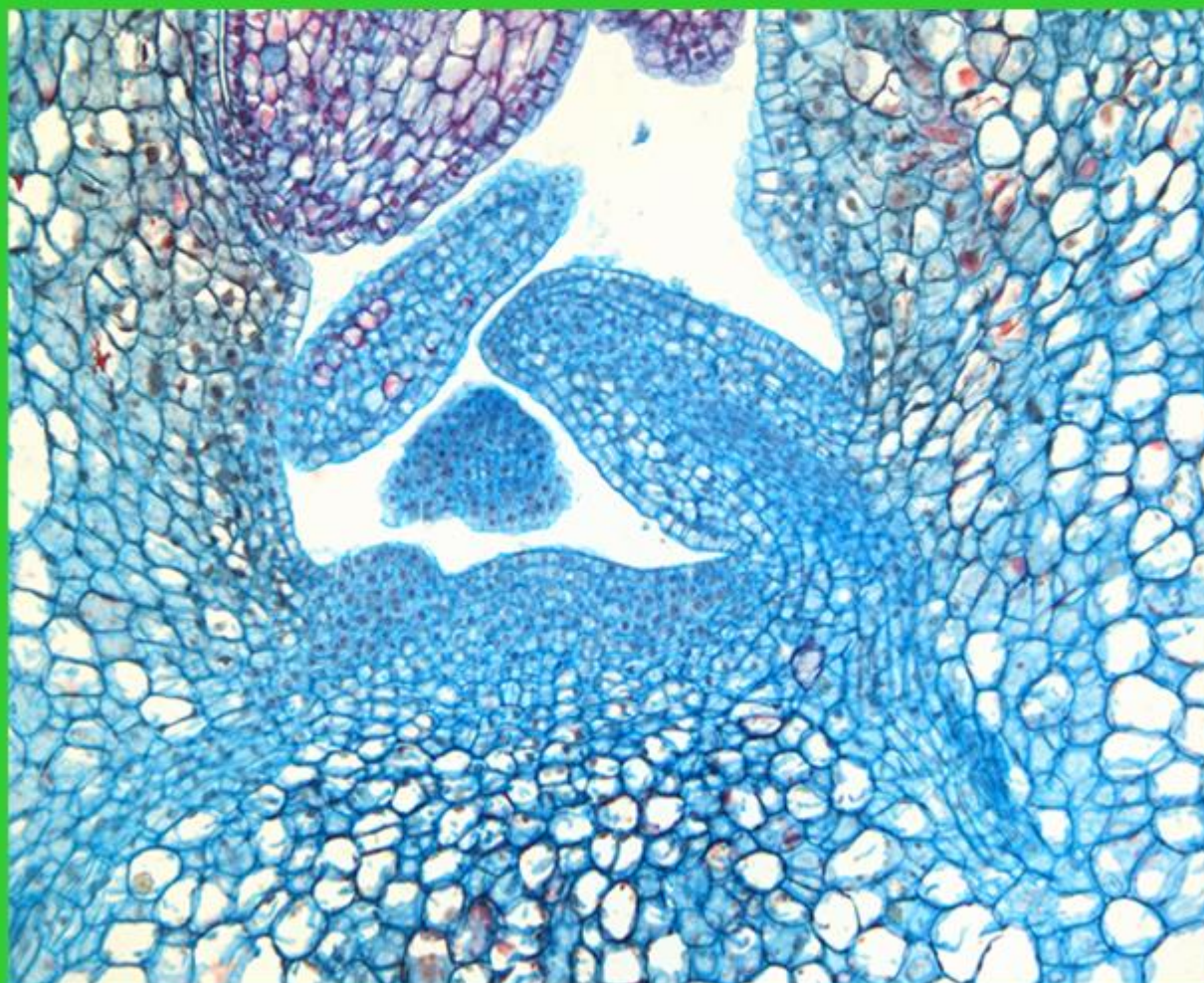


Mario Albino de Oliveira Neto

**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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
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<sup>a</sup>. 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<sup>a</sup>. Nanuza Luiza de Meneses**, **Prof. Diego Demarco** e **Prof<sup>a</sup>. 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<sup>a</sup>. Nanuza Luiza de Meneses**, **Prof. Gregório Ceccantini**, **Prof<sup>a</sup>. Veronica Angyalossy**, **Prof<sup>a</sup>. 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<sup>a</sup>. Gladys Flávia Melo de Pinna**, **Prof. Marcelo Dornelas**, **Dr. Gilberto Ocampo**, **Prof. Ricardo Ribeiro Rodrigues**, **Prof. Vinicius Castro Souza**, **Dr<sup>a</sup>. 