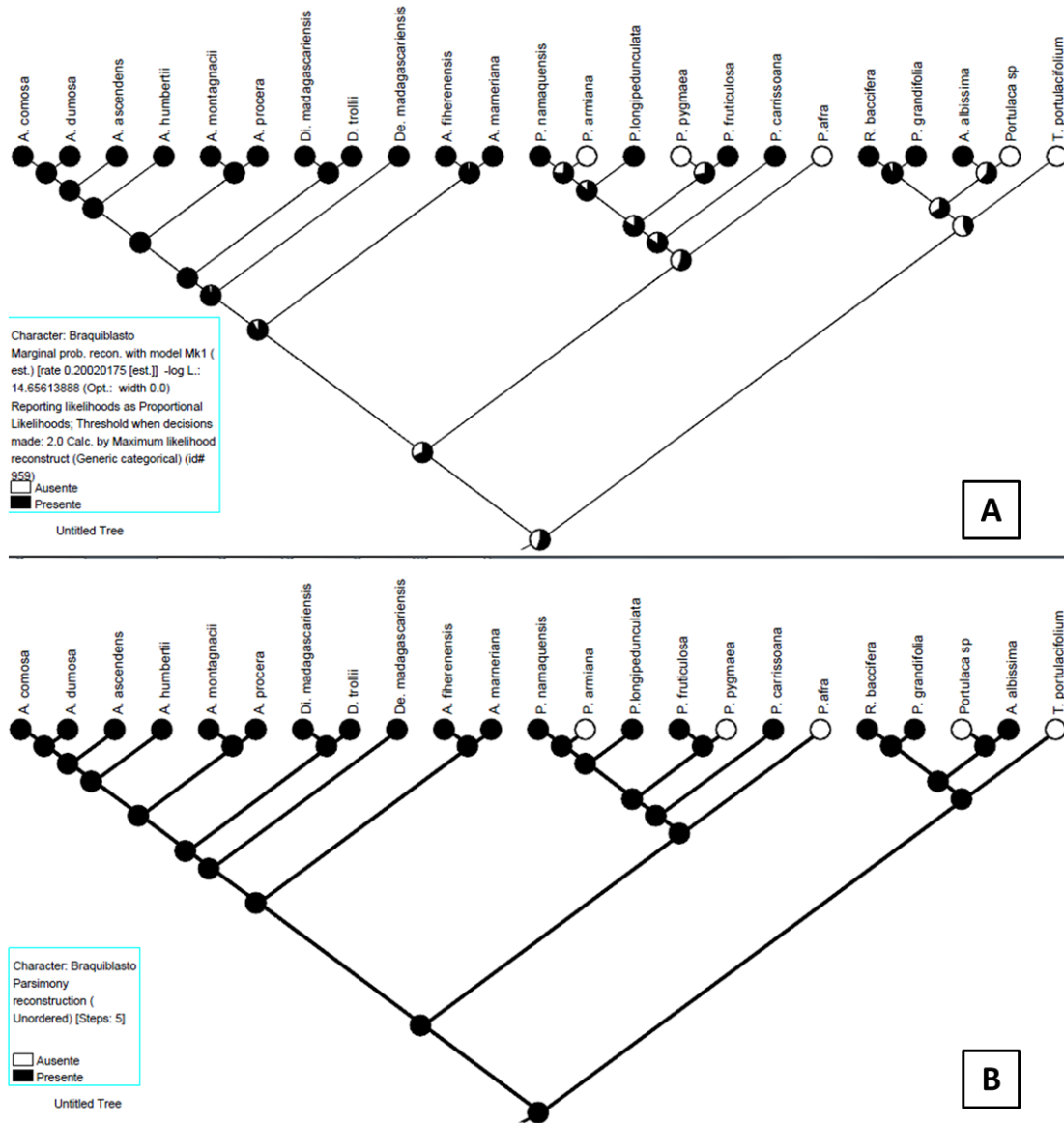


Fig. 14 – Reconstruções do estado de caráter ancestral para o caráter braquiblasto. A - Método de máxima verossimilhança (MV). B – Método de máxima parcimônia (MP). Estados de caráter representado pela cor branca igual ausente e pela cor preta igual presente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta inicial deste trabalho foi reconstruir a região da axila foliar para o ancestral de Didiereaceae e, a partir disso, entender a evolução dos caracteres que compõe essa região dentro da família e corroborar as propostas filogenéticas para essa dentro de Portulacineae. Contudo, as análises filogenéticas, baseadas em dados moleculares, trouxeram importantes informações a cerca das relações internas de Didiereaceae e da circunscrição de seus gêneros, diante disso, decidimos desenvolver o trabalho em dois capítulos. No primeiro capítulo foi apresentada e discutida uma proposta filogenética para Didiereaceae e no segundo capítulo foi feita a reconstrução do ancestral da família para diversos caracteres, baseados na proposta filogenética e nos resultados obtidos a partir das análises filogenéticas. Os capítulos foram escritos na forma de manuscritos e serão submetidos à publicação.

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

Capítulo 1: Phylogenetic Relationships in Didiereaceae from Chloroplast DNA Sequences.

Os resultados desse capítulo trouxeram importantes informações a cerca das relações internas de Didiereaceae. A proposta de circunscrição expandida da família e sua divisão em três subfamílias foi corroborada, apresentando altos valores estatísticos, e foram resolvidas relações antes não esclarecidas entre os gêneros dessas subfamílias, apresentando valores estáticos consideráveis. Inclusive, sendo proposta uma nova classificação para o gênero *Portulacaria*.

Contudo, a busca por características reprodutivas para corroborar essa proposta filogenética não apresentou grandes resultados, a família se demonstrou muito conservada para essas características. As discussões sobre a origem

biogeográfica das espécies apresentou resultados mais interessantes, porém, nossa pesquisa não foi aprofundada bastante para que afirmações a esse respeito fossem assumidas de maneira categórica. Deixando assim, o indício de que o estudo da origem biogeográfica e a distribuição das espécies de Didiereaceae podem ajudar a corroborar nossa proposta filogenética.

Capítulo 2: Ontogênese foliar e da Região Axilar em Portulacarioideae e Didieroideae: a História de um Caráter e Suas Implicações Dentro de Portulacineae.

Foram feitos importantes registros e inéditos sobre o desenvolvimento de folhas, espinhos, perfis e braquiblastos de Didiereaceae, além de terem sido levantados algumas características anatômicas relacionadas ao hábito xerofítico. Os resultados foram informativos e a análises de reconstrução dos estados de caracteres ancestrais para Didiereaceae foram realizadas.

Contudo, nossa discussão a cerca desses resultados em Portulacineae se baseou em uma das propostas de relação filogenética para Didiereaceae na subordem. A proposta de Didiereaceae como grupo-irmão do clado ACPT parece ser a mais corroborada pelos dados morfo-anatômicos em trabalhos anteriores. Nosso trabalho também apontou grande semelhança entre os processos de ontogênese da folha e da região de sua axila para Didiereaceae e ACPT. Porém, vale ressaltar que existem outras propostas, baseadas em dados moleculares, de posicionamento de Didiereaceae em Portulacineae e poucos (ou nenhum) dados para o desenvolvimento desses órgãos nas outras famílias da subordem que não fazem parte de ACPT. Sendo que, o estudo desses processos nas famílias Basellaceae e Montiaceae, pode corroborar a proposta de Didiereaceae como grupo-irmão de ACPT ou trazer novas informações importantes para essa discussão.

Capa: Secção longitudinal do meristema apical do braquiblasto e primórdios de espinhos de *Di. madagascariensis*.