

Aline Siqueira Nunes

Desenvolvimento foliar em
Ruschioideae (Aizoaceae),
com ênfase na formação e estrutura dos
feixes vasculares periféricos.

Leaf development in Ruschioideae (Aizoaceae), with emphasis
in the formation and structure of peripheral vascular bundles.

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
2013

Ficha Catalográfica

NUNES, ALINE SIQUEIRA

2013

**DESENVOLVIMENTO FOLIAR EM
RUSCHIOIDEAE (AIZOACEAE),
COM ÊNFASE NA FORMAÇÃO E ESTRUTURA
DOS FEIXES VASCULARES PERIFÉRICOS.**

109 páginas

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

1. Folha 2. Anatomia 3. Aizoaceae
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.



AGRADECIMENTOS

Ao **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo** e ao **Laboratório de Anatomia Vegetal**, não apenas por fornecerem a estrutura que possibilitou o meu trabalho e formação, mas também a todas as pessoas que me proporcionaram dois anos de ótima convivência e muita satisfação. 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 minha professora querida **Gladys Flávia de Albuquerque Melo de Pinna**, pela orientação e amizade, e por confiar a mim o estudo de suas preciosas Aizoaceae. Pelo apoio e interesse infinito durante a minha pesquisa. Pelo carinho. Por sua atenção e paciência. Pelo entusiasmo em cada vez que discutimos nossos resultados.

Aos técnicos **Gisele Costa, Tássia Cristina dos Santos e Irwandro Pires**, por sua diligência e boa vontade para auxiliarem sempre que precisei.

À **Prof^a. Sara Beatriz Maldonado** e à **Dra. Maria Paula Fernandez**, do Laboratorio de Biología del Desarrollo de Plantas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad de Buenos Aires), pelos ensinamentos durante meu estágio, pelo carinho e amizade.

Ao colega **Mário Albino Neto** por trazer para mim algumas Aizoaceae de sua viagem para a África do Sul.

À colega **Débora Coelho Leite**, do Laboratório de Fisiologia Ecológica (Lafieco), pela ajuda nos experimentos de imunolocalização, e ao **Prof. Marcos Buckeridge**, por permitir o uso do laboratório.

A **Prof^a. Nanuza Luiza de Meneses, Prof. Diego Demarco e Dra. Mariane Silveira Sousa-Baena**, pelas sugestões dadas na qualidade de membros da banca no meu exame de qualificação.

Aos professores que ministraram as disciplinas de pós-graduação que cursei, **Prof. Marcos Buckeridge, Dra. Berta Lange de Morretes, Prof^a. Gladys Flávia Melo de Pinna, Prof. Marcelo Dornelas e Prof^a. Nanuza Luiza de Meneses**, pela contribuição na minha formação.

Aos meus queridos **Ariane Lazarini, Fernanda Cordeiro, Gisele Costa, José Hernandez, Juliana Castelo Branco, Keyla Rodrigues, Lígia Keiko, Luiza Teixeira, Marília Duarte, Maria Cristina Zampieri, Mario Albino, Paula Elbl, Rafael Cruz, Renata Lemos, Sarah Soares, Tássia Cristina dos Santos, Thalia Gama**, pela companhia diária e nas viagens; pelas conversas sérias e risadas; por estarem comigo no almoço e na hora do cafezinho, tornando meus dias ainda mais prazerosos.

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

À Prof. **Eny Floh** pela utilização do fotomicroscópio e à Amanda Macedo por me ajudar a usá-lo.

Ao **Prof. Diego Demarco** por sua solicitude e pelos ensinamentos sobre técnicas de Anatomia Vegetal.

Ao **Rafael Cruz** por me ajudar a aumentar a resolução das figuras da dissertação

Aos meus maravilhosos irmãos, **Paulo de Barros Nunes Júnior** e **Renan Lyuiti Siqueira Kubo**, por aceitarem a falta de sua irmã mais velha no seu dia-dia, e pelos beijos, abraços e sorrisos tão preciosos a cada tarde de domingo em que nos encontramos. Por serem os companheiros de minha mãe durante minha ausência.

Ao meu querido **Anderson Tetsuo Ogura**, pelo amor e compreensão, e por todas as vezes que me ajudou em minhas idas e vindas de vida acadêmica.

À minha adorada mãe, **Rosemary Neumann Siqueira**, pelo amor; pelo esforço em prover minha educação; pelo apoio incondicional; e por, mesmo distante, ser meu farol em dias de mares difíceis, dedico este trabalho.

Muito obrigada a todos!!!

RESUMO

Popularmente conhecidas como *flowering stones* ou *ice plants*, as plantas da família Aizoaceae (Caryophyllales) caracterizam-se por suas folhas suculentas morfologicamente diversas. Com centro de origem no sul da África, a maior parte das espécies pertence a subfamília Ruschioideae, com plantas de folhas dorsiventrais, cilíndricas e trígona, sendo marcante a ocorrência de conação entre as bases de folhas opostas, e a presença de feixes vasculares periféricos, com xilema endoscópico. Nosso estudo mostra que a formação dos feixes vasculares periféricos é posterior ao estabelecimento da blastozona marginal, e que tecidos da face abaxial diferenciam-se no domínio adaxial da folha durante a histogênese da lâmina. Sugerimos que um mecanismo de abaxialização foliar esteja vinculado à formação da margem foliar de Aizoaceae. O xilema dos feixes vasculares periféricos é formado *wide band tracheids* – “wbts”, um tipo especializado de elemento traqueal com acentuado espessamento da parede secundária. “Wbts” vinculam-se a órgãos suculentos e ocorrem somente em Aizoaceae, Anacampserotaceae e Cactaceae, tendo despertado interesse dos pesquisadores quanto à sua origem e função. A partir de análises comparativas de anatomia, ultraestrutura e de imunomarcagem de pectina, concluímos que a definição de “wbts” deve ser mantida nas famílias, no entanto, destacamos a possível ocorrência de idioblastos traqueoidais na região de medular de algumas espécies. Este trabalho contribui no conhecimento da anatomia e ontogênese foliar de Aizoaceae, abrindo oportunidades de estudos sobre os mecanismos envolvidos no estabelecimento da dorsiventralidade em folhas de simetria radial. A análise comparativa de *wide-band tracheids* “wbts” em Aizoaceae, Anacampserotaceae e Cactaceae traz contribuições ao conhecimento sobre sua distribuição e características nos diferentes órgãos.

Palavras-chave: ontogênese foliar, anatomia foliar, abaxialização, ultraestrutura, Caryophyllales

ABSTRACT

Popularly known as flowering stones or ice plants, the species of Aizoaceae (Caryophyllales) are characterized by morphologically diverse succulent leaves. With center of origin in Southern Africa, most species are classified in the subfamily Ruschioideae, which present dorsiventral, cylindrical and three-angled leaved plants, being remarkable the occurrence of conation between the bases of opposite leaves, and the presence of peripheral vascular bundles with endoscopyc xylem. Our study shows that the formation of peripheral vascular bundles occurs after the marginal blastozone establishment, and abaxial tissues differentiate in the adaxial domain of the leaf, during blade histogenesis. We suggest that an abaxialization mechanism is involved in the formation of leaf margins in Aizoaceae. The xylem of peripheral vascular bundles is composed by wide band tracheids - wbt, a specialized type of cell that occurs only in Aizoaceae, Cactaceae Anacampserotaceae. The origin and function of this cell type has been the subject of study by some researchers. By means of comparative analysis of anatomy, ultrastructure and pectin immunolabeling, we conclude that the definition of "wbt" should be kept in the three families; however, we highlight the possibility of idioblasts tracheids in the some cases. This work contributes to the knowledge of leaf anatomy and ontogenesis in Aizoaceae, opening opportunities for studies on the mechanisms involved in the establishment of dorsiventrality in leaves with radial symmetry. A comparative analysis of wbt in Aizoaceae, Cactaceae Anacampserotaceae brings contributions to knowledge about their distribution and characteristics in different organs.

Keywords: leaf ontogenesis, leaf anatomy, abaxialization, ultrastructure, Caryophyllales

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	17
CAPÍTULO 1. Ontogênese foliar em Ruschioideae (Aizoaceae)	37
Introdução	39
Material e métodos	42
Resultados	44
Discussão	52
Referências	60
Figuras	67
CAPÍTULO 2. <i>Wide-band tracheids</i> em Caryophyllales: uma abordagem comparativa sob aspectos morfológicos, ultraestruturais e moleculares da parede celular	77
Introdução	78
Material e métodos	80
Resultados	82
Discussão	87
Referências	92
Figuras	97
CONSIDERAÇÕES FINAIS	106

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

A capacidade de desenvolver uma lâmina foliar ampla, achatada e dorsiventral, como ocorre na maioria das angiospermas, foi um evento chave na evolução das plantas (Gifford & Foster 1989, Nicotra *et al.* 2011). A condição dorsiventral aprimorou a captação de luminosidade e trocas gasosas, demandados à realização da fotossíntese, função centralizada nas folhas (Eames & McDaniels 1947). Entretanto, algumas espécies dispõem de modificações extraordinárias na morfologia foliar, como folhas cilíndricas e unifaciais, ou em sua função, como as folhas portadoras de reserva, gavinhas e espinhos, dependendo da estratégia adotada frente às condições ambientais vigentes durante a evolução. Algumas famílias botânicas apresentam pouca variação na morfologia foliar, sendo este um estado de caráter usual em sua identificação; em outras famílias há grande variedade morfológica entre as espécies, mesmo dentro de um único gênero, como ocorre na família Aizoaceae (Caryophyllales).

Neste trabalho, estudamos uma família de plantas com folhas suculentas altamente adaptadas ao ambiente em que vivem. Tal adaptação implica em uma morfologia muito diversa e, ao mesmo tempo, particular de suas folhas, refletindo em inovações em todo o corpo vegetal. Considerando que o desenvolvimento foliar envolve regiões de crescimento comuns a todas as folhas, nosso objetivo foi estudar a ontogênese foliar em representantes dessa família de folhas morfológicamente tão diversas, buscando um maior entendimento da formação de sua arquitetura, à luz do que se conhece sobre ontogênese foliar em outros grupos.

A seguir, na introdução geral, apresenta-se a família Aizoaceae, abordando um pouco de sua classificação e ecologia, e as características morfoanatômicas foliares da subfamília Ruschioideae, principal objeto do presente estudo. Um segundo

tópico tratará da morfogênese de folhas em angiospermas. Por fim será abordada a ocorrência de um tipo especial de traqueíde, encontrada nas folhas de Aizoaceae.

A família Aizoaceae

Pertencente às Caryophyllales suculentas, Aizoaceae tem como principal centro de distribuição e diversificação o sul da África (Ihlenfeldt 1994, Klak *et al.* 2004, Burke 2005). A classificação da família Aizoaceae é tradicionalmente baseada em caracteres morfológicos de estruturas reprodutivas e na presença de células epidérmicas especiais (*bladder cells*) nas folhas (Bittrich & Hartmann 1988, Hartmann 1993, 1998, 2001a, 2001b, Chesselet *et al.* 2002).

Segundo Bittrich & Hartmann (1988), as espécies da família classificam-se em cinco subfamílias: Aizooideae, Tetragonioideae, Sesuvioideae, Mesembryanthemoideae e Ruschioideae. Essa disposição, baseada em dados morfológicos, foi adotada por diversos autores (Hartmann 1993, Ihlenfeldt 1994, Hartmann 1998, 2001a, 2001b, Chesselet *et al.* 2002), embora, atualmente, Aizoaceae apresente-se dividida em apenas quatro subfamílias: Aizoideae, Sesuvioideae, Mesembryanthemoideae e Ruschioideae, concentrando nesta última o maior número de espécies e a sua maior diversidade morfológica (Klak *et al.* 2003). Com base em dados moleculares, Klak *et al.* (2003), afirma que a quinta subfamília, Tetragonioideae, é polifilética com *Tribulocarpus* pertencente à subfamília Sesuvioideae e *Tetragonia*, à Aizooideae. Mesembryanthemoideae e Ruschioideae formam um grupo monofilético, sendo representadas por um elevado número de espécies suculentas.

Em Ruschioideae, os membros de Apatesiae apresentam mais caracteres plesiomórficos dentre as tribos, como a presença de folhas dorsiventrals achatadas e com lâmina lateralmente expandida e menor grau de suculência (Klak *et al.* 2003). As

outras duas tribos, Dorotheanthae e Ruschieae são morfológicamente mais diversas, incluindo desde folhas dorsiventrais pouco suculentas, como em Apatesiae, até folhas cilíndricas bastante reduzidas, indicando um aumento gradativo de suculência e redução da lâmina foliar no grupo (Klak *et al.* 2003). Dentre as três tribos, Ruschieae é a mais heterogênea, com impressionante variação na morfologia foliar (Klak *et al.* 2003).

Muitas das espécies da família Aizoaceae são endêmicas do Succulent karoo, bioma de clima árido que se estende por territórios da Namíbia e sudoeste da África do Sul (Klak *et al.* 2003, Ihlenfeldt 1994, Cowling *et al.* 1999). Considera-se o Succulent karoo como sendo o bioma árido de maior diversidade vegetal do mundo, sendo classificado *hotspot* de biodiversidade (Conservation International). Diversas hipóteses têm sido elaboradas para explicar a tamanha diversidade e endemismo na região do bioma. As principais referem-se ao clima, singular e favorável ao crescimento de plantas suculentas, por ser relativamente úmido, com distribuição de chuvas sazonal e concentrada no inverno (Cowling *et al.* 1999, Desmet & Cowling 1999).

Além das características climáticas da região, destaca-se também a heterogeneidade na composição do solo ao longo do bioma (Ellis & Weis 2006) que, somada ao clima, teria proporcionado microclimas distintos e favoráveis ao desenvolvimento e especiação da vegetação (Ihlenfeldt 1994, Schmiedel & Jürgens 1999).

Morfologia foliar em Ruschioideae:

As espécies da família Aizoaceae são conhecidas popularmente como *ice plants*, em referência às suas folhas suculentas e de morfologia muito peculiar, que atraem a atenção de colecionadores e admiradores em todo o mundo (Smith *et al.*

1998). Diversas espécies de Ruschioideae apresentam folhas suculentas reduzidas que, em alguns casos, muito se assemelham a componentes do substrato, sendo tais plantas conhecidas como *flowering stones* (Smith *et al.* 1998). Os pares de folhas opostas, na maior parte dessas plantas, apresentam suas bases fundidas entre si, formando uma estrutura cilíndrica conhecida como “corpo”, e podem ocorrer únicos ou em pequenos grupos, tendo formas e cores muito variáveis de acordo com a espécie (Smith *et al.* 1998). A maioria das espécies tem folhas equifaciais (Kaplan 2001) frequentemente translúcidas devido ao prolongamento do parênquima aquífero central até a epiderme no ápice da folha. Tal estrutura, denominada *window leaf* apresenta-se em formas variavelmente adornadas, (Metcalf & Chalk 1974, Smith *et al.* 1998) e configura uma estratégia de plantas que sobrevivem com a maior parte do seu corpo encoberta pelo substrato, tendo “janelas” para permitir a passagem da luz necessária à fotossíntese (Kaplan 2001).

Entre as Ruschioideae ocorrem arbustos e semi-arbustos, ou geófitas com constituição notavelmente reduzida, e.g. *Oophytum* N.E.Br., *Conophytum* N.E.Br. e *Diplosoma* Schwantes (Ihlenfeldt 1994, Smith *et al.* 1998). São observadas folhas dorsiventrais com pecíolo e lâmina morfológicamente distintos, como em *Aethephyllum* e *Cleretum*, e outras formas especializadas com lâmina foliar bastante reduzida, como as folhas cilíndricas em *Fenestraria* N.E.Br. e *Frithia* N.E.Br. (Ruschioideae), ou, ainda, pequenas folhas unidas que ocorrem sempre aos pares como em *Lithops* N.E.Br. e *Conophytum* (Ruschioideae) (Herre 1971, Smith 1998).

Poucas espécies da família Aizoaceae apresentam folhas dorsiventrais, com lâmina foliar expandida lateralmente; a grande maioria tem folhas trígonas, com formato triangular quando seccionadas transversalmente, e algumas espécies apresentam folhas cilíndricas (Smith *et al.* 1998). A maior parte das espécies de

Ruschioideae, e grande parte das Mesembryanthemoideae, têm filotaxia oposta e bases foliares conadas, de modo que cada par de folhas forma uma estrutura única, circundando o caule (Smith *et al.* 1998).

A partir de observações da morfologia foliar em diferentes espécies de Aizoaceae, incluindo representantes das quatro subfamílias reconhecidas (*sensu* Klak, 2003) Melo-de-Pinna *et al.* (sob revisão) sugerem uma classificação composta por quatro padrões distintos: 1) folhas com morfologia dorsiventral ou semi-teretes (semi-cilíndricas) em seção transversal; sem dilatação do pecíolo ou base foliar conada. 2) folha com simetria dorsiventral, com pecíolo dilatado e bases foliares conadas; 3) folhas semi-teretes sem pecíolo morfologicamente distinto, com bases foliares conadas quando a filotaxia oposta e na forma de bainha em folhas alternas; 4) folhas reduzidas e completamente conadas, sem uma região de lâmina livre. Dada a sua representatividade, a subfamília Ruschioideae inclui espécies dos quatro padrões estabelecidos por Melo-de-Pinna *et al.* (sob revisão).

Dentre as três tribos atualmente reconhecidas para a subfamília Ruschioideae (Apatesiae, Dorontheantheae e Ruschieae), Ruschieae é a que apresenta a maior diversidade, com ampla variação na morfologia foliar (Klak *et al.* 2003), representando três dos quatro padrões sugeridos por Melo-de-Pinna *et. al* (sob revisão). Segundo Ihlenfeldt (1994), o grupo tem sido capaz de desenvolver uma espantosa diversidade de formas e estratégias de vida, sendo essa a base para o seu estabelecimento em um bioma que, frequentemente, apresenta períodos inóspitos. A explosão de diversidade dentro da subfamília Ruschioideae pode ter sido um episódio recente na evolução do grupo (Ihlenfeldt 1994, Klak *et al.* 2003, 2004). Segundo Illing *et al.* (2009), a duplicação de genes responsáveis por regular o desenvolvimento foliar e, principalmente, pelo estabelecimento da identidade ada-abaxial das folhas

observada em Mesembryanthemoideae e Ruschioideae, pode ter sido responsável pela grande diversidade de formas observada nas “Mesembryanthemaceae”.