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 *Calypthrotheca* em Didiereaceae e essa dividida em três subfamílias: Didieroideae (11 espécies), Portulacarioideae (7 espécies) e Calypthrothecoideae (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<sup>UUG</sup>-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<sup>UUG</sup>-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

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



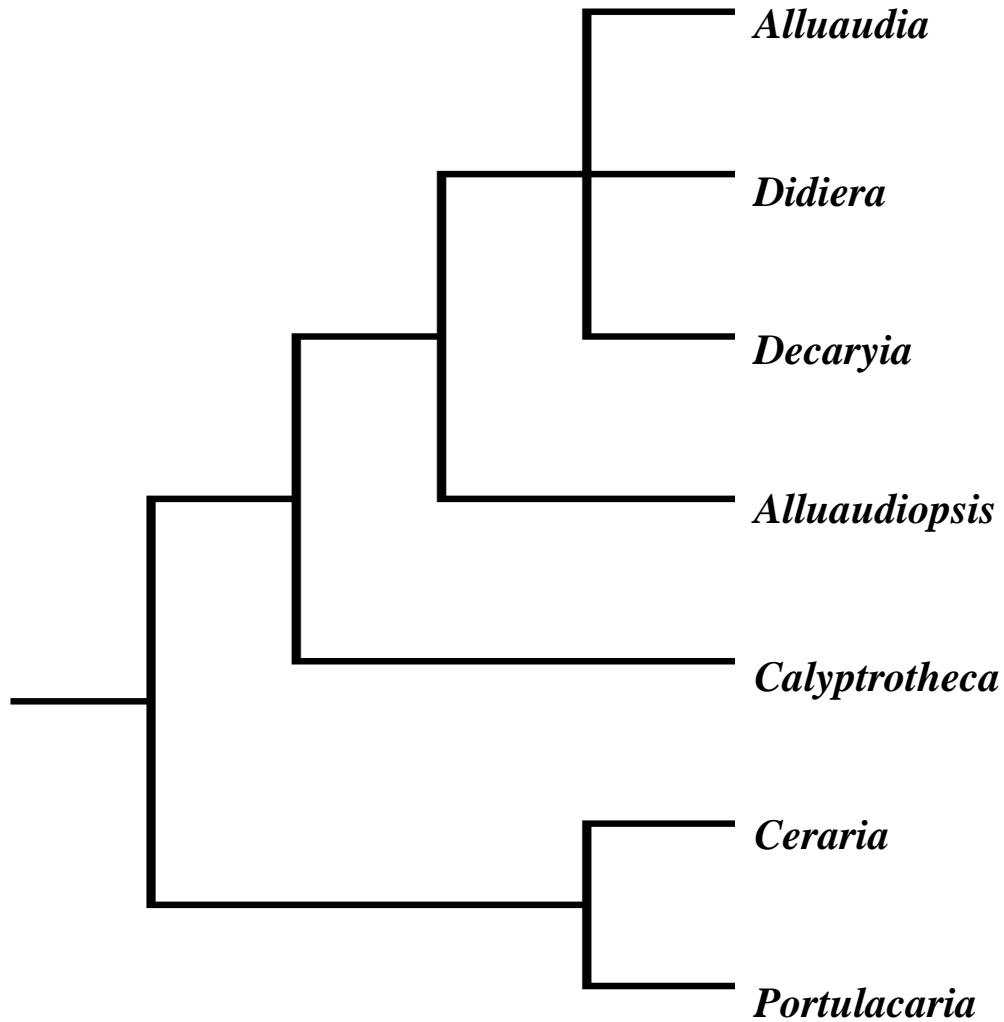


Fig. 1: Cladograma mostrando a relação filogenética entre gêneros de Didiereaceae. Baseado em filogenia proposta por Applequist & Wallace (2000).