A principal fonte de informações sobre anatomia de Aizoaceae é a literatura clássica de Metcalfe & Chalk (1974), na qual os autores descrevem em diversos gêneros as células epidérmicas e a suculência das folhas, com referência às *window leaves*. Anatomicamente, as folhas de Aizoaceae apresentam parênquima clorofiliano margeando o parênquima armazenador, cujo centro é ocupado pela nervura mediana da folha, arranjo frequente em estruturas suculentas (Metcalfe & Chalk 1974, Fahn & Cutler 1992, Kaplan 2001). O diferencial observado em Aizoaceae reside na ocorrência de pequenos feixes vasculares periféricos, dispostos entre os tecidos clorofiliano e armazenador nos quais o xilema é endoscópico, i.e., sempre direcionado para o centro da folha, com floema voltado para a superfície externa Melo-de-Pinna *et al.* (sob revisão). Conforme apontam as autoras, a posição interna do xilema nos feixes periféricos localizados na região adaxial das folhas de Aizoaceae contraria a polaridade habitual de tecidos vasculares, uma vez que nas folhas o xilema normalmente dispõe-se adaxialmente ao floema (Eames & McDaniels, 1947; Esau 1977, Evert 2006).

A nervura principal das folhas (e as secundárias, quando presentes) apresenta xilema e floema com polaridade convencional, sendo a condição de xilema endoscópico observada apenas nos feixes vasculares periféricos, localizados na margem da folha, e exclusiva das subfamílias Mesembryanthemoideae e Ruschioideae (Melo-de-Pinna *et al.*, sob revisão). Aparentemente, células típicas da face abaxial se diferenciam no domínio adaxial da folha e esta particularidade anatômica nos motivou a realizar um estudo de desenvolvimento foliar, no qual buscamos possíveis evidências sobre a origem desses feixes periféricos.

Ontogênese foliar

A folha é o órgão vegetal mais variável, morfológica e anatomicamente (Eames & McDaniels 1947, Fahn 1974), e a sua organização final é produto da atividade de diferentes regiões de crescimento. Tais regiões, envolvidas no desenvolvimento nos eixos proximal-distal, adaxial- abaxial e centro-lateral do órgão (Fleming 2002, Beck 2005) são tradicionalmente referidas como meristemas, pelas características das células que as compõem. Hageman & Gleissberg (1996) adotam a terminologia “*blastozone*” como alternativa a “*meristem*”, com base no argumento de que as regiões de crescimento formadoras da folha são capacitadas à morfogênese, diferentemente dos meristemas apicais, os quais são capazes de exercer organogênese. No presente trabalho, nos referimos às regiões de crescimento adaxial e marginal da folha como *blastozonas*.

Anatomicamente, o desenvolvimento foliar pode ser dividido em quatro estágios subsequentes: 1) iniciação, 2) diferenciação inicial, 3) desenvolvimento do eixo da folha, 4) origem e histogênese da lâmina foliar (Foster 1936, Fahn 1974). A iniciação da folha começa com divisões periclinais em um pequeno grupo de células lateralmente situadas em relação ao ápice do caule. Como resultado do intenso processo de divisão celular, é formado o primórdio foliar, o qual consiste em uma protoderme, uma região central de tecido fundamental e procâmbio. O rápido desenvolvimento do primórdio resulta em uma estrutura cônica com a face adaxial plana ou achatada.

Segundo Fahn (1974), o crescimento em comprimento do eixo é acompanhado pelo aumento na largura, como resultado de divisões de células que permanecem meristemáticas, formando a blastozona adaxial. As células da face adaxial dividem-se tangencialmente proporcionando um aumento radial do primórdio

foliar. Feixes vasculares acessórios podem se desenvolver a partir da blastozona adaxial (Foster 1936, Kaufman 1959).

O desenvolvimento da lâmina foliar ocorre durante o crescimento em comprimento e espessura do primórdio; as células da margem adaxial continuam em atividade meristemática, formando a blastozona marginal. A magnitude do crescimento marginal varia entre as regiões do primórdio foliar de modo que, nas folhas com pecíolo, este crescimento é reprimido na região basal, a qual originará o pecíolo (Foster 1936, Fahn 1974). Frequentemente, o crescimento marginal continua sua atividade por um período mais longo que o crescimento apical, sendo as novas células formadas adicionadas às diferentes camadas da lâmina foliar das quais se originam os tecidos da lamina foliar, ou seja, protoderme, parênquima paliádico e lacunoso e os tecidos vasculares marginais (Foster 1936, Fahn 1974).

Trabalhos recentes têm sumarizado os eventos da ontogênese foliar em três fases: 1) iniciação, 2) morfogênese primária e 3) expansão e morfogênese secundária (Hagemann & Gleissberg 1996, Dengler & Tsukaya 2001, Beck 2005, Tsukaya 2010, Yamaguchi *et al* 2012). O termo “morfogênese primária” é utilizado para descrever os processos que estabelecem a forma básica da folha, determinando sua simetria e sub-regiões (Hagemann & Gleissberg 1996). A terceira fase da morfogênese foliar, denominada de “expansão e morfogênese secundária”, compreende o aumento na superfície e no volume final da folha, cuja expansão pode ser isométrica ou alométrica, podendo reter ou alterar a forma estabelecida durante a morfogênese primária (Dengler & Tsukaya 2001).

A polaridade adaxial-abaxial presente nas folhas é uma característica importante no desenvolvimento das plantas, visto que esse órgão é especializado na realização de fotossíntese (Yamaguchi *et al.* 2012, Nicotra *et al.* 2011). A maior parte

das angiospermas apresenta folhas planas e dorsiventrais, com a face adaxial composta por epiderme recoberta por cutícula espessa, que protege da dessecação, e parênquima paliçádico arranjado para favorecer a captação de luz (Esau 1977, Evert 2006). A face abaxial, por sua vez, comumente, caracteriza-se pela abundância de estômatos na epiderme e pelo parênquima lacunoso frouxamente arranjado, atributos que permitem a regulação das trocas gasosas e transpiração (Esau 1977, Evert 2006).

A diferenciação desses tipos celulares distintos em cada face, somada à extensão da lâmina, são adaptações importantes que maximizam a fotossíntese e ao mesmo tempo minimizam as perdas de água para o ambiente (Taiz & Zeiger 2006). Assim como a forma, a anatomia foliar pode ser variável entre as plantas, tal como vemos em Aizoaceae. Entretanto, independentemente dessas variações, todas as folhas apresentam dois domínios distintos ao longo do seu eixo ada-abaxial (Kaplan 2001, Yamaguchi *et al.* 2012), verificado na polaridade presente no seu sistema vascular, cujos feixes exibem xilema adaxialmente ao floema (Eames & McDaniels 1947, Esau 1977, Evert 2006) e, em muitos casos, por outras características, como diferença de coloração e presença de tricomas em apenas uma das faces.

Com o advento da biologia molecular, vários trabalhos têm identificado uma série de genes cujos produtos são necessários para a aquisição da identidade ada-abaxial das folhas, tendo como referencial a atividade meristemática (Siegfried *et al.* 1999, Illing *et al.* 2009, Yamaguchi *et al.* 2010, Blein *et al.* 2010). Os processos de abaxialização e adaxialização, segundo diversos autores (Waites & Hudson 1995, Siegfried *et al.* 1999, Kidner & Timmermans 2007, Husbands *et al.* 2009, Yamaguchi *et al.* 2010, Blein *et al.* 2010), estão envolvidos na perda do caráter laminar da folha, a qual tende a não expandir sua lâmina lateralmente, e a adquirir simetria radial.

A partir da última década do século XX, com os estudos de biologia molecular em “plantas modelos” como *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus*, *Zea mays* e *Solanum lycopersicum*, houve aumento no número de trabalhos sobre morfogênese foliar (Dengler & Tsukaya 2001, Tsukaya 2010, Blein *et al.* 2010). Nesse cenário, no entanto, um dos maiores desafios da atualidade é associar o conhecimento da biologia molecular e a anatomia do desenvolvimento utilizando outras plantas como modelos.

Embora alguns dos principais mecanismos de controle do desenvolvimento foliar tenham sido elucidados, permanece grande demanda pela aplicação desse conhecimento a uma gama maior de espécies, como foi recentemente realizado por Yamaguchi *et al.* (2010 e 2012). Neste primeiro trabalho, os autores partiram de um estudo de ontogênese foliar, realizado por Kaplan (1970), e comprovaram com bases moleculares a ocorrência de abaxialização em folhas unifaciais de monocotiledôneas.

Segundo Kaplan (1970, 1973), nas folhas unifaciais os feixes vasculares são frequentemente arranjados na margem da folha com os polos de xilema voltados para o centro do órgão. Estudando a expressão de genes homólogos HD-ZIPIII e ARF3/ETT em folhas de *Juncus prismatocarpus*, Yamaguchi *et al.* (2010), demonstraram que, em estágios iniciais, há um processo de abaxialização na lâmina foliar.

A orientação dos tecidos vasculares descrita por Kaplan (1970, 1973) e Yamaguchi *et al.* (2010) em folhas unifaciais assemelha-se ao que se observa na anatomia foliar em espécies de Ruschioideae. A descrição detalhada da anatomia foliar de Aizoaceae foi realizada por Melo-de-Pinna *et al.* (sob revisão), as quais sugerem que esta é uma situação, aparentemente, única dentre as Caryophyllales succulentas que apresentam folhas com simetria radial.

Wide-band tracheids:

Os feixes vasculares periféricos característicos das folhas de Ruschioideae apresentam um tipo particular de elemento traqueal, denominado traqueíde com amplo espessamento de parede (*wide-band tracheid*-"wbts"). Essas traqueídes foram descritas inicialmente em Cactaceae, como células mortas lignificadas e imperfuradas, providas de bandas que se estendem para o lúmen celular, cuja função parece estar relacionada tanto com o armazenamento quanto com o transporte axial de água (Mauseth *et al.* 1995).

Estudos sugerem que as "wbts" representam uma característica importante para a sobrevivência das plantas em ambientes xéricos (Mauseth *et al.* 1995, Landrum 2001, 2002, 2006), e têm reconhecida significância nos estudos de sistemática e evolução de Cactaceae, Anacampserotaceae e Aizoaceae. Nesta última família, a ocorrência de "wbts" restringe-se às folhas, e representa uma apomorfia da subfamília Ruschioideae (Landrum 2001).

Embora a literatura atual disponha de poucas informações sobre ontogênese dessa célula, sua origem parece ser exclusiva do sistema vascular, mesmo que, em Cactaceae e Anacampserotaceae, tenha sido observada na região medular do caule (Landrum 2006, Arruda & Melo-de-Pinna 2010).

Os estudos realizados até o momento sobre as "wbts" são puramente descritivos, citando apenas sua distribuição no corpo da planta e os padrões de espessamento de parede. No entanto, nenhum trabalho comparativo da estrutura e ultraestrutura deste tipo peculiar de traqueíde foi realizado entre representantes das três famílias.

A dissertação está dividida em dois capítulos. O primeiro aborda a ontogênese foliar em representantes Ruschioideae com diferentes morfologias foliares, mostrando a instalação e atividade das diferentes regiões de crescimento durante a elaboração da

base e da lâmina foliar. O segundo capítulo traz uma análise comparativa das traqueídes do tipo “wbt” presentes nos feixes periféricos das folhas de algumas espécies de Aizoaceae. Neste capítulo, optamos por incluir representantes de outras duas famílias, também conhecidas na literatura por apresentarem este tipo de traqueíde, buscando uma melhor descrição de sua estrutura nas Caryophyllales.

Referências

- BECK, C. B. 2005. *An Introduction to Plant Structure and Development*. Cambridge University Press, 431p.
- BITTRICH, V; HARTMANN, H. E. K. 1988. The Aizoaceae...a new approach. *Botanical Journal of the Linnean Society* 97: 239-254.
- BLEIN, T., HASSON, A., LAUFS, P. 2010. Leaf development: what it needs to be complex. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 75-82.
- BURKE, A. 2005. Endemic plants of the arid Succulent Karoo in Namibia: towards hypothesis for their evolution. *Ecography* 28: 171-180.
- CHESELET, P., SMITH, G.F., WYK, A.E. 2002. A new tribal classification of Mesembryanthemaceae: evidence from floral nectaries. *Taxon* 51: 295-308.
- CONSERVATION INTERNATIONAL.
http://www.conservation.org/where/priority_areas/hotspots/africa/Succulent-Karoo/Pages/default.aspx. Acesso em julho de 2013.
- COWLING, R.M., ESLER, K.J., RUNDEL, P.W. 1999. Namaqualand, South Africa: an overview of a unique winter-rainfall desert ecosystem. *Plant Ecology* 142: 3-21.

- DENGLER, N.G. & TSUKAYA, H., 2001. Leaf Morphogenesis in Dicotyledons: current issues. *International Journal of Plant Sciences*, 162, pp.459–464.
- DESMET, P.G., COWLING, R.M. 1999. Biodiversity, habitat and range-size aspects of a flora from a winter-rainfall desert in north-western Namaqualand, South Africa. *Plant Ecology* 142: 23–33.
- EAMES, A. J. AND L. H. MACDANIELS. 1947. An introduction to plant anatomy. McGraw-Hill, New York, USA.
- ELLIS, A. G., WEIS, A. E. 2006. Coexistence and differentiation of 'flowering stones': the role of local adaptation to soil microenvironment. *Journal of Ecology*, 94 (2): 322-335.
- ESAU, K., 1977. *Anatomy of the Seed Plants* 2nd ed., John Wiley & Sons.
- EVERT, R.F., 2006. *Esau's Plant Anatomy, Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: their structure, function, and development*. 3rd ed., New Jersey: John Wiley & Sons.
- FAHN, A. 1974. *Plant Anatomy*, 2nd ed. Pergamon Press, Oxford, UK.
- FAHN, A., CUTLER, D. F. 1992. *Xerophytes*. Gebrüder Botntraeger, Berlin.
- FLEMING, A. J. 2002. The mechanism of leaf morphogenesis. *Planta*, 216: 17–22.
- FLEMING, A. J. 2002. The mechanism of leaf morphogenesis. *Planta*, 216: 17–22.
- FOSTER, A. S. 1936. Leaf differentiation in angiosperms. *The Botanical Review* 2 (7): 349-372.

- GIFFORD, E.M. & FOSTER, A.S., 1989. *Morphology and evolution of vascular plants*,
New York: WH Freeman.
- HAGEMANN, W. & GLEISSBERG, S., 1996. Organogenetic capacity of leaves : the
significance of marginal blastozones in angiosperms. *Plant Systematics and
Evolution*, 199, pp.121–152.
- HARTMANN, H. E. K. 1991. Mesembryanthema. *Contributions from the Bolus
Herbarium* 13: 75-157.
- HARTMANN, H. E. K. 1993. Aizoaceae. *In*: Kubitzki, K., Rohwer, J.G., Bittrich, V.
(eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants*, vol. 2, 37-69. Springer,
Berlin, Germany.
- HARTMANN, H. E. K. 1998. Groupings in Ruschioideae (Aizoaceae). *Mesemb Study
Group Bulletin* 13: 35-36.
- HARTMANN, H. E. K. 2001a. *Illustrated Handbook of Succulent Plants: Aizoaceae A-
E*. Springer, Berlin, Germany.
- HARTMANN, H. E. K. 2001b. *Illustrated Handbook of Succulent Plants: Aizoaceae F-
Z*. Springer, Berlin, Germany.
- HERRE, H. 1971. *The genera of the Mesembryanthemaceae*. Tafelberg-Uitgewers
Beperk, Cape Town, South Africa.
- HUSBANDS, A.Y., CHITWOOD, D. H., PLAVSKIN, Y., TIMMERMANS, M. C. P. 2009.
Signals and prepatterns: new insights into organ polarity in plants. *Genes &
Development* 23:1986-1997.

- IHLENFELDT, H. -D. 1994. DIVERSIFICATION IN AN ARID WORLD : The Mesembryanthemaceae. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 25, pp. 521-546.
- ILLING, N., KLAKE, C., JOHNSON, C., BRITO, D., NEGRAO, N., BAINE, F., VAN KETS, V., RAMCHURN, K.R., SEOIGHE, C., RODEN, L. 2009. Duplication of the Asymmetric Leaves1/Rough Sheath 2/Phantastica (ARP) gene precedes the explosive radiation of the Ruschioideae. *Development Genes and Evolution*, 219(6), pp.331–338.
- KAPLAN, D. R., 2001. Fundamental Concepts of Leaf Morphology and Morphogenesis : A Contribution to the Interpretation of Molecular Genetic Mutants. *International Journal of Plant Sciences*, 162(3), pp.465-474.
- KAUFMAN, P. B. 1959. Development of the shoot of *Oryza sativa* L.: II Leaf histogenesis. *Phytomorphology* 9: 277-311.
- KIDNER C. A; TIMMERMANS M. C. P. 2007. Mixing and matching pathways in leaf polarity. *Current Opinion in Plant Biology* 10 (1):13-20.
- KLAKE, C, REEVES, G & HEDDERSON, T, 2004. Unmatched tempo of evolution in Southern African semi-desert ice plants. *Nature*, 427, pp.63–65.
- KLAKE, C.; KHUNOU, A; REEVES, G; HEDDERSON, T. 2003. A Phylogenetic Hypothesis for the Aizoaceae (Caryophyllales) Based on four plastid DNA Regions. *American journal of botany*, 90(10), pp.1433–1445.

- LANDRUM, J.V. 2001. Wide-band tracheids in leaves of genera in Aizoaceae the systematic occurrence of a novel cell type and its implications for the monophyly of the subfamily Ruschioideae. *Plant Systematic Evolution* 227: 49-61
- LANDRUM, J.V. 2002. Four succulent families and 40 million years of evolution and adaptation xeric environments: What can stem and leaf anatomical characters tell us about their phylogeny? *Taxon* 51: 463-473.
- LANDRUM, J.V. 2006. Wide-band tracheids in genera of Portulacaceae: novel, non xerary tracheids possibly evolved as an adaptation to water stress. *Journal Plant of Research* 119: 497-504
- MAUSETH, J.D.; UOZUMI, Y.; PLEMONS, B.J. & LANDRUM, J.V. 1995. Structural and systematic study of an unusual tracheid type in cactic. *Journal of Plant Research* 108: 517-526.
- MELO-DE-PINNA, G. F.A., NUNES, S. A., ARRUDA, E. C.P., KLAK, C. (sob revisão).
Connate leaf base and endoscopic pattern of vasculature of the peripheral bundles in Aizoaceae: new traits in Caryophyllales. Manuscrito submetido à publicação.
- METCALFE, C.R., CHALK, L. 1979. *Anatomy of the dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem*. Vol. I. Oxford University Press.
- NICOTRA, A.B.; LEIGH, A.; BOYCE, C.K.; JONES, C.S.; NIKLAS, K.J.; ROYER, D.L.;
TSUKAYA, H., 2011. The evolution and functional significance of leaf shape in the angiosperms. *Functional Plant Biology*, 38, pp.535–552.
- SCHMIEDEL, U., JÜRGENS, N. 1999. Community structure on unusual habitat islands: quartz-fields in the Succulent Karoo, South Africa. *Plant Ecology*, 142: 57–69.

- SIEGFRIED, K.R.; ESHED, Y.; BAUM, S.F.; OTSUGA, D.; DREWS, G.N.; BOWMAN, J.L., 1999. Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development*, 126(18), pp.4117–28.
- SMITH, G.F; CHESSELET, P; VAN JAARSVELD, E.J; HARTMANN, H; HAMMER, S; VAN WYK, B-E; BURGOYNE, P; KLAK, C; KURZWEIL, H. 1998. *Mesembryanthemum of the world. Illustrated guide to a remarkable succulent group*. Briza Publications, Pretoria.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. 2006. *Plant Physiology*, 4th ed. Sinauer Associates. Sunderland, MA.
- TSUKAYA, H. 2010. Leaf development and evolution. *Journal of Plant Research* 123: 3-6.
- WAITES, R. & HUDSON, A., 1995. *phantastica* : a gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. *Development*, 121, pp.2143–2154.
- YAMAGUCHI, T., NUKAZUKA, A. & TSUKAYA, H., 2012. Leaf adaxial-abaxial polarity specification and lamina outgrowth: evolution and development. *Plant & cell physiology*, 53(7), pp.1180–1194.
- YAMAGUCHI, T.; YANO, S.; TSUKAYA, H. 2010. Genetic framework for flattened leaf blade formation in unifacial leaves of *Juncus prismatocarpus*. *The Plant Cell*, 22(7), pp. 2141-2155.

CAPÍTULO 1

ONTOGÊNESE FOLIAR DE RUSCHIOIDEAE (AIZOACEAE)

Ontogênese foliar em Ruschioideae (Aizoaceae)

Aline S. Nunes ^{1*} Gladys F.A. Melo-de-Pinna ¹

¹*Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, CP 11461, 05422-*

970, São Paulo, Brasil.

* autora para correspondência: aline.sqr@gmail.com

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 2011/04286-0) pelo apoio financeiro. À Dra. Cornelia Klak (Bolus) pela identificação das espécies.

Resumo

Conhecidas popularmente como *ice plants* e *flowering stones*, as folhas suculentas de Aizoaceae apresentam pequenos feixes vasculares periféricos, dispostos na interface entre os parênquimas clorofiliano e armazenador, que exibem uma peculiaridade no arranjo dos tecidos vasculares: o xilema, endoscópico, direciona-se para o centro da folha, e o floema, para a superfície externa. A disposição de xilema e floema é dorsiventral na nervura mediana, sendo a organização endoscópica do xilema observada apenas nos feixes da margem foliar, e exclusiva de espécies que apresentam bases foliares proeminentes. Aparentemente, células típicas da face abaxial diferenciam-se no domínio adaxial das folhas, e esta particularidade nos motivou a estudar a ontogênese foliar em espécies de Ruschioideae, por meio de sob microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Nossos resultados mostram que a formação dos feixes vasculares periféricos é posterior ao estabelecimento da blastozona marginal, e que tecidos da face abaxial diferenciam-se no domínio adaxial da folha durante histogênese da lâmina. Com base na literatura disponível sobre os principais mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento da polaridade adaxial-abaxial nas folhas, nós sugerimos que um mecanismo de abaxialização esteja relacionado à formação de feixes vasculares com xilema endoscópico nas folhas de Aizoaceae.

Palavras-chave: folha, morfogênese, desenvolvimento, anatomia, abaxialização, Caryophyllales

Introdução

Adoradas por colecionadores e admiradores, as plantas da família Aizoaceae são conhecidas pela notável variabilidade morfológica de suas folhas suculentas (Smith *et al.* 1998). Poucas espécies da família apresentam folhas com lâmina ampla e pecíolo bem delimitado; a maioria tem folhas trígonas, com formato triangular quando seccionadas transversalmente, e algumas espécies apresentam folhas cilíndricas (Herre 1971, Smith *et al.* 1998). Dentre as Aizoaceae é frequente a ocorrência de plantas com filotaxia oposta e bases foliares conadas, de modo que cada par de folhas forma uma estrutura única, circundando o caule (Smith *et al.* 1998). Em espécies altamente especializadas, tais como *Lithops* e *Lapidaria*, a parte aérea da planta resume-se a um diminuto par de folhas opostas, de aparência muito semelhante às rochas que compõem o substrato onde essas plantas crescem (Metcalf & Chalk 1974).

Por serem plantas bastante curiosas, diversos trabalhos na literatura tratam de sua ecologia e evolução (Klak *et al.* 2004, Burke 2005, Kellner *et al.* 2011), e sua morfologia é bem documentada em livros e guias de identificação (Herre 1971, Smith *et al.* 1998); por outro lado, o que se conhece sobre anatomia foliar no grupo resume-se a poucos trabalhos.

O conhecimento anatômico das folhas em Aizoaceae prioriza a descrição do mesofilo equifacial (Kaplan 2001), de folhas que crescem eretas nas quais a luz incide no tecido clorofiliano periférico que circunda o tecido aquífero (Metcalf & Chalk 1974). Nas chamadas *window leaves* o tecido aquífero estende-se ao ápice da folha criando uma janela à entrada de luz, uma característica frequente em espécies que crescem enterradas no solo, com apenas o ápice de suas folhas expostas à luz direta (Metcalf & Chalk 1974, Ihlenfeldt 1994, Kaplan 2001). Outra característica

anatômica da família é a presença de grandes células epidérmicas conhecidas como *bladder-cells*, especializadas na armazenagem de água, e que conferem à folha aspecto brilhoso, atribuindo-se a denominação *ice plant* às espécies que as possuem (Fahn & Cutler 1992; Metcalfe & Chalk, 1974, Smith *et al.* 1998). Essas peculiaridades anatômicas possibilitaram a adaptação dessas plantas ao ambiente árido, proporcionando a diversificação morfológica massiva que ocorrera em Aizoaceae num intervalo de tempo notavelmente curto, conforme apontam Ihlenfeldt (1994) e Klak *et al.* (2004).

Em *Conophytum* N.E.Br. (Ruschioideae, Aizoaceae), Opel (2005) reporta a ocorrência de pequenos feixes vasculares localizados ao longo da interface entre o clorênquima e o parênquima armazenador da folha, nos quais o xilema orienta-se sempre em direção ao centro do órgão, e o floema, para a superfície externa. Essa disposição de tecidos ocorre mesmo nos feixes vasculares localizados na região adaxial da folha (Opel, 2005). Recentemente, Melo-de-Pinna *et al.* (sob revisão) analisaram a ocorrência de feixes vasculares periféricos semelhantes aos descritos por Opel (2005), em várias espécies de Aizoaceae, incluindo representantes das quatro subfamílias (Aizooideae, Sesuvioideae, Mesembryanthemoideae e Ruschioideae, *sensu* Klak *et al.* 2003). Segundo as autoras, a disposição endoscópica do xilema ocorre em gêneros das subfamílias mais derivadas de Aizoaceae, e a ocorrência do caráter restringe-se a espécies que apresentam um crescimento particularmente acentuado na porção adaxial da base foliar, que resulta em conação no caso de plantas com filotaxia oposta, ou em uma bainha no caso das folhas alternas.

Folhas são os órgãos vegetais mais variáveis morfológica e anatomicamente (Fahn 1974) e sua arquitetura resulta do crescimento em regiões distintas da folha durante a morfogênese (Esau 1955, Fahn 1974). Em folhas dorsiventrals, a posição

adaxial do xilema em relação ao floema é um caráter anatômico utilizado na identificação da polaridade adaxial/abaxial do órgão (Eames & McDaniels 1947, Esau 1977, Fahn 1974). Plantas com folhas cilíndricas podem apresentar variação nesse arranjo, como ocorre em outras espécies de Caryophyllales, nas quais os feixes vasculares periféricos têm xilema exoscópico, ou seja, xilema externo ao floema (Ogburn & Edwards 2013, Melo-de-Pinna *et al.* sob revisão).

Algumas folhas unifaciais de monocotiledôneas exibem anatomia radial, com feixes vasculares dispostos em anel com o xilema direcionado ao centro da folha e o floema à superfície (Kaplan 1973, Eames & McDaniels 1947), organização semelhante à da margem foliar de Aizoaceae (Melo-de-Pinna *et al.* sob revisão). Esse tipo foliar compõe-se de duas regiões morfológicamente distintas: a base, estruturalmente dorsiventral e organizada em bainha, e a lâmina, porção distal unifacial (Eames & McDaniels 1947, Kaplan 1973). Com base nos trabalhos de Kaplan (1970, 1973), Yamaguchi *et al.* (2010) elucidaram que a morfogênese da lâmina unifacial envolve um processo de abaxialização, devido à expressão de genes característicos de face abaxial no domínio adaxial da folha, e que a bainha mantém sua dorsiventralidade durante a ontogênese.

Melo-de-Pinna *et al.* (sob revisão) sugerem que disposição de tecidos fundamentais e o arranjo dos feixes vasculares observados em folhas adultas de Aizoaceae indicam que a identidade adaxial/abaxial é estabelecida no início do desenvolvimento e, posteriormente, perdida na lâmina, formando apenas células de face abaxial em toda a margem da folha. Dando continuidade aos estudos iniciados por Melo-de-Pinna *et al.* (sob revisão), este trabalho mostra etapas da ontogênese foliar em representantes da subfamília Ruschioideae com diferentes padrões

morfológicos foliares, fornecendo evidências anatômicas da formação e, posterior perda, da identidade adaxial/abaxial durante o desenvolvimento foliar.

Material e métodos

Foram analisadas 10 espécies pertencentes à subfamília Ruschioideae selecionadas segundo caracteres morfológicos foliares (tabela1, fig.1), com base na proposta de Melo-de-Pinna *et al.* (sob revisão). O material foi identificado pela Dra. Cornelia Klak (Bolus Herbarium, África do Sul), e o material testemunho depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo (SPF).

Tabela 1. Espécies de Ruschioideae (Aizoaceae) e os padrões e características foliares utilizados em sua seleção para o presente estudo. Com base em Melo-de-Pinna *et al.* (sob revisão). (X) assinala o padrão ao qual se classifica a espécie; (✓) indica ocorrência; (-) indica ausência.

Material botânico	Padrões				Características		
	1	2	3	4	Base conada	Xilema endoscópico	Lâmina lateralmente expandida
Tribo Dorotheanthaeae							
<i>Cleretum lyratifolium</i> Ihlenf. & Struck	X				-	-	✓
Tribo Ruschiae							
<i>Delosperma herbeum</i> (N.E.Br.) N.E.Br.			X		✓	✓	-
<i>Delosperma napiforme</i> Schwantes			X		✓	✓	-
<i>Delosperma tradescantioides</i> (A.Berger) L.Bolus		X			✓	✓	✓
<i>Fenestraria rhopalophylla</i> (Schltr. & Diels) N.E.Br.			X		✓	✓	-
<i>Gibbaeum petrense</i> (N.E.Br.) Tischer			X		✓	✓	-
<i>Gibbaeum velutinum</i> (L.Bolus) Schwantes			X		✓	✓	-
<i>Lithops marmorata</i> N.E.Br.			X		✓	✓	-
<i>Lithops aucampiae</i> L.Bolus			X		✓	✓	-
<i>Muiria hortenseae</i> N.E.Br.				X	✓	✓	-

Amostras de folhas e ápices caulinares vegetativos de cada espécie foram fixadas em FAA 50 (formalina/ácido acético/etanol 50%) por 24h e armazenados em etanol 70%. Para microscopia de luz o material foi desidratado em série gradual de etanol/butanol para posterior infiltração em parafina (Ruzin 1999). Foram obtidas seções longitudinais e transversais do material com micrótomo rotativo. A coloração foi feita com azul de astra e safranina ambos a 1% em etanol 50% (Bukatsch 1972,

adaptado) e com azul de toluidina em tampão fosfato (pH 6.8, 0,1M) (O'Brien *et al.* 1965). Folhas completamente expandidas de *Delosperma* N.E. Br., *Cleretum* N.E. Br. and *Lithops* N.E. Br. foram incluídas em HistoResin® (Leica) e coradas com azul de toluidina em tampão fosfato (pH 6.8, 0,1M) (O'Brien *et al.* 1965).

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), o material foi fixado em Karnovsky, desidratado em série gradual etílica e submetido ao ponto crítico com dióxido de carbono. As amostras foram, por fim, aderidas a suportes de MEV para metalização e posterior observação (Silveira 1989).

Resultados

Morfologia e anatomia de folhas adultas

Analisamos representantes dos quatro padrões foliares descritos por Melo-de-Pinna *et al.* (sob revisão) (tabela 1, fig.1). *Cleretum lyratifolium* tem morfologia foliar dorsiventral com lâmina expandida e peciolada, sendo, dentre as espécies analisadas, a única a apresentar filotaxia alterna (fig. 1A). A base foliar não exibe crescimento adaxial proeminente, sendo essa espécie classificada como padrão 1. *Delosperma tradescantioides* (padrão 2; figs 1B, C), apresenta morfologia dorsiventral e lâmina expandida, e conação das bases; as demais espécies analisadas do gênero, *D. herbeum* e *D. napiforme* têm morfologia foliar trígona e bases foliares conadas (padrão 3; figs. 1D, E). *Gibbaeum petrense*, *G. velutinum* e *G. heathii* também se classificam no padrão 3, entretanto, as folhas opostas são nitidamente diferentes entre si, especialmente em tamanho (fig. 1F-H). Ainda no padrão 3 estão incluídas as espécies *Fenestraria rhopalophylla* (fig. 1I), espécie com folhas cilíndricas com bases conadas, *Lithops aucampiae* e *L. marmorata* (fig. 1J, K). *L. aucampiae* apresenta folhas quase totalmente conadas, restando apenas uma reduzida porção apical livre (fig. 1J), diferentemente do que se observa em *L. marmorata*, na qual a porção livre é

proporcionalmente maior (fig. 1K). *Muiria hortenseae* configura o único exemplo de grau máximo de conação, com folhas totalmente conadas, sem uma porção morfológicamente livre (padrão 4; fig. 1L).

A anatomia da lâmina foliar de *Cleretum lyratifolium* exhibe epiderme unisseriada com *bladder cells* presentes em ambas as faces da folha. O mesofilo tem arranjo dorsiventral, com várias camadas de parênquima paliçádico na superfície adaxial (fig. 2A, B) e parênquima lacunoso próximo à superfície abaxial. A nervura mediana é formada por um feixe vascular colateral, com xilema em posição adaxial em relação ao floema, envolto por parênquima armazenador de água (fig. 2A), padrão que se repete nas demais espécies analisadas. No mesofilo ocorrem feixes vasculares colaterais menores com disposição de xilema e floema semelhante à da nervura central (fig. 2B). Células notavelmente mais expandidas e de conteúdo translúcido distribuem-se no parênquima paliçádico, em posição subjacente às *bladder-cells* (fig. 2B, C) e, assim como nas demais espécies estudadas, idioblastos contendo cristais na forma de ráfides encontram-se dispersos por todo o mesofilo. No pecíolo observam-se *bladder-cells* apenas na superfície abaxial na região da nervura mediana, enquanto que nas margens essas células ocorrem em ambas as faces (fig. 2D). O pecíolo é preenchido por células parenquimáticas isodiamétricas e sua vascularização segue a mesma organização observada na lâmina foliar (fig. 1D).

A epiderme foliar de *Delosperma tradescantioides* é unisseriada com *bladder-cells* de base intumescida e ápice afilado, semelhantes às papilas, distribuídas em ambas as faces da folha (fig. 2E). O mesofilo é isobilateral, composto por clorênquima constituído por pequenas células isodiamétricas distribuídas perifericamente e parênquima aquífero, formado por células bastante expandidas, ocupando as porções mais internas da folha (fig. 2E, F). A região da nervura mediana

exibe tecidos fundamentais arranjados de maneira semelhante ao mesofilo, e apresenta um feixe vascular colateral central rodeado de feixes periféricos menores (fig. 2E). Duas fileiras de pequenos feixes vasculares colaterais ocorrem no mesofilo nas proximidades da nervura mediana (fig. 2E, F).

Os feixes vasculares periféricos, próximos à superfície abaxial da folha de *D. tradescantioides*, apresentam xilema e floema dispostos como na nervura principal, enquanto que os feixes da fileira próxima à face adaxial da folha apresentam xilema endoscópico, voltado ao interior do mesofilo, e floema direcionado para a superfície externa da folha (fig. 2G). No bordo foliar, observa-se apenas uma fileira de feixes periféricos, com xilema voltado para a face adaxial da folha (fig. 2H). A conação das bases foliares em *D. tradescantioides* ocorre na porção proximal do pecíolo, o qual apresenta uma extensão distal livre (fig. 1B). Na porção livre do pecíolo há *bladder-cells* em ambas as faces, e o tecido fundamental compõem-se de células parenquimáticas isodiamétricas. A vascularização segue o padrão observado na região da nervura mediana da lâmina, com feixes vasculares periféricos dispostos na região da nervura mediana (fig. 3A). No segmento proximal do pecíolo, os feixes marginais passam gradativamente a ocupar as margens laterais da folha (fig. 3B) até que, na porção conada, esses feixes tornam-se contínuos entre as folhas opostas (fig. 3C).

As olhas das outras espécies de *Delosperma* (*D. herbeum* e *D. napiforme*) são de morfologia trígona. Ambas têm epiderme unisseriada, sendo em *D. herbeum* composta majoritariamente por *bladder-cells* em toda a superfície (fig. 3D), e por células epidérmicas ordinárias em *D. napiforme* (fig. 3E). As *bladder-cells* de *D. herbeum* (fig. 2D) são globosas, desprovidas do afilamento observado nas células de *D. tradescantioides* (fig. 2E). As espécies de folha trígona exibem maior grau de

suculência e reduzida expansão lateral da lâmina foliar em relação a *D. tradescantioides*, e a delimitação entre os tecidos fundamentais é mais evidente (fig. 3D, E). Nas duas espécies, o tecido clorofiliano constitui-se de parênquima paliçádico disposto em várias camadas e o parênquima aquífero preenche o centro da folha (fig. 3D, E). Além do feixe vascular principal (e, no caso de *D. napiforme*, duas nervuras secundárias menores), observam-se pequenos feixes vasculares dispostos ao longo da interface entre os dois tecidos fundamentais, os quais exibem arranjo colateral com xilema endoscópico (fig. 3D, E, F). Assim, como observado em *D. tradescantioides*, na região de transição entre as porções livre e conada da folha os feixes periféricos adaxiais passam gradativamente, no sentido distal-proximal, a se concentrar nos flancos da face adaxial (figs. 3G, H e 4A). Na base das folhas, os feixes vasculares periféricos ocorrem apenas na região abaxial e exibem xilema posicionado adaxialmente (fig. 4B). Além disso, nota-se que há atividade meristemática na região de conação entre as folhas (fig. 4B, C). Em seção transversal das bases conadas, a epiderme e os tecidos fundamentais são contínuos entre as folhas opostas, de modo que a identificação das mesmas define-se com base na posição das nervuras medianas (fig. 4C). Nessa região, as faces adaxiais das folhas opostas, constituem apenas de uma pequena abertura em torno do ápice caulinar (fig. 4C). A forma como os tecidos vasculares estão dispostos na lâmina e na base foliar assemelha-se entre as espécies dos padrões 2 e 3, nas quais há uma porção distal livre e base conada.