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 & Eggli, 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 & Eggli (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.

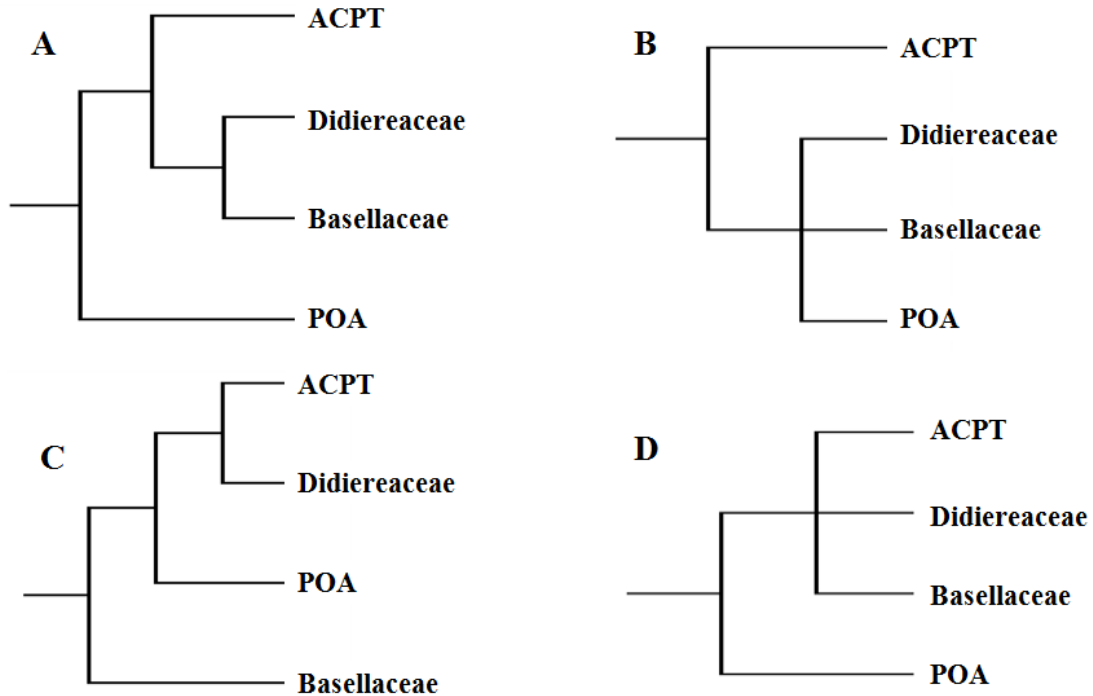


Fig. 2: Hipóteses de relações filogenéticas entre alguns representantes da subordem Portulacineae. POA representa os gêneros antes pertencentes à família Portulacaceae endêmicos da região oeste da América. A: Hershkovitz (1993), baseado em modelo cladístico de dados morfo-anatômicos. B: Applequist & 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 perfis 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 perfis em representantes de Talinaceae (Nyffeler, 2007; Ogburn & Edwards, 2009; Nyffeler & Eggli, 2010). Perfis 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 perfis 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, n° 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. & 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.



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-Neto<sup>1</sup>, Cornelia Klak<sup>2</sup>, Gladys Flavia Melo-de-Pinna<sup>1</sup> & Peter Bruyns<sup>2</sup>

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<sup>UUG</sup>-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<sup>UUG</sup>-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 & Eggli, 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 & Eggli, 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/](http://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<sup>UUG</sup>-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<sup>UG</sup>-rps16* intergenic spacer was amplified with the primers *trnQ<sup>UG</sup>* 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 NH<sub>4</sub> buffer and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 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.

#### 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 Centropesmae: 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.nrbcs.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. & 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.

- 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.



## 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-Neto<sup>1</sup> & Gladys Flavia Melo-de-Pinna<sup>1</sup>

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.*, *Alluandia*, *Alluandiopsis*, *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*, *Amhipetalum*), 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 (Appelquist & 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; Appelquist & 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).

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.

## 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**, n° 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. & 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.
- 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.

## 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*.