A anatomia foliar de *Fenestraria rhopalophylla* assemelha-se à de *Delosperma herbeum* e *D. napiforme*. Assim, como em *D. napiforme*, nessa espécie não ocorrem *bladder-cells* na epiderme (fig. 4D). A figura 4E mostra dois feixes vasculares com xilema endoscópico localizados na porção adaxial da folha. Como nas espécies anteriormente descritas, *Fenestraria* apresenta conação das bases de suas

folhas opostas, formando uma estrutura única, com tecidos fundamentais contínuos entre si (fig. 4F). A figura 4G mostra uma seção da região de transição entre a lâmina e a base da folha, porção na qual se observam feixes vasculares periféricos concentrados em um dos flancos da face adaxial.

As espécies analisadas do gênero *Gibbaeum* não têm *bladder-cells*, e exibem mesofilo isobilateral relativamente mais homogêneo em comparação com *D. herbeum*, *D. napiforme* e *Fenestraria* (fig. 5A). A folha de *Gibbaeum* tem clorênquima inconspícuo restrito a poucas camadas de células adjacentes à epiderme (fig. 5B), e exibe alto grau de suculência, sendo majoritariamente preenchida por parênquima aquífero (fig. 5A, B, C). O arranjo da nervura mediana apresenta-se de forma semelhante aos dos demais gêneros (fig. 5C), e pequenos feixes vasculares periféricos ocorrem dispersos ao longo de toda a margem da folha, com xilema voltado ao centro e floema posicionado em direção à superfície do órgão (fig. 5B e D). Como já mencionado para outras espécies, na região de conação das bases foliares, os tecidos fundamentais são contínuos entre as folhas opostas, restando, uma pequena porção livre (fig. 5E).

As folhas de *Lithops* exibem clorênquima apenas na região da face abaxial, composto por células isodiamétricas braciformes dispostas em várias camadas contínuas entre as duas folhas conadas (fig. 5 F). A nervura mediana e os feixes vasculares periféricos da folha de *Lithops* exibem o mesmo padrão de disposição de tecidos vasculares descrito para as demais espécies (exceto *Cleretum lyratifolium*), embora os feixes periféricos sejam relativamente maiores e tenham muito mais células de xilema em relação às do floema. O que se observa na anatomia foliar de *Muiria hortenseae* (padrão 4) assemelha-se ao descrito para a região conada das

folhas de padrão 2 e 3, visto que suas folhas são desprovidas de partes livres (fig. 5H).

Ontogênese foliar

Morfologia dos primórdios foliares

Em *Cleretum lyratifolium*, única espécie de filotaxia alterna estudada neste trabalho, a assimetria entre primórdios foliares é evidente desde as fases iniciais de formação (fig. 6A, B), mantendo este padrão em folhas adultas (fig. 1A), caracterizando desta forma a filotaxia alterna.

Contudo, nas espécies analisadas com filotaxia oposta, a assimetria entre os primórdios varia bastante ao longo do desenvolvimento. Em *Delosperma herbeum*, os primórdios são inicialmente assimétricos (fig. 6C-E) e durante o desenvolvimento assumem tamanhos semelhantes entre si (fig. 1D), ou podem se manter assimétricos em menor ou maior grau, como em *Fenestraria* (fig. 6F-H) e *Gibbaeum* (fig. 6I, J). Em *Lithops*, não foi possível observar os primórdios nos mesmos estágios das demais espécies. Contudo, observando estágios anteriores de desenvolvimento, notamos que os primórdios são simétricos (fig. 6K) e que esta simetria está presente na folha madura (fig. 1J, K). Não foi possível observar os estágios de desenvolvimento foliar em *Muiria*.

Blastozonas adaxial e marginal

As fases iniciais da morfogênese mostraram-se semelhantes em todos os tipos foliares analisados. Após o crescimento apical do primórdio, as células de seu ápice iniciam sua diferenciação, apresentando-se mais alongadas e especializadas. A diferenciação é basípeta e mais precoce na face abaxial, como pode ser observado por

meio da diferenciação das células epidérmicas, evidenciada em MEV (fig. 7A), e pelo grau relativo de expansão celular entre as duas faces (fig. 7B). As células da face adaxial mantêm características meristemáticas por mais tempo, permitindo que o primórdio cresça consideravelmente em volume, por meio de divisões periclinais na blastozona adaxial (fig. 7B).

Durante a ontogênese, a blastozona adaxial, região de crescimento responsável pelo incremento em volume do primórdio foliar, é mais proeminente em folhas de padrões 2, 3 e 4 desde os primeiros estágios da morfogênese primária. Nessas espécies, que desenvolvem bases foliares conadas, o crescimento adaxial é mais marcante na porção proximal da lâmina em formação, resultando na projeção da face adaxial em direção ao meristema apical caulinar. Na figura 7C, observa-se a atividade da blastozona adaxial em um par de primórdios foliares opostos de *Delosperma tradescantioides*, cujas folhas têm bases conadas. As células da face adaxial mantêm suas características meristemáticas por mais tempo, em relação às células da face abaxial do primórdio. O crescimento da face adaxial da folha em direção ao meristema apical caulinar é notavelmente pronunciado, o que fica mais evidente em comparação com o desenvolvimento foliar de *Cleretum lyratifolium* (fig. 7D, E), cujas bases foliares são livres. Em folhas que formam bases conadas, a alta taxa de divisões periclinais na blastozona adaxial resulta na aproximação, e até justaposição, da epiderme nas faces adaxiais dos primórdios opostos (fig. 7C, G).

As divisões periclinais na blastozona adaxial persistem ao longo da ontogênese, formando fileiras de células radiadas (fig. 7F, G). Nas figuras 7A, C, G e H, que se referem às espécies que apresentam folhas com bases conadas, observa-se que o meristema apical caulinar é totalmente encoberto pelo par de primórdios foliares, ao passo em que em *C. lyratifolium*, com folhas de bases livres, é possível

observar os primórdios foliares subsequentes (fig. 7D, E). Em algumas espécies, por exemplo, *Delosperma tradescantioides*, ocorre coerência temporária das porções distais livres dos primórdios, por meio do entrelaçamento entre *bladder-cells* das folhas opostas (fig.7I).

A margem foliar inicia sua elaboração a partir da atividade da blastozona marginal, após o estabelecimento do eixo proximal-distal, o crescimento em volume dos primórdios e o início da diferenciação dos tecidos condutores da nervura mediana. Nas folhas que apresentam lâmina lateralmente expandida (padrões 1 e 2), a blastozona marginal compõe-se de células meristemáticas localizadas nos flancos da face adaxial. O crescimento da lâmina, nesses padrões, ocorre no sentido centro-lateral, por divisões predominantemente periclinais (fig. 8A, B). As células diferenciam-se gradualmente conforme se distanciam da blastozona, de modo que na região da nervura principal as células são mais vacuoladas, em comparação com as células marginais da lâmina em desenvolvimento (fig. 8A, B).

A blastozona marginal instala-se de maneira distinta nas folhas que não desenvolvem lâmina expandida lateralmente. Nas folhas trígonas e cilíndricas, células subepidérmicas com características meristemáticas mantêm-se por toda a margem (fig. 8C-F). O crescimento, por divisões periclinais e expansão das células, ocorre radialmente, formando tecidos em toda a periferia da folha.

No desenvolvimento da margem foliar, independente de sua morfologia, a blastozona marginal é responsável pela histogênese tanto dos tecidos fundamentais quanto dos vasculares, formando, predominantemente, o clorênquima e os feixes vasculares periféricos. Os feixes vasculares periféricos diferenciam-se a partir de cordões de procâmbio, e a formação de seus tecidos condutores é tardia em relação à

diferenciação da nervura mediana. Nas espécies com folhas de padrões 2, 3 e 4 as células originadas da blastozona marginal diferenciam-se apenas em tecidos característicos da face abaxial da folha, o que pode ser observado pela distribuição do tecido clorofiliano (equifacial) e, especialmente, pela orientação dos polos de xilema dos feixes vasculares periféricos. Durante a histogênese da margem as células apresentam-se mais diferenciadas na porção distal da folha em relação à sua porção mediana, como evidenciado na figura 8G e H.

Discussão

Segundo a literatura clássica de anatomia vegetal (Eames & McDaniels 1947, Esau 1977), o primórdio foliar assume a forma de um cone com face adaxial levemente achatada durante o desenvolvimento do eixo proximal distal da folha, e apresenta um cordão central de procâmbio. A diferenciação celular no primórdio é basípeta, evidenciada na especialização das células epidérmicas e da vacuolização gradativa das células do mesofilo. Em estágio subsequente da ontogênese, divisões periclinais de células subepidérmicas na face adaxial caracterizam a atividade da blastozona adaxial (Hageman & Gleissberg 1996), responsável pelo incremento em volume da folha em formação.

Normalmente, após o incremento em volume do primórdio e início da expansão da lâmina foliar, as células localizadas no centro da face adaxial da folha iniciam sua vacuolização, ao passo que as células da margem do primórdio mantêm-se meristemáticas, tal como observado em *Cleretum lyratifolium*. Nesse estágio, considera-se o fim da atividade da blastozona adaxial, e início da elaboração da lâmina foliar, a partir da atividade da blastozona marginal (Eames & McDaniels 1947, Esau 1977, Beck 2010). Entretanto, a atividade da blastozona adaxial é

notavelmente mais pronunciada e persistente nas espécies de Ruschioideae que possuem bases foliares conadas.

Comportamento semelhante é observado durante a morfogênese de folhas unifaciais de monocotiledôneas. Segundo Kaplan (1970), numerosas divisões periclinais ocorrem ao longo de toda a face adaxial do primórdio após o estabelecimento da blastozona adaxial. Esse crescimento é mais proeminente na porção proximal da lâmina, projetando a face adaxial do primórdio em direção ao meristema apical caulinar. Segundo o autor esse acentuado crescimento resulta de uma expressão intensificada da atividade da blastozona adaxial, responsável pelo incremento em volume durante a ontogênese foliar.

Da mesma maneira, em Ruschioideae, a alta atividade nessa região de crescimento forma séries radiadas de células produzidas por divisões periclinais, levando à projeção da face adaxial do primórdio em direção ao meristema apical caulinar, culminando na justaposição das folhas em formação. A principal diferença nos dois casos é que em folhas unifaciais, o crescimento adaxial acentuado promove achatamento da folha no seu plano mediano, de modo que a lâmina expande-se no sentido ada/abaxial, perpendicularmente ao plano de expansão da lâmina de folhas dorsiventrais (Eames & McDaniels 1947, Kaplan 1970). Dessa forma, as folhas unifaciais mantém seu caráter laminar, embora este seja formado por meio de mecanismos distintos dos que operam na morfogênese de folhas dorsiventrais de eudicotiledôneas. Em decorrência desse padrão de crescimento, a nervura mediana desloca-se para a extremidade abaxial da lâmina, passando a compor o conjunto de feixes periféricos característicos desse tipo foliar (Kaplan 1970).

Em Ruschioideae, por sua vez, não há crescimento canalizado em direção à face abaxial da folha, sendo a blastozona marginal responsável pela elaboração e

histogênese da margem foliar, mantendo-se a nervura mediana no centro da folha. Embora seja formada por mecanismos distintos, a lâmina foliar em Ruschioideae exibe simetria radial quanto à disposição de seus tecidos, assim como nas folhas unifaciais. Nas espécies analisadas, a blastozona marginal distribui-se uniformemente ao longo da circunferência do primórdio, formando uma lâmina com mesofilo equifacial e feixes vasculares periféricos com xilema endoscópico. O mesmo padrão de crescimento foi observado por Hernandez-Lopes (2010), durante a histogênese foliar de *Portulaca werdermannii*, espécie de folhas cilíndricas, com vascularização semelhante à de Ruschioideae, porém sem xilema endoscópico.

Padrões de crescimento distintos resultam na formação de folhas com mesofilo dorsiventral ou equifaciais em Ruschioideae. O que vemos é que a condição equifacial decorre tanto da localização da blastozona marginal, quanto dos seus produtos. Em *Cleretum lyratifolium*, esta região promove crescimento no sentido centro-lateral da lâmina, e sua histogênese (Eames & McDaniels 1947, Esau 1955, Beck 2010), mantendo-se a dorsiventralidade. Por outro lado, nas espécies com lâmina foliar equifacial, o crescimento é uniforme ao redor do eixo foliar, resultando na expansão radial da lâmina, e todas as células formadas são características de face abaxial.

As folhas unifaciais são radialmente simétricas (Kaplan 1973, 2001), com clorênquima circundando um núcleo de parênquima não clorofiliano e, feixes vasculares com xilema endoscópico que se distribuem em disposição paralelinérvea, formando um anel entre os dois tecidos fundamentais (Kaplan 1970). Segundo Kaplan (1973, 2001) as folhas unifaciais dispõem de duas subunidades básicas: (1) uma região distal unifacial propriamente dita, homóloga à lâmina foliar de eudicotiledôneas; e (2) uma região proximal bifacial formando uma bainha,

equivalente à base foliar em eudicotiledôneas. Na bainha os feixes vasculares mantêm o padrão paralelinérveo, porém exibem orientação dorsiventral de tecidos, com xilema adaxialmente ao floema (Eames & MacDaniels 1947, Kaplan 1973, 2001), de maneira muito semelhante ao que observamos em Ruschioideae, na região do pecíolo.

A análise anatômica mostrou que nas folhas com base conada e uma porção distal livre (padrões 2 e 3, *sensu* Melo-de-Pinna *et al.* sob revisão) a disposição dos feixes vasculares periféricos e o arranjo dos tecidos fundamentais diferem entre as duas regiões. A base das folhas tem morfoanatomia dorsiventral, com xilema posicionado adaxialmente ao floema em todos os feixes vasculares, e *bladder-cells* apenas na face abaxial da folha. A lâmina foliar, por sua vez, tem mesofilo equifacial, feixes vasculares periféricos com xilema endoscópico, e *bladder-cells* distribuídas por toda a superfície.

Segundo Kaplan (1970), o ponto em que o crescimento adaxial é mais acentuado durante a ontogênese de folhas unifaciais delimita lâmina e base foliar, sendo esse o limite proximal da lâmina. Comparativamente, no presente estudo, nós assumimos a mesma delimitação em Ruschioideae, sobretudo considerando que espécies com filotaxia alterna na subfamília exibem base foliar em forma de bainha (Melo-de-Pinna *et al.* sob revisão), tal como nas folhas unifaciais (Eames & MacDaniels 1947; Kaplan 1970, 1973, 2001).

Estudos recentes, com base em biologia molecular, têm demonstrado que características anatômicas tradicionalmente utilizadas na discriminação entre as faces adaxial e abaxial, como posição do tecido clorofiliano no mesofilo, arranjo das células epidérmicas e, principalmente, orientação adaxial do xilema nos feixes vasculares, são evidências da expressão da polaridade ada-abaxial em folhas. Embora haja semelhança quanto às condições equifacial/unifacial da lâmina e dorsiventral da

base foliar, a posição da nervura mediana configura uma diferença entre os dois tipos foliares em questão.

Dentre as Caryophyllales com folhas equifaciais, a organização dos tecidos vasculares nos feixes periféricos é variável. Em Cactaceae (Ocampo & Columbus 2010, Melo-de-Pinna *et al.* sob revisão) e Portulacaceae (Hernandes-Lopes 2010, Melo-de-Pinna *et al.* sob revisão) o xilema é exoscópico, enquanto que em Chenopodiaceae o xilema é endoscópico (Freitag & Stichler 2000, Kadereit *et al.* 2003, Smith *et al.* 2008), como observado em Ruschioideae. Cabe salientar que nesses dois últimos casos há uma base foliar proeminente, marcada pela presença de bainha em *Borszczowia aralocaspica* (Chenopodiaceae) e nas bases conadas de Ruschioideae. Provavelmente, o crescimento adaxial acentuado esteja vinculado tanto com a formação da base expandida, quanto com a orientação endoscópica do xilema nos feixes vasculares periféricos em Caryophyllales.

A conação das bases foliares observada em Ruschioideae é congênita e ocorre devido à filotaxia oposta, visto que folhas alternas de Ruschioideae formam bainha (Melo-de-Pinna *et al.* sob revisão). Segundo Kaplan (1973), a porção distal livre da folha em desenvolvimento cresce em comprimento e largura, enquanto que a porção proximal do órgão expande-se entorno do meristema apical caulinar. Essa porção basal que envolve o meristema dará origem à base foliar, confluyente com o caule. Assim como descrito por Eames & McDaniels (1947), durante a ontogênese a base do primórdio foliar pode estender-se lateralmente formando um colar de tecido meristemático, originando uma bainha. Em algumas espécies o desenvolvimento da base pode ser muito expressivo, encobrindo completamente o meristema (Hagemann 1970). Mais ainda, se as duas porções marginais da bainha em desenvolvimento

encontram-se, tornando-se confluentes, o resultado é uma base foliar tubular em torno do eixo caulinar (Troll 1939, Kaplan 1973).

Nossos resultados mostram, em Ruschioideae, o crescimento da base foliar no entorno do meristema apical caulinar e a confluência das bases das folhas opostas. Durante a ontogênese uma alta atividade de células com características meristemáticas precede a conação das bases foliares, tal como mencionado por Eames & McDaniels (1947). Além disso, há confluência entre as margens de duas folhas opostas, formando uma estrutura tubular que envolve o eixo caulinar, como citado por Kaplan (1973), embora, em Ruschioideae, o processo envolva as margens de duas folhas opostas. Embora *Cleretum lyratifolium* apresente uma porção laminar no pecíolo, seu desenvolvimento não é homólogo ao da base expandida de folhas conadas, pois nestes casos, o crescimento é adaxial e não marginal, como observado no pecíolo.

O desenvolvimento de conação entre as bases de folhas opostas pode ter sido um evento importante na diversificação de Aizoaceae (Melo-de-Pinna *et al.* sob revisão). Considerando que muitas das espécies são endêmicas de um bioma árido, a inserção do meristema apical caulinar, e das folhas mais jovens, no interior de uma pequena cavidade formada entre as folhas adultas, confere proteção mecânica e previne a dessecação. Essa característica somada a outras, como a presença de -*bladder-cells* e redução da razão superfície/volume, torna as Ruschioideae extremamente adaptadas ao bioma em que vivem (Ihlenfeldt 1994). Por exemplo, *Gibbaeum heathii* e *Lithops* apresentam seu corpo reduzido a um par de folhas maduras quase completamente conadas, e o extremo de especialização é característico de *Muiria*, que possui apenas um único par de folhas adultas, desprovidas de partes livres.

Outro aspecto decorrente da conação foliar pode ser considerado quanto ao desenvolvimento dos primórdios foliares. A assimetria entre os primórdios, observada em espécies com filotaxia oposta, provavelmente surge durante sua morfogênese primária, partindo de um estágio inicial simétrico entre dois primórdios opostos, como visto que *Lithops aucampiae*. A assimetria pode ser mantida na fase madura (*Gibbaeum velutinum* e *G. petrensis*) ou perdida durante a morfogênese secundária, como ocorre em *Delosperma napiforme*. Esta plasticidade observada pode estar relacionada à restrição de espaço no interior da cavidade formada entre as bases conadas das folhas adultas, envolvendo mecanismos particulares de crescimento (alongamento e/ou divisão celular).

A polaridade adaxial-abaxial presente nas folhas é intrínseca ao seu desenvolvimento (Gifford & Foster 1989, Husbands *et al.* 2009) e, por meio da expressão diferencial de genes, media a diferenciação dos tipos celulares de cada face (Kaplan 2001, Husbands *et al.* 2009, Szakonyi *et al.* 2010, Yamaguchi *et al.* 2012). Dessa forma, todas as folhas têm dois domínios distintos ao longo do seu eixo adaxial-abaxial, normalmente expresso na polaridade de seu sistema vascular, com xilema posicionado adaxialmente ao floema (Eames & McDaniels 1947, Esau 1977, Evert 2006).

A nervura mediana das folhas de Ruschioideae mantém a dorsiventralidade estabelecida nas primeiras etapas da morfogênese primária (Dengler & Tsukaya 2001), já definida no cordão procambial que a precede (Esau 1977; Evert 2006). A expansão da lâmina foliar ocorre posteriormente, a partir do estabelecimento da blastozona marginal (Hagemann & Gleissberg 1996; Dengler & Tsukaya 2001), cujas células derivadas apresentam apenas características abaxiais. A blastozona marginal não está envolvida na formação da base da folha, na qual a dorsiventralidade é

mantida. Estudos moleculares mostram que genes envolvidos na diferenciação das células em cada face expressam-se antagonicamente, e que tanto sua inibição quanto a superexpressão resultam em folhas adaxializadas ou abaxializadas (Waites & Hudson 1995, Siegfried *et al.* 1999, Eshed *et al.* 2001). Nos fenótipos mais severos, as folhas formam-se de células características de apenas uma das faces, sendo radialmente simétricas com um feixe vascular central anfigasal, em folhas adaxializadas (McConnell & Barton 1998), e anfigival nas abaxializadas (Waites & Hudson 1995).

Além disso, elucidou-se que algumas folhas unifaciais têm lâmina abaxializada (Yamaguchi e Tsukaya 2010, Yamaguchi *et al.* 2010). Segundo os autores, um ortólogo de *ARF3* (um determinador de face abaxial) é expresso na margem foliar ao longo de toda a lâmina, ao mesmo tempo em que um ortólogo de *PHB* (determinador de face adaxial) se expressa apenas no xilema. A expressão desses genes é convencional na bainha foliar, influenciando na dorsiventralidade habitual (Yamaguchi e Tsukaya 2010, Yamaguchi *et al.* 2010).

Com base na literatura sobre ontogênese de folhas unifaciais (Kaplan 1970, 1973, 2001, Yamaguchi & Tsukaya 2010, Yamaguchi *et al.* 2010) e sobre adaxialização e abaxialização foliar (Waites & Hudson em 1995, Timmermans *et al.* 1999, Byrne *et al.* 2000, Emery *et al.* 2003, Izhaki & Bowman 2007, Husbands *et al.* 2009, Wu *et al.* 2008, Yamaguchi *et al.* 2012), o presente estudo mostra que folhas de Ruschioideae com padrões morfológicos 2, 3 e 4 são abaxializadas, uma condição única entre as Caryophyllales suculentas. Além disso, sugerimos que os mecanismos moleculares envolvidos na abaxialização sejam desencadeados durante a formação da margem foliar. Isso se sustenta no fato de que, nessas espécies, a base da folha conserva-se dorsiventral, assim como a nervura mediana.

Segundo Illing *et al.* (2009), a duplicação de um gene ortólogo de *ASYMMETRIC LEAVES1* (*ASI*), ocorrida durante a diversificação entre Mesembryanthemoideae e Ruschioideae, configurou uma importante novidade entre os mecanismos moleculares que atuam na morfogênese foliar. O gene *ASI* vincula-se à diferenciação de células adaxiais, e uma alteração no seu padrão de expressão pode desencadear alterações na histogênese da face adaxial da folha. A observação da expressão de *ASI in situ* em folhas de Aizoaceae com diferentes morfologias elucidaria tanto a possibilidade de variação na atividade desse gene entre as espécies, quanto sua influência na formação de células adaxiais. Essa poderia ser mais uma evidência de que, de fato, ocorre abaxialização nessas folhas.

Referências

- BECK, C. B. 2005. *An Introduction to Plant Structure and Development*. Cambridge University Press.
- BUKATSCH, F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61: 255.
- BURKE, A. 2005. Endemic plants of the arid Succulent Karoo in Namibia: towards hypothesis for their evolution. *Ecography* 28: 171-80.
- BYRNE, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A., Martienssen, R.A. 2000. *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* 408: 967-71.
- DENGLER, N.G. & TSUKAYA, H., 2001. Leaf Morphogenesis in Dicotyledons: current issues. *International Journal of Plant Sciences* 162: 459–64.
- EAMES, A. J. AND L. H. MACDANIELS. 1947. *An introduction to plant anatomy*. McGraw-Hill, New York, USA.

- EMERY, J.F.; Floyd, S.K.; Alvarez, J.; Eshed, Y.; Hawker, N.P.; Izhaki, A.; Baum, S.F.; Bowman, J.L. 2003. Radial Patterning of Arabidopsis Shoots by Class III HD-ZIP and KANADI Genes. *Current Biology* 13(20): 1768–74.
- ESAU, K. 1955. *Plant Anatomy*. John Wiley & Sons.
- ESAU, K., 1977. *Anatomy of the Seed Plants* 2nd ed., John Wiley & Sons.
- ESHED, Y. ; BAUM, S.F.; PEREA, J.V.; BOWMAN, J.L., 2001. Establishment of polarity in lateral organs of plants. *Current biology* 11(16): 1251–60.
- EVERT, R.F., 2006. *Esau's Plant Anatomy, Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: their structure, function, and development*. 3rd ed., New Jersey: John Wiley & Sons.
- FAHN, A. 1974. *Plant anatomy*, 2nd ed. Pergamon Press, Oxford, UK.
- FAHN, A., CUTLER, D. F. 1992. *Xerophytes*. Gebrüder Botntraeger, Berlin.
- FREITAG, H., STICHLER, W. 2000. A remarkable new leaf type with unusual photosynthetic tissue in a Central Asiatic genus of Chenopodiaceae. *Plant Biology* 2: 154-60.
- GIFFORD, E.M. & FOSTER, A.S., 1989. *Morphology and evolution of vascular plants*, New York: WH Freeman.
- HAGEMANN, W. & GLEISSBERG, S., 1996. Organogenetic capacity of leaves : the significance of marginal blastozones in angiosperms. *Plant Systematics and Evolution* 199: 121–52.
- HAGEMANN, W. 1970. Studien zur Entwicklungsgeschichte der Angiospermenblätter. *Bot Jahrb Syst* 90: 297–413.

- HERNANDES-LOPES, J. 2010. *Desenvolvimento da folha e axila foliar em Portulacaceae e Talinaceae: homologias primárias no clado ACPT*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- HERRE, H. 1971. *The genera of the Mesembryanthemaceae*. Tafelberg-Uitgewers Beperk, Cape Town, South Africa.
- HUSBANDS, A.Y., CHITWOOD, D. H., PLAVSKIN, Y., TIMMERMANS, M. C. P. 2009. Signals and prepatterns: new insights into organ polarity in plants. *Genes & Development* 23: 1986-97.
- IHLENFELDT, H. -D. 1994. DIVERSIFICATION IN AN ARID WORLD : The Mesembryanthemaceae. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 25: 521-46.
- ILLING, N., KLAK, C., JOHNSON, C., BRITO, D., NEGRAO, N., BAINE, F., VAN KETS, V., RAMCHURN, K.R., SEOIGHE, C., RODEN, L. 2009. Duplication of the Asymmetric Leaves1/Rough Sheath 2/Phantastica (ARP) gene precedes the explosive radiation of the Ruschioideae. *Development Genes and Evolution* 219(6): 331–38.
- IZHAKI, A. & BOWMAN, J.L., 2007. KANADI and class III HD-Zip gene families regulate embryo patterning and modulate auxin flow during embryogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* 19(2): 495–508.
- KADEREIT, G., MUCINA, L., FREITAG, H. 2006. Phylogeny of Salicornioideae (Chenopodiaceae): diversification, biogeography, and evolutionary trends in leaf and flower morphology. *Taxon* 55: 617-42.

- 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): 331-61.
- KAPLAN, D. R. 1973. The problem of leaf morphology and evolution in the monocotyledons. *The Quarterly Review of Biology* 48: 437-57.
- KAPLAN, D. R., 2001. Fundamental Concepts of Leaf Morphology and Morphogenesis : A Contribution to the Interpretation of Molecular Genetic Mutants. *International Journal of Plant Sciences* 162(3): 465-74.
- KAPLAN, D.R., HAGEMANN, W. 1991. The Relationship of Cell and Organism in Vascular Plants: Are cells the building blocks of plant form? *BioScience* 41(10): 693-703.
- KELLNER, A., RITZ, C. M., SCHLITTENHARDT, P., HELLWIG, F. H. 2011. Genetic differentiation in the genus *Lithops* L. (Ruschioideae, Aizoaceae) reveals a high level of convergent evolution and reflects geographic distribution. *Plant Biology* 13 (2): 368-80.
- KLAK, C, REEVES, G & HEDDERSON, T, 2004. Unmatched tempo of evolution in Southern African semi-desert ice plants. *Nature* 427: 63-65.
- KLAK, C.; KHUNOU, A; REEVES, G; HEDDERSON, T. 2003. A Phylogenetic Hypothesis for the Aizoaceae (Caryophyllales) Based on four plastid DNA Regions. *American journal of botany* 90(10): 1433-45.
- MCCONNELL, J.R. & BARTON, M.K., 1998. Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. *Development* 125(15): 2935-42.

- MELO-DE-PINNA, G. F.A., NUNES, S. A., ARRUDA, E. C.P., KLAKE, C. (sob revisão).
Connate leaf base and endoscopic pattern of vasculature of the peripheral bundles in Aizoaceae: new traits in Caryophyllales. Manuscrito submetido ao *American Journal of Botany*.
- METCALFE, C.R., CHALK, L. 1979. *Anatomy of the dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem*. Vol. I. Oxford University Press.
- METCALFE, C.R., CHALK, L. 1979. *Anatomy of the dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem*. Vol. I. Oxford University Press.
- O'BRIEN, T.P., FEDER, N., MCCULLY, M. E. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59: 367-73.
- OCAMPO, G., COLUMBUS, T. 2010. Molecular phylogenetics of suborder Cactineae (Caryophyllales), including insights into photosynthetic diversification and historical biogeography. *American Journal of Botany* 97: 1827-47.
- 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.
- OPEL, M.R. 2005. Leaf anatomy of *Conophytum* N.E. Br. (Aizoaceae). *Haseltonia* 11: 27-52.
- RUZIN, S.E. 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press, New York, USA.
- SIEGFRIED, K.R.; ESHED, Y.; BAUM, S.F.; OTSUGA, D.; DREWS, G.N.; BOWMAN, J.L., 1999. Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development* 126(18): 4117-28.

- SILVEIRA, M. 1989. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: *Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica*. v.1. (W.Souza, ed.). Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, Rio de Janeiro.
- SMITH, G.F; CHESSELET, P; VAN JAARVELD, E.J; HARTMANN, H; HAMMER, S; VAN WYK, B-E; BURGOYNE, P; KLAK, C; KURZWEIL, H. 1998. *Mesembryanthemaceae of the world. Illustrated guide to a remarkable succulent group*. Briza Publications, Pretoria.
- SZAKONYI, D., MOSCHOPOULOS, A., BYRNE, M. E. 2010. Perspectives on leaf dorsoventral polarity. *Journal of Plant Research* 123(3): 281-90.
- TIMMERMANS, M. C. P.; HUDSON, A.; BECRAFT, P. W.; NELSON, T., 1999. ROUGH SHEATH2: A Myb Protein that Represses knox Homeobox Genes in Maize Lateral Organ Primordia. *Science* 284(5411): 151–53.
- TROLL, W. 1937–1943. *Vergleichende Morphologie der höheren Pflanzen Erster Band: Vegetationsorgane*. Teil I–III. Borntraeger, Berlin.
- WAITES, R. & HUDSON, A., 1995. phantastica : a gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. *Development* 121: 2143–54.
- WU, G.; LIN, W.C.; HUANG, T.; POETHIG, R.S.; SPRINGER, P.S.; KERSTETTER, R.A., 2008. KANADI1 regulates adaxial-abaxial polarity in *Arabidopsis* by directly repressing the transcription of ASYMMETRIC LEAVES2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(42):16392–97.
- YAMAGUCHI, T. & TSUKAYA, H., 2010. Evolutionary and developmental studies of unifacial leaves in monocots: *Juncus* as a model system. *Journal of Plant Research* 123(1): 35–41.

YAMAGUCHI, T., NUKAZUKA, A., TSUKAYA, H. 2012. Leaf adaxial-abaxial polarity specification and lamina outgrowth: evolution and development. *Plant & Cell Physiology* 53: 1180-94.

YAMAGUCHI, T.; YANO, S.; TSUKAYA, H. 2010. Genetic framework for flattened leaf blade formation in unifacial leaves of *Juncus prismatocarpus*. *The Plant Cell* 22(7): 2141-55.

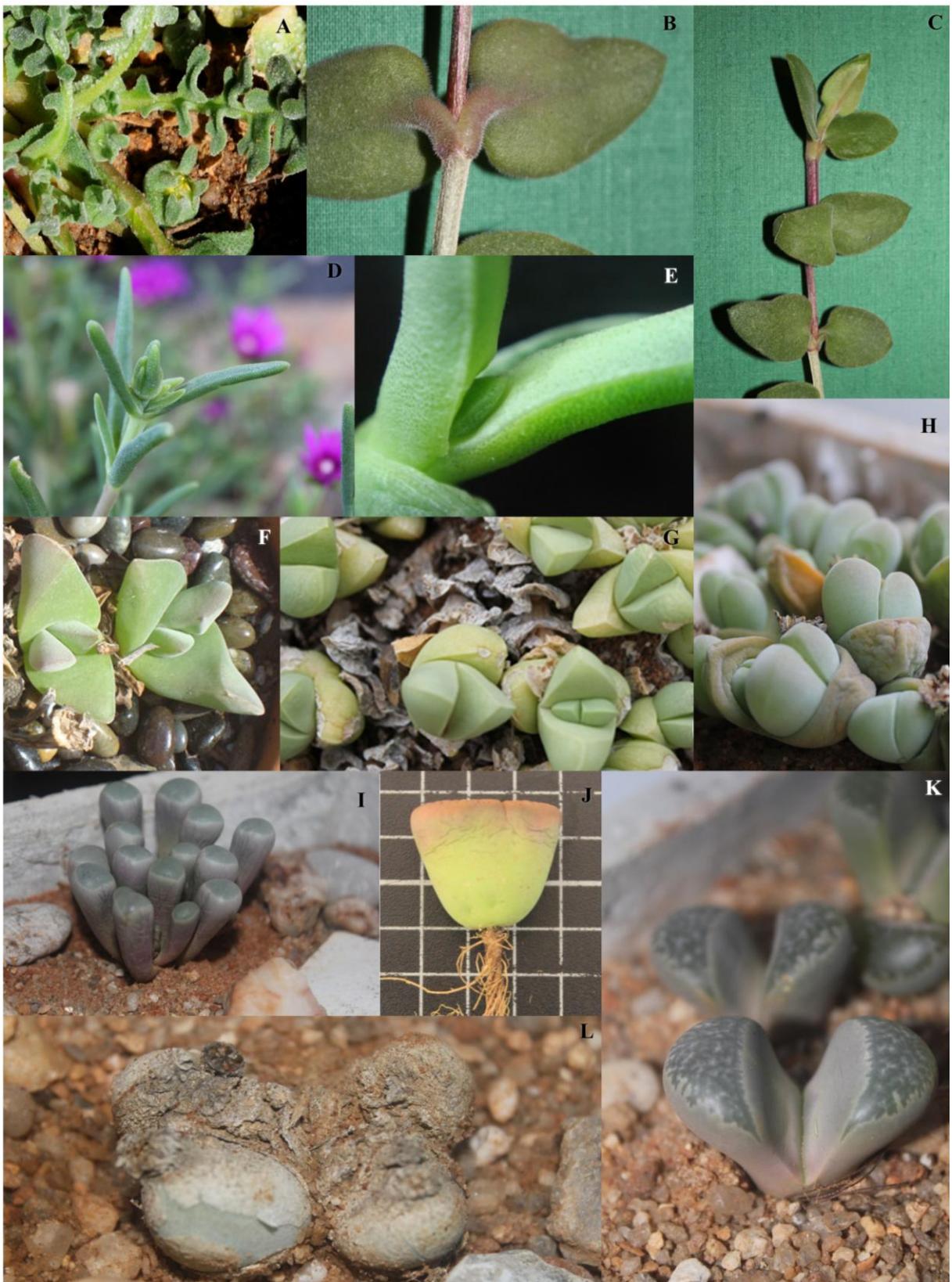


Figura 1. Morfologia foliar das espécies estudadas de Ruschioideae, com base nos padrões estabelecidos por Melo-de-Pinna *et al.* sob revisão. A- *Cleretum lyratifolium*; B, C- *Delosperma tradescantioides*; D – *D. herbeum*; E – *D. napiforme*; F – *Gibbaeum velutinum*; G – *G. petrense*; H – *G. heathii*; I – *Fenestraria rhopalophylla*; J – *Lithops aucampiae*; K – *L. marmorata*; L – *Muiria hortenseae*. A – padrão 1; B, C – padrão 2; D-K – padrão 3; L – padrão 4. A – imagem de P.V. Bruyns; F – imagem de John Balcom.

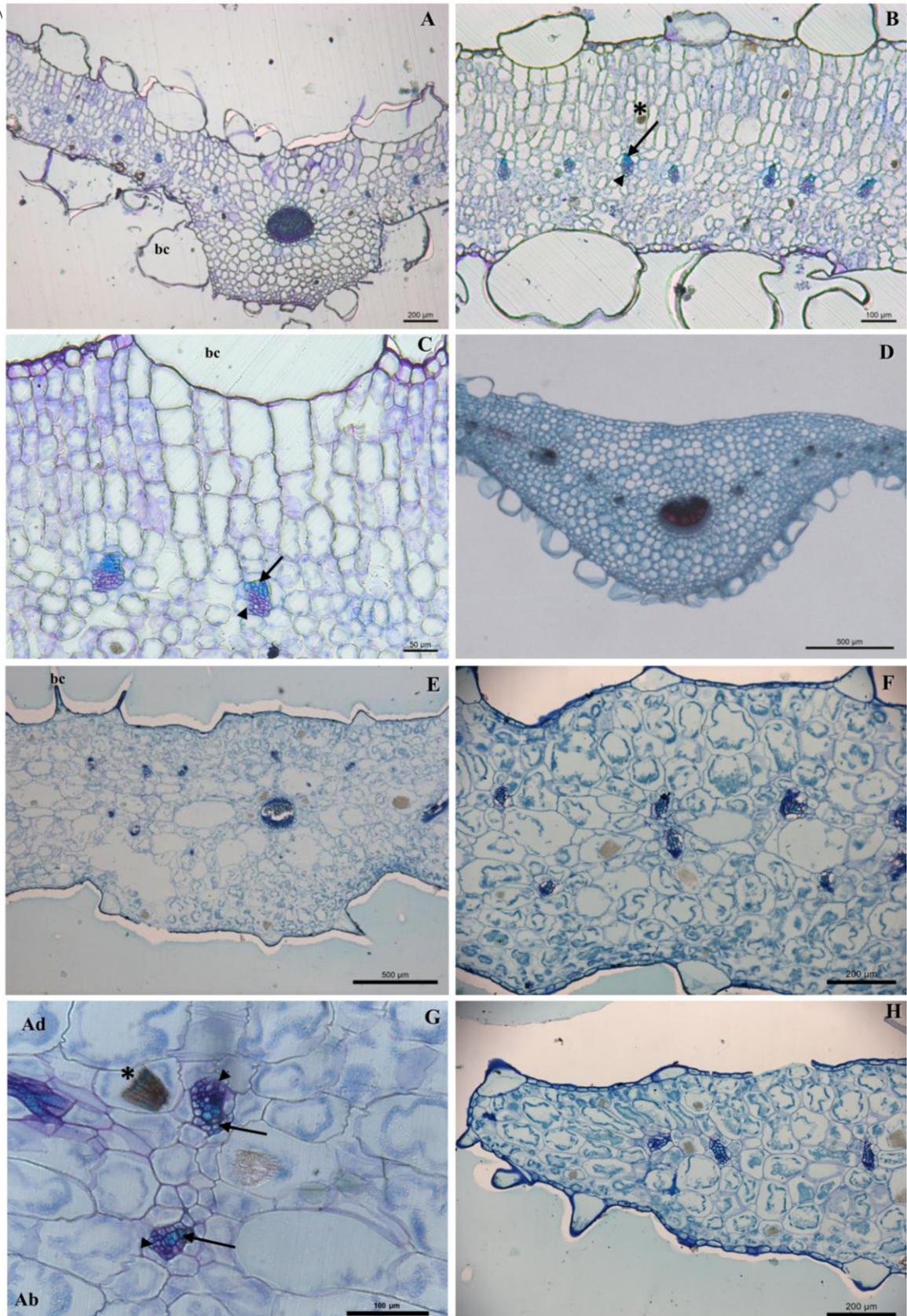


Figura 2. Seções transversais de folhas em espécies de Ruschioideae observadas sob microscopia de luz. A-C – *Clerium lyratifolium*; D-H – *Delosperma tradescantioides*; I, K – *D. herbeum*; J, L-O – *D. napiforme*. A, D – região da nervura central; B, E – região do mesofilo; C, F, G – pecíolo da folha. H, O – base foliar conada. (bc) bladder-cell; (seta) xilema; (ponta de seta) floema; (*) idioblastos contendo ráfides; (ad) adaxial; (ab) abaxial.

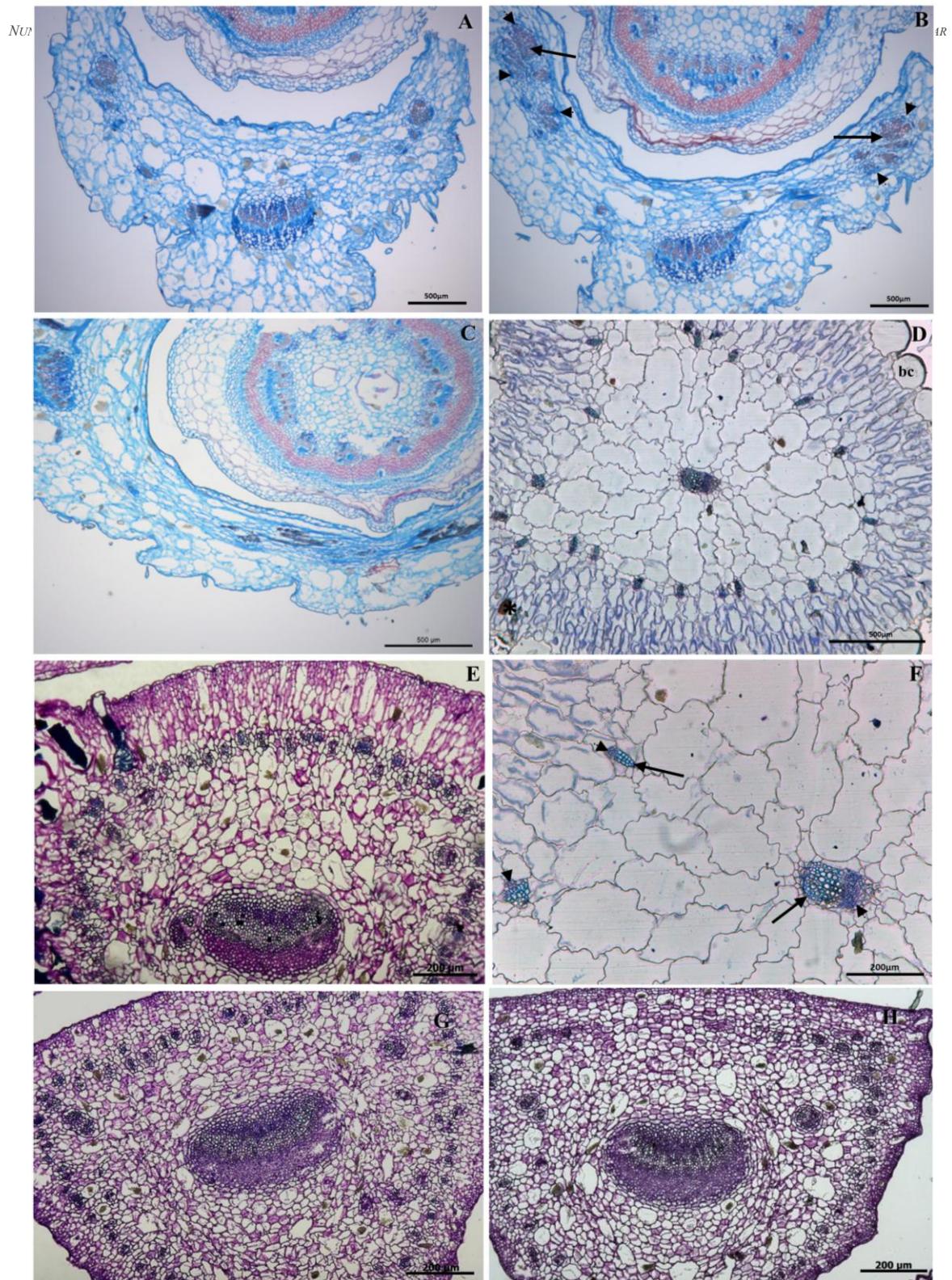


Figura 3. Seções transversais de folhas em espécies de Ruschioideae observadas sob microscopia de luz. A - seção transversal (s. t.) da porção distal do pecíolo de *Delosperma tradescantioides*. B - s. t. da base foliar de *D. tradescantioides*, mostrando posição dos feixes vasculares periféricos. C - s. t. das bases conadas entre folhas opostas de *D. tradescantioides*. D - s. t. da lâmina foliar de *D. herbeum*. E-H - s. t. da lâmina foliar de *D. napiforme* em diferentes regiões no sentido distal-proximal. F - *D. herbeum*, detalhe da orientação endoscópica do polo de xilema no feixe vascular periférico.

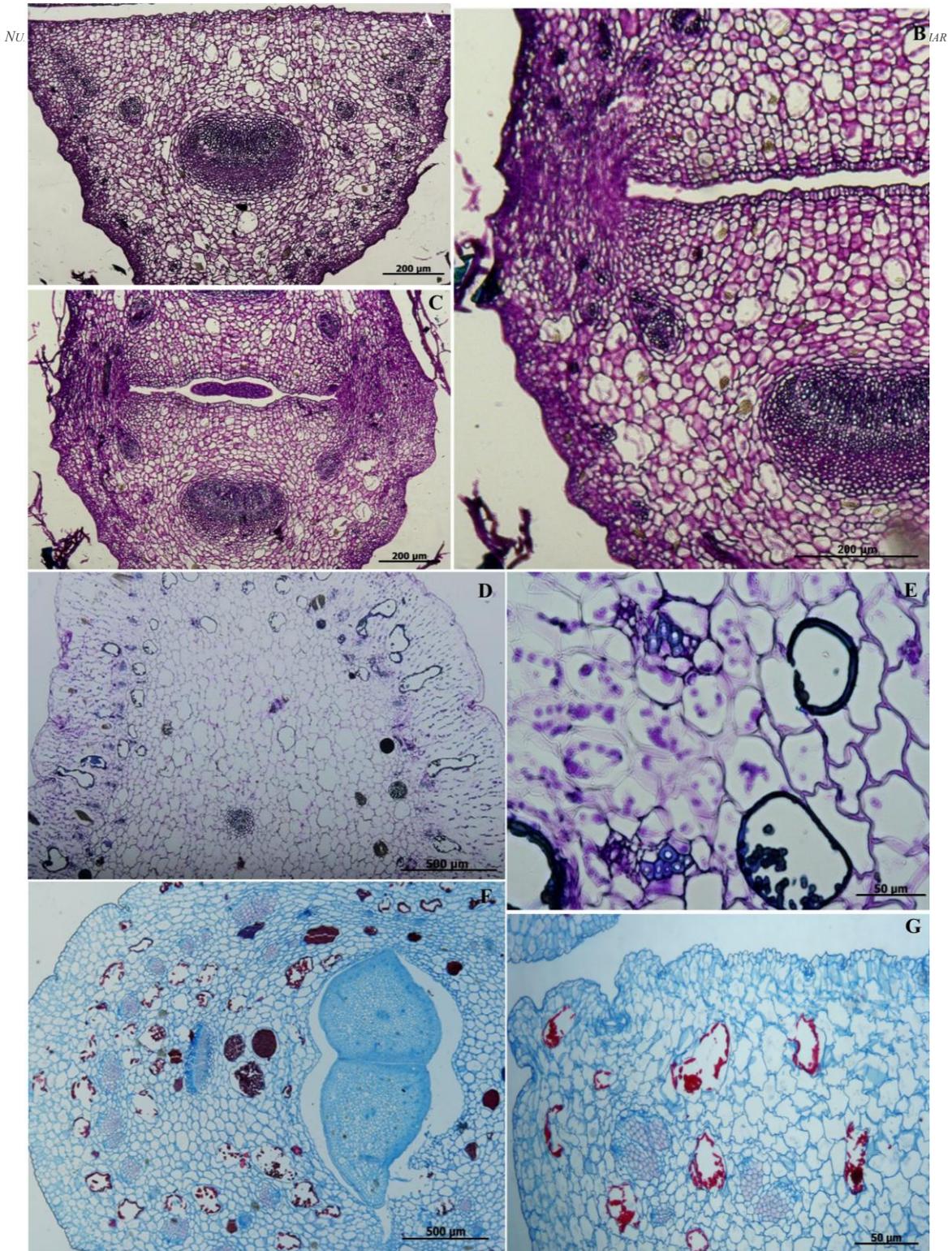


Figura 4. Seções transversais de folhas e ápices caulinares em espécies de Ruschioideae observadas sob microscopia de luz. A – região proximal da lâmina foliar de *Delosperma napiforme*, evidenciando posição dos feixes vasculares periféricos. B – base foliar de *D. napiforme*, mostrando conação entre as folhas opostas e distribuição dos feixes vasculares periféricos na face adaxial. C – ápice caulinar de *D. napiforme*, mostrando bases conadas entre folhas opostas e primórdios foliares ao centro. D – lâmina foliar de *Fenestraria rhopalophylla*. E – região adaxial da lâmina foliar de *F. rhopalophylla*, mostrando feixes vasculares periféricos com xilema endoscópico. F – ápice caulinar de *F. rhopalophylla*, mostrando primórdios foliares ao centro. G – região adaxial da lâmina foliar de *F. rhopalophylla*, mostrando feixes vasculares periféricos com xilema endoscópico.

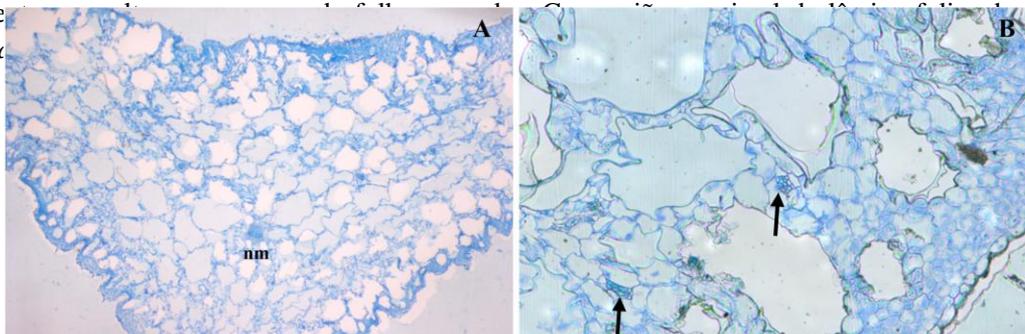


Figura 5. Seções transversais de folhas e ápices caulinares em espécies de Ruschioideae. A – lâmina foliar de *Gibbaeum velutinum*. B – região abaxial da folha de *G. velutinum*, mostrando organização dos tecidos fundamentais e feixes vasculares periféricos. C – nervura mediana da folha de *G. velutinum*. D – região adaxial da folha de *G. velutinum*. E – ápice caulinar de *G. petrense*, mostrando primórdios foliares ao centro, envolvidos por um par de folhas opostas com bases conadas. F – mesofilo de *Lithops marmorata*, mostrando disposição dos feixes vasculares periféricos; o detalhe mostra nervura mediana. G – ápice caulinar de *L. aucampiae*, com gema reprodutiva envolta por duas folhas opostas conadas. H – micrografia eletrônica de varredura de um par de folhas de *Muiria hortenseae*, com um par de folhas totalmente conadas, e apenas uma pequena fenda entre as faces adaxiais. (nm) nervura mediana. Setas indicam feixes vasculares periféricos.

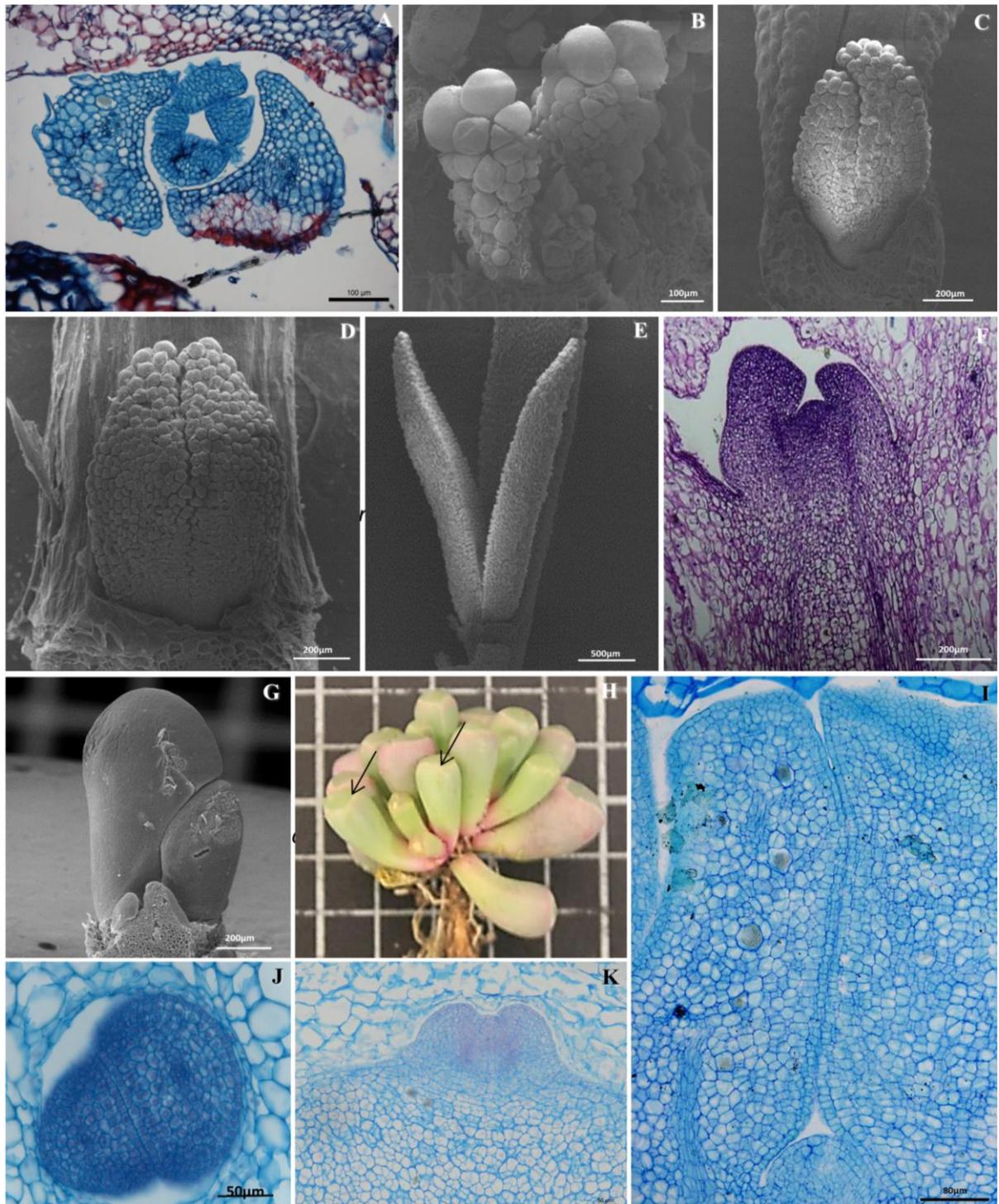


Figura 6. Primórdios foliares em diferentes espécies de Ruschioideae. A – seção transversal (s. t.) do ápice caulinar de *Cleretum lyratifolium*. B – micrografia eletrônica de varredura (MEV) do ápice caulinar de *C. lyratifolium*. C e E – MEV de ápices caulinares de *Delosperma herbeum*. D - gema axilar vegetativa de *D. herbeum*. F – seção longitudinal (s. l.) do ápice caulinar de *Fenestraria rhopalophylla*. G – MEV do ápice caulinar e de gema axilar vegetativa de *F. rhopalophylla*. H – morfologia foliar de *F. rhopalophylla*, mostrando semelhança no tamanho entre folhas opostas; (setas indicam folhas de um mesmo nó). I – s. l. do ápice caulinar de *Gibbaeum velutinum*. J - s. t. do ápice caulinar de *G. petrense*. K – s. l. da gema axilar vegetativa de *Lithops aucampiae*. (nm) nervura mediana.

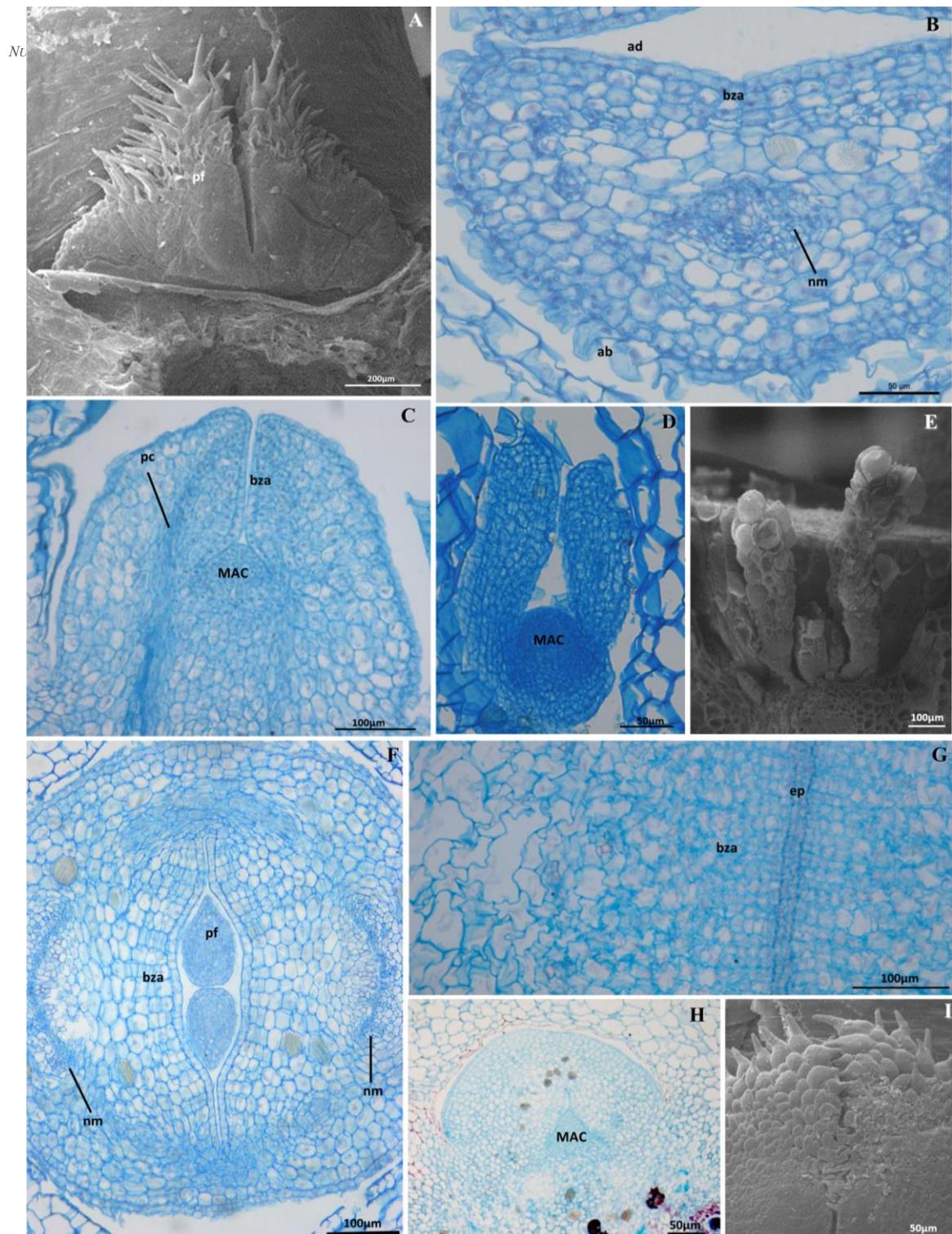


Figura 7. Atividade da blastozona adaxial em primórdios foliares em diferentes espécies de Ruschioideae. A – micrografia eletrônica de varredura (MEV) de gema axilar vegetativa de *Delosperma tradescantioides*, mostrando um par de primórdios foliares opostos com bases conadas entre si. B – seção transversal (s. t.) de uma folha em desenvolvimento de *D. napiforme*, mostrando atividade da blastozona adaxial. C e D – seções longitudinais (s. l.) de gemas axilares vegetativas de *D. napiforme* e *Cleretum lytatifolium*, respectivamente. E – MEV do ápice vaulinar de *C. lytatifolium*, mostrando dois pares de primórdios foliares. F – s. t. no ápice caulinar de *D. tradescantioides*. G – s. t. de folhas em desenvolvimento de *Lithops aucampiae*, detalhe da epiderme justaposta entre as faces adaxiais. H – s. l. do ápice caulinar de *Muiria hortenseae*. I – MEV do ápice de primordios foliares de *D. tradescantioides*. (pf) primórdio foliar; (ad) face adaxial; (ab) face abaxial; (bza) blastozona adaxial; (nm) nervura mediana; (MAC) meristema apical caulinar; (pc) cordão de procâmbio; (ep) epiderme.

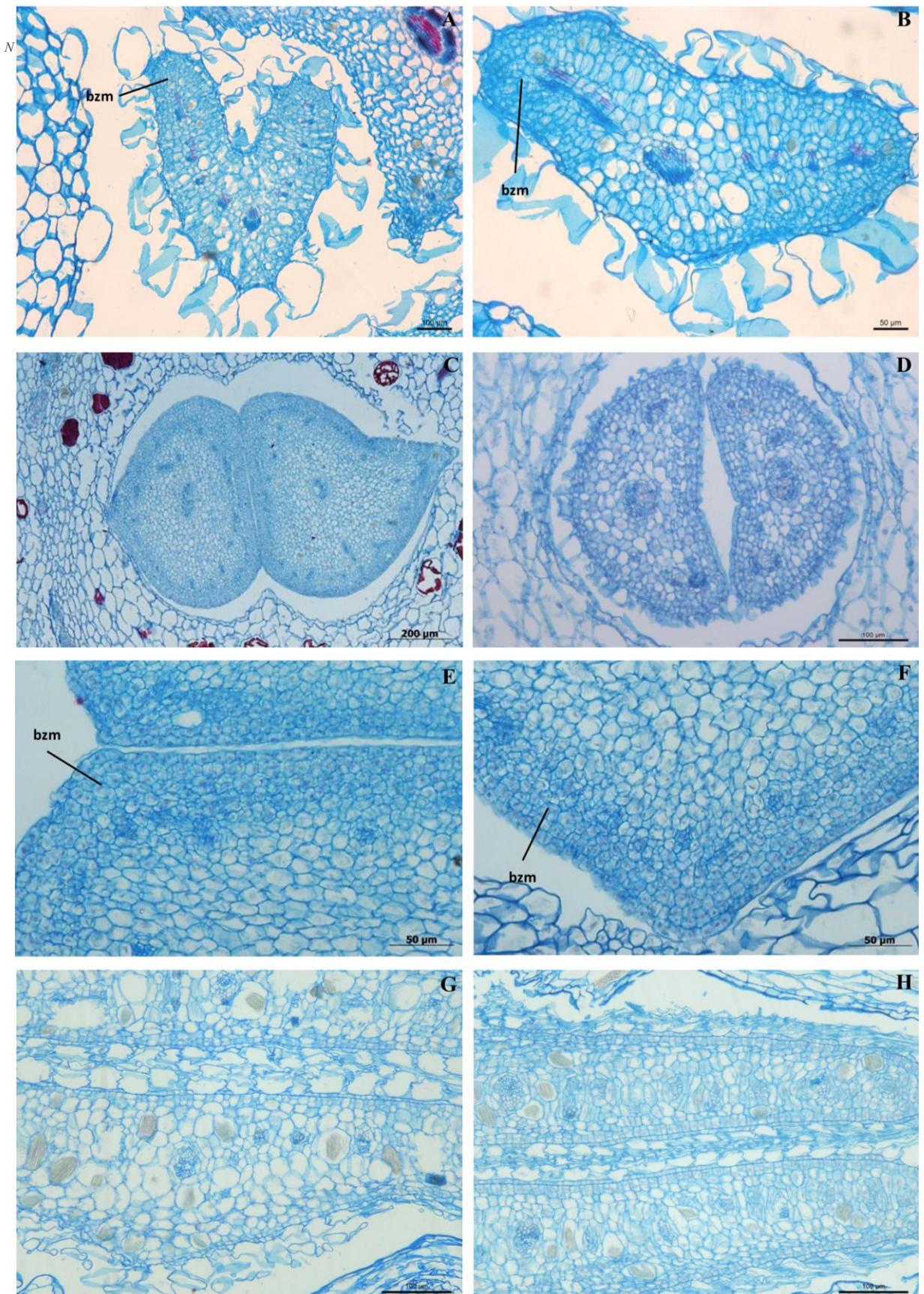


Figura 8. Atividade da blastozona marginal. A e B – seção transversal da folha em formação de *Clertum lyratifolium*. C- s. t. de folhas em formação de *Fenestraria rhopalophylla*. D – s. t. de folhas em formação de *Delosperma napiforme*. E e F – *F. rhopalophylla*, detalhe da blastozona marginal nas faces adaxial e abaxial, respectivamente. G e H – s. t. da folha em formação de *D. tradescantioides*, regiões apical e mediana das folhas, respectivamente. (bzm) blastozona marginal.

CAPÍTULO 2

WIDE-BAND TRACHEIDS EM CARYOPHYLLALES: UMA
ABORDAGEM COMPARATIVA SOB ASPECTOS MORFOLÓGICOS,
ULTRAESTRUTURAIS E MOLECULARES DA PAREDE CELULAR

Wide-band tracheids em Caryophyllales: uma abordagem comparativa sob aspectos morfológicos, ultraestruturais e moleculares da parede celular

RESUMO

A traqueíde com amplo espessamento de parede (*wide band tracheid* – “wbt”) é um tipo especializado de elemento traqueal, assim denominado, por apresentar acentuado espessamento da parede secundária. “Wbts” ocorrem em Aizoaceae, Anacampserotaceae e Cactaceae, e têm despertado interesse dos pesquisadores quanto à sua origem e função. Neste estudo analisamos as “wbts” sob aspectos anatômico, ultraestrutural e molecular da parede celular em representantes das três famílias. Nossos resultados corroboram a ocorrência de “wbts” em *Delosperma napiforme* (Aizoaceae), *Anacampseros filamentosa* (Anacampserotaceae) e *Melocactus bahiensis*, (Cactaceae), nos órgãos suculentos. A maior variedade de padrões de espessamento de parede secundária, entre os materiais analisados, ocorre no cladódio de *M. bahiensis*. O acentuado espessamento da parede secundária apresenta-se homogêneo em ultraestrutura; e a extensibilidade da parede celular primária das “wbts”, responsável por sua propriedade contrátil, é mostrada em registros anatômicos e por meio de imunomarcção de pectina. Concluimos que, embora em todas as espécies as “wbts” tenham apresentado espessamento apenas de parede secundária, em *Delosperma napiforme*, há uma constrição que deve ser melhor estudada. Quanto a função de acumular água e evitar embolismo, a flexibilidade conferida pela parede primária foi verificada nas “wbts” do material estudado. Ressaltamos, que as “wbts” medulares de *A. filamentosa*, pode ser um idioblasto traqueoidal e , portanto, não seria homóloga as “wbts” encontradas no sistemas vascular.

Palavras-chave: Aizoaceae, Anacampserotaceae, Cactaceae, anatomia, imunomarcção

Introdução

As traqueídes com amplo espessamento de parede (*wide band tracheids* – “wbts”), presentes em representantes de apenas três famílias dentro de Caryophyllales, são um tipo especializado de elemento traqueal. São assim denominadas por apresentarem acentuado espessamento da parede secundária que se projetam em direção ao lume (Mauseth *et al.* 1995; Landrum 2002; Arruda & Melo-de-Pinna 2010). “Wbts” ocorrem somente em Aizoaceae, Anacampserotaceae e Cactaceae, e têm despertado interesse dos pesquisadores quanto à sua origem e função (Landrum 2001, 2002; Mauseth *et al.* 1995; Mauseth 2004), principalmente, pelo fato de ocorrerem em plantas altamente adaptadas a ambientes xéricos (Landrum 2008).

Referidas, a princípio, como “traqueídes vasculares” (Schleiden 1845), as “wbts” foram posteriormente classificadas como “*wide-band helix tracheid*” em referência somente ao padrão helicoidal de espessamento de parede secundária (Carlquist 1975), passando a denominar-se *wide-band tracheids* a partir do trabalho de Mauseth *et al.* (1995), com base diversos padrões de espessamento. As “wbts” assemelham-se às traqueídes comuns pela ausência de perfurações, e sua parede secundária pode dispor-se nos padrões anelar, helicoidal ou dupla-hélice (Landrum 2001; Mauseth *et al.* 1995), além do anelar-helicoidal (Landrum 2001; Melo-de-Pinna *et al.* 2006).

Em Aizoaceae “wbts” ocorrem apenas nas folhas, e restringem-se à subfamília Ruschioideae (Landrum 2001). Dentre as quatro subfamílias que compõem Aizoaceae, Ruschioideae é a mais derivada e representativa em número de espécies (Klak *et al.* 2003), e comporta os gêneros que apresentam folhas com maior grau de suculência na família (Landrum 2001). Segundo Landrum (2001), as “wbts” em Aizoaceae são observadas apenas no xilema das nervuras secundárias e terciárias das folhas, sendo

ausentes na nervura central. Em Cactaceae, as “wbts” são amplamente estudadas e sua ocorrência tem sido relatada nas duas subfamílias mais derivadas, Opuntioideae e Cactoideae (Nyffeler 2002), fazendo parte do xilema primário e secundário do cladódio (Mauseth 2004, Arruda 2010, Arruda & Melo-de-Pinna 2010) e no xilema secundário das raízes tuberosas de *Arrojadoa* (Lemos 2013). Anacampserotaceae apresenta as duas situações encontradas nas famílias acima, visto que as “wbts” ocorrem na folha e no caule (Landrum 2002, 2006). No entanto, nesta família, as “wbts” da folha fazem parte do xilema na nervura central (Landrum 2006), diferentemente das Aizoaceae, onde essas células ocorrem apenas nos feixes periféricos.

As “wbts” acumulam as funções de armazenamento e transporte de água no corpo vegetal (Mauseth *et al.* 1995, 2004, Landrum 2006). Segundo (Mauseth *et al.* 1995), essas células normalmente estão preenchidas por água, e ocorrem imersas em tecidos com poucos espaços intercelulares. Como são células condutoras imperfuradas, o risco de embolia durante a condução via “wbts” é baixo, em relação à condução por vasos (Mauseth *et al.* 1995). Além disso, uma menor proporção de parede secundária, em relação a primária, confere flexibilidade à “wbt” quando as células parenquimáticas adjacentes estão murchas (Mauseth *et al.* 1995, Landrum 2006). Ao mesmo tempo, as bandas espessas mantêm o lume celular desobstruído, evitando seu colapso (Mauseth *et al.* 1995).

Marcadores moleculares para parede celular em plantas vêm sendo usados em estudos de composição de parede, auxiliando na compreensão das relações estrutura-função em tecidos vegetais (Jones *et al.* 2003). Com base em testes de imunolocalização, Godofredo (2009) constatou que as funções de armazenamento de água e de sustentação são exercidas pelas “wbts” em diferentes proporções ao longo do crescimento de *Pilosocereus aurisetus* (Cactaceae). Segundo a autora, a parede primária

da “wbt” é rica em pectina do tipo galactano durante o estágio inicial de desenvolvimento, favorecendo o armazenamento de água; por outro lado, o aumento na concentração de manano, observado nas células da porção madura do cladódio, confere maior sustentação à base da planta. A natureza hidrofílica da pectina (Willats *et al.* 2001) também pode estar envolvida na capacidade de compressão desempenhada pelas “wbts”.

A morfologia das “wbts” é bem reportada na literatura, principalmente em espécies de Cactaceae, e no que se refere à sua ocorrência e à descrição dos padrões de espessamento de parede secundária (Mauseth *et al.* 1995, Mauseth 2004, Arruda & Melo-de-Pinna 2010). Além disso, é reconhecida a importância eco-fisiológica dessas células em plantas que crescem em ambientes áridos (Landrum 2001, 2002, 2006).

Embora seja um tema conhecido na literatura das Caryophyllales, os trabalhos estão sempre limitados a um grupo de plantas em particular ou, quando fazem uma abordagem comparativa, ficam restritos apenas a discutir sua ocorrência. Diante disso, este trabalho mostra uma análise comparativa das “wbts” sob aspectos anatômico, ultraestrutural e molecular da parede celular em representantes das três famílias.

Material e métodos

Para o presente estudo foram utilizadas amostras de folhas adultas e caule de *Delosperma napiforme* Schwantes (Aizoaceae); folha e caule de *Anacampseros filamentosa* Sims (Anacampserotaceae) e cladódio de *Melocactus bahiensis* Luetzelb (Cactaceae).

Análise de microscopia de luz: amostras foram fixadas em paraformaldeído (Johansen 1940) por 48 horas e armazenadas em etanol 70%. Após a fixação, o material de *M. bahiensis* foi seccionado à mão, com auxílio de lâmina de barbear. O material de *D. napiforme* foi desidratado em série gradual etílica até 100% e mantido

por duas horas em etanol 100% e xilol 1:1, 1:3 e xilol puro para posterior infiltração em parafina (Johansen 1940). O material fixado de *A. filamentosa* também foi infiltrado em parafina, porém a desidratação foi feita em série gradual de etanol/butanol (Ruzin 1999). Dos materiais incluídos em parafina foram obtidas seções de 5 a 10 µm de espessura em micrótomo rotativo. A coloração das seções de *A. filamentosa* e *M. bahiensis* de fez-se com azul de astra e safranina ambos a 1% em etanol 50% (Bukatsch 1972, adaptado) e, em *D. napiforme*, utilizou-se azul de toluidina (O'Brien *et al.* 1965).

Análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET): porções de, aproximadamente, 2 mm do material das três espécies foram fixadas em glutaraldeído por 24 h sob refrigeração, e armazenadas em tampão fosfato salino. O material foi desidratado com série gradual etílica até 100% e incluído em resina Spurr (Ruzin, 1999). Dos moldes foram obtidos cortes semifinos (500nm), para seleção das regiões de interesse, e ultrafinos, os quais foram montados em telas de cobre e analisados em microscópio eletrônico. Algumas seções semifinas coradas com azul de toluidina (O'Brien *et al.* 1965) foram utilizadas para complementar as observações de microscopia de luz.

Imunomarcção: essa técnica foi realizada com o objetivo de visualizar pectina na parede primária das WBTs. Foram utilizadas lâminas histológicas contendo seções transversais semifinas (500 nm) do material das três espécies incluído em resina LR-White (Fluka®), segundo a metodologia de Avci *et al.* (2013). Os tecidos foram permeabilizados com solução tampão fosfato de potássio salino (KPBS, pH 7,1) e, posteriormente, incubadas em solução de bloqueio composta de soro de leite (3%) em KPBS por 30 minutos em temperatura ambiente. Depois de lavadas em KPBS, as seções foram incubadas com anticorpo primário para pectina não esterificada (JIM 5) por 1h em temperatura ambiente. Após três lavagens com KPBS aplicou-se o anticorpo

secundário contendo anti-imunoglobulina de camundongo conjugado à fluoresceína, por 1h. As seções foram novamente lavadas com KPBS e em água deionizada, a qual serviu como meio de montagem para o recobrimento com lamínula. As amostras foram imediatamente fotografadas utilizando-se filtro específico para fluoresceína, em microscópio óptico Leica®. Como controle, seções do próprio material foram submetidas ao mesmo tratamento, exceto à incubação com anticorpo primário. Para imunolocalização utilizou-se o protocolo de Avci *et al.* 2013.

Dissociação celular: a partir do material fixado em glutaraldeído, amostras das três espécies foram submetidas à técnica de maceração (Kraus & Arduin 1997), sendo mantidas em estufa a 60°C por 48h. Para *D. napiforme* foram separadas amostras da região da margem foliar (contendo feixes vasculares periféricos) e da nervura principal. Após dez lavagens (de 15 minutos de duração cada) em água destilada, o material foi embebido e armazenado em safranina (1% em álcool 50%; Kraus & Arduin 1997), para posterior montagem de lâminas semipermanentes. Com o auxílio do software ImageJ® (<http://rsbweb.nih.gov/ij>), foram feitas medições de comprimento e diâmetro em 25 “wbts” dissociadas do caule de *A. filamentosa* e *M. bahiensis* e da folha de *A. filamentosa* e *D. napiforme*.

Resultados

Os principais resultados obtidos das três espécies estão resumidos na Tabela 1.

Distribuição das traqueídes vasculares

Em *Delosperma napiforme* (fig. 1A) ocorrem “wbts” apenas nos feixes vasculares periféricos (fig. 1B – D). As células condutoras do xilema consistem unicamente de elementos de vaso na nervura mediana, (fig. 1E e F) e no caule (fig. 1G e H).

Na folha de *Anacampseros filamentosa* (fig. 2A) ocorrem “wbts” nas nervuras principal e secundárias da lâmina (fig. 2B e C), as quais convergem formando um único feixe vascular no pecíolo (fig. 2D). Em seções transversais do caule de *A. filamentosa* (fig. 2E), são observadas “wbts” no xilema primário (fig. 2F), em regiões interfasciculares (fig. 2E-H) e na medula (fig. 2F).

Em *Melocactus bahiensis*, (fig. 3A), o xilema primário e secundário do cladódio constitui-se majoritariamente por “wbts” (fig. 3B), com elementos de vaso dispersos principalmente no xilema primário (fig. 3C e D). Na figura 3D, observa-se que as “wbts” do xilema secundário originam-se, principalmente, do câmbio fascicular, havendo algumas dessas células dispersas nos raios formados pelo câmbio interfascicular (3B).

Morfologia e padrões de espessamento da parede secundária das traqueídes vasculares

Em seção longitudinal, observa-se que as “wbts” de *D. napiforme* (fig. 4A e B) e de *M. bahiensis* (fig. 4C) são células fusiformes, com maior circunferência em sua região mediana e extremidades estreitas, sendo conspícua a delimitação entre células contíguas. Na figura 4D é possível observar que a parede primária exposta entre as bandas de parede secundária é capaz de sofrer invaginação, em direção ao lume celular. Em seção transversal, as “wbts” presentes na folha de *D. napiforme* apresentam, frequentemente, parede secundária nitidamente espessa e lume celular reduzido (fig. 4E). Entretanto, essas células podem ser confundidas com elementos de vaso ao serem seccionadas em sua porção mediana, de maior circunferência (fig. 4F).

Em uma mesma região da folha, foram observadas “wbts” em estágios de desenvolvimento distintos. Tanto em seção longitudinal (fig. 4G) como transversal (fig. 4H), é possível observar “wbts” com paredes secundárias lignificadas, porém ainda

providas de protoplasto e com núcleo evidente, ao lado de “wbts” totalmente diferenciadas.

Em *D. napiforme* predominam “wbts” com padrão de espessamento de parede secundária dos tipos helicoidal (fig. 5A) e em dupla hélice (fig. 5B) e formas mistas, como o helicoidal-dupla hélice (fig. 5C). Dentre as espécies analisadas, apenas *D. napiforme* apresenta espessamento em dupla-hélice. As dimensões médias das “wbts” de *D. napiforme* são 56,84µm de comprimento e 16,25µm de diâmetro (tabela1).

Em *Anacampseros filamentosa* as “wbts” da folha e do caule apresentam morfologias distintas. Em seção longitudinal, observa-se que as “wbts” interfasciculares e medulares ocorrem em grande quantidade e são maiores e mais globosas quando comparadas com as da folha. As células presentes no caule são pouco alongadas, com comprimento médio de 67,94µm, e largura média de 41,74µm, em comparação com as localizadas nas folhas (93,79µm de comprimento e 22,69µm de largura). As “wbts” de *A. filamentosa* exibem bandas de parede secundária arranjadas predominantemente em padrão anelar na folha (fig. 5D) e no caule (fig. 5E), embora tenham sido observadas células com anéis unidos entre si (fig. 5F).

As “wbts” do cladódio de *Melocactus bahiensis* são maiores quando comparadas às observadas nas outras duas espécies, com médias de 196,181µm de comprimento e 51,65µm de largura, e exibem espessamentos nos padrões anelar (fig. 5G), helicoidal (fig. 5H), helicoidal-dupla hélice (fig. 5I) e anelar-helicoidal (fig. 5J). Na figura 5J nota-se o caráter flexível da parede primária da “wbt”, que fica exposta entre as bandas de parede secundária.

Ultraestrutura da parede celular das *wide-band tracheids*

A partir do material processado, foi possível analisar apenas amostras da folha de *Delosperma napiforme* e do caule de *Anacampseros filamentosa*. A ultraestrutura

mostra em maior detalhe a diferença da espessura da parede celular secundária em relação ao lume celular entre elementos de vaso (fig. 6A) e de “wbts” (fig. 6B), e distinção nítida entre a parede primária e a parede secundária. Nas traqueídes presentes na folha de *D. napiforme*, observamos uma constrição presente na região limítrofe entre as duas paredes, evidenciada em seção longitudinal (fig. 6C e D), característica não observada nas “wbts” do caule de *Anacampseros filamentosa* (fig. 6E). Em *A. filamentosa*, observamos “wbts” em fase de síntese de parede secundária e protoplasto presente, como mostra a figura 6E.

Imunolocalização

A análise de imunolocalização (fig. 7) mostra que o material incubado com anticorpo para pectina não esterificada (JIM 5) apresenta marcação apenas da parede celular primária tanto de células parenquimáticas quanto das traqueídes vasculares observadas em todos os materiais analisados.

Tabela 1. Medições (média e desvio padrão) de comprimento (C) e diâmetro (D), e os padrões de espessamento de parede secundária observados em *wide-band tracheids* (“WBT”) das três espécies estudadas.

Espécies	“WBT” folha			“WBT” caule		
	C (µm)	D (µm)	Padrão de espessamento da parede secundária	C (µm)	D (µm)	Padrão de espessamento da parede secundária
<i>Anacampseros filamentosa</i>	93,79 ± 33,42	22,69 ± 4,13	anelar helicoidal	67,94 ± 16,25	41,74 ± 11,52	anelar
<i>Delosperma napiforme</i>	56,84 ± 12,55	16,25 ± 4,23	helicoidal dupla-hélice helicoidal-dupla-hélice	-	-	-
<i>Melocactus bahiensis</i>	-	-	-	196,181 ± 51,824	51,65 ± 12,07	anelar helicoidal anelar-helicoidal helicoidal-dupla-hélice

Discussão

A principal característica que define as plantas suculentas reside na sua capacidade de absorver e armazenar água em grande quantidade, garantindo sua disponibilidade nos períodos de estiagem, normalmente prevalentes em seu habitat (Fahn & Cutler 1992). Além da pequena razão superfície/volume e da presença de tecido aquífero, outros atributos podem vincular-se à suculência, tal como a ocorrência de *wide band tracheids* - “wbts” em Aizoaceae, Anacampserotaceae e Cactaceae (Mauseth *et al.* 1995, Landrum 2001, 2006).

A ocorrência de “wbts” vincula-se ao desenvolvimento de órgãos suculentos (Landrum 2002), conforme observamos nas três espécies analisadas no presente estudo: restringindo-se às folhas em *D. napiforme* (Aizoaceae), ocorrendo na folha e no caule de *A. filamentosa* (Anacampserotaceae), e constituindo grande parte do sistema vascular no cladódio de *M. bahiensis* (Cactaceae). Embora a maioria dos registros de “wbts” em Cactaceae seja no cladódio, Lemos & Melo-de-Pinna (2013) observou sua ocorrência em raízes contráteis de *Arrojadoa*. Segundo a autora, as propriedades desse tipo de traqueíde evitam seu colapso, além de formarem uma rede de reforço durante a contração da raiz. Dessa forma, sugere-se que as “wbts” não estejam associadas apenas a órgãos suculentos, mas a estruturas passíveis de deformação elástica, como ocorre no murchamento temporário.

Na folha de *Delosperma napiforme*, a ocorrência de “wbts” apenas nos feixes vasculares periféricos, corrobora as observações de Landrum (2001), e a ausência dessas células na nervura mediana pode estar relacionada com a não ocorrência no xilema primário do caule. Durante a ontogênese foliar, o primeiro cordão de procâmbio formado, precursor da nervura mediana da folha, participa da constituição do estelo (Beck 2010), e os tecidos da margem foliar formam-se a partir de células

produzidas posteriormente (Esau 1977, Kaplan 2001, Beck 2010). Segundo Nunes & Melo-de-Pinna (em preparação), os feixes vasculares periféricos das folhas em Aizoaceae desenvolvem-se a partir da atividade da blastozona marginal (Hagemann & Gleissberg 1996), e sua histogênese é posterior à diferenciação das células condutoras da nervura mediana. Dessa forma, a ocorrência de “wbts” apenas nos feixes periféricos em *D. napiforme* não implica em sua presença no xilema primário do caule. Por outro lado, em *A. filamentosa*, observamos “wbts” nas nervuras mediana e secundárias da folha e no xilema primário do caule, demonstrando a comunicação do sistema vascular entre a nervura central da folha e os feixes vasculares do caule.

A distribuição de “wbts” na folha em *Anacampseros* é comumente reportada apenas nas nervuras secundárias e, ocasionalmente, no feixe vascular central (Landrum 2006). Ainda de acordo com o autor, na espécie sem “wbts” na nervura central, esse tipo de célula não ocorre no xilema primário do caule, localizando-se externamente ou adjacente ao xilema primário; compondo raios ou dispondo-se dispersas na medula. Em *A. filamentosa*, observamos que o arranjo das “wbts” no xilema secundário e na medula assemelha-se ao registrado por Landrum (2006), no entanto, destacamos a ocorrência de “wbts” perimedulares, localizadas em meio às células parenquimáticas do xilema primário. Embora no presente trabalho, o termo “wbt” tenha sido adotado para as células medulares, um estudo ontogenético deve ser realizado, comprovando sua origem vascular. Boke (1944) sugere que “wbts” medulares em Cactaceae originam-se do meristema fundamental, entretanto, segundo definição de Landrum (2006) essas células denominam-se idioblastos “wbt” quando não são derivadas de procâmbio ou do câmbio vascular. Ressaltamos que, embora Landrum (loc. cit.) tenha proposto este termo, não foi baseado em estudo

ontogenético, mas apenas na diferença morfológica e na posição das “wbts” medulares e as vasculares.

Em *A. filamentosa*, as “wbts” caulinares estão dispostas de maneira semelhante à descrita por Arruda (2010) em Opuntioideae (Cactaceae). Segundo a autora, as “wbts” perimedulares, associadas ao xilema primário têm origem procambial, e as do xilema secundário formam-se a partir de iniciais radiais e fusiformes do câmbio. Embora não tenha sido feito um estudo ontogenético no presente estudo, as “wbts” perivasculares do xilema primário de *A. filamentosa*, provavelmente, diferenciam-se de procâmbio, como em Opuntioideae (Arruda 2010).

Com relação aos padrões de espessamento da parede secundária de “wbts”, observamos as formas anelar, helicoidal e dupla-hélice descritas na literatura (Mauseth 1995) e formas mistas, como as documentadas em Cactaceae (Melo-de-Pinna *et al.* 2006). Em *Delosperma napiforme* verifica-se predominância de espessamento helicoidal e em dupla hélice, embora Landrum (2001) tenha observado em diversos outros gêneros de Ruschioideae predomínio de espessamento anelar e helicoidal e, raramente, espessamento em dupla-hélice. Em Anacampserotaceae, os espessamentos anelar, helicoidal e em dupla hélice são descritos (Landrum 2006), embora, no presente estudo, apenas a forma anelar tenha sido observada na folha e no caule de *A. filamentosa*, com a presença de algumas variações que não se enquadram nos padrões descritos.

A maior diversidade de padrões de espessamento entre os materiais analisados ocorre no cladódio de *M. bahiensis*. Estudos de ontogênese mostram que “wbts” com diferentes padrões de espessamento formam-se ao longo do desenvolvimento do cladódio em Cactaceae. Segundo Arruda (2010), na porção apical, mais jovem, do cladódio de *Opuntia* predominam os padrões anelar e helicoidal, sendo observado

espessamento em dupla-hélice apenas na base do órgão. Godofredo (2009) observa em *Psilocereus aurisetus* que a sequência de diferenciação nas “wbts” segue o mesmo padrão de elementos de vaso (anelar, helicoidal, escalariforme), sendo as formas em dupla-hélice análogas ao escalariforme. Em *M. bahiensis* as “wbts” com vários tipos de espessamentos foram encontradas em uma mesma porção do cladódio, retirada de sua região mediana.

O tipo de espessamento dessas células influencia na função de sustentação por elas promovida, especialmente no caso do cladódio: ao mesmo tempo em que na base as formas helicoidais e em dupla-hélice auxiliam na sua sustentação, nas regiões mais jovens, que estão em intenso processo de alongamento, predominam “wbts” anelares, mais extensíveis (Godofredo 2009, Arruda 2010). Um estudo ontogenético poderia confirmar essa tendência em *M. bahiensis*.

Em Cactaceae, as “wbts” acumulam as funções tanto de condução quanto de sustentação (Mauseth *et al.* 1995, 2004, Godofredo 2009, Arruda & Melo-de-Pinna 2010), e em *M. bahiensis* essas células constituem grande parte do cladódio. No caso de *A. filamenosa* são poucas as “wbts” observadas no xilema primário do caule e na medula, e a maioria dessas células forma-se posteriormente, no crescimento secundário. Da mesma maneira, na folha de *D. napiforme* essas células compõem o xilema apenas dos feixes vasculares periféricos das folhas, não sendo encontradas na nervura central e no caule. A maior variedade de tipos de espessamento de parede secundária, observada em Cactaceae, pode ser um reflexo da importância desse tipo de célula ao longo de todo o seu desenvolvimento e na fase adulta do cladódio.

Segundo Carlquist (1975), a presença de elementos traqueais com espessamentos helicoidal e anelar de parede secundária, associados à ausência de fibras, possibilita a contração dos tecidos, sem que haja colapso de suas células

condutoras. No caso das “wbts”, sua propriedade de contração é possível devido à área de parede primária que fica exposta entre as bandas de parede secundária (Mauseth 1995, 2004). A parede primária é rica em polímeros de pectina, (Buchanan 2000), um grupo de polissacarídeos que, ligados entre si, formam uma rede na parede celular (Willats *et al.* 2001). Essa rede de pectinas confere à célula propriedades mecânicas e de porosidade, além de favorecer a hidratação da matriz extracelular (Willats *et al.* 2001). A presença de pectinas é de reconhecida importância para sobrevivência em ambientes xéricos, por sua natureza hidrofílica (Esau 1965, Fahn 1974).

Nos órgãos suculentos, grande parte do tecido fundamental constitui-se de parênquima aquífero. Sendo composto por células bastante expandidas, esse tecido caracteriza-se por sua extensibilidade, propriedade que envolve a presença de pectinas na parede celular (Buchanan 2000, Mastroberti & Mariah 2008, Godofredo 2009). Nossa análise de imunomarcagem nos órgãos suculentos mostra que as paredes primárias de “wbts” e das células parenquimáticas exibem marcação de pectina em intensidades semelhantes. Esse resultado sugere que as “wbts” e as células parenquimáticas assemelham-se quanto à presença de pectina na parede primária (Knox *et al.* 1990). Assim como no trabalho de Godofredo (2009), nossos resultados reforçam a propriedade extensível da “wbt”, corroborando as descrições anatômicas sobre esse atributo.

A análise de ultraestrutura mostrou que o espessamento das bandas ocorre por um aumento na deposição de parede secundária, de forma homogênea durante a xilogênese. Essa análise permitiu também constatar a presença de protoplasto (em uma célula com parede secundária) durante a formação de uma “wbt” em *Anacampseros filamentosa*, complementando a observação anatômica feita em

Delosperma napiforme. Embora seja considerada uma variação da traqueíde comum (Mauseth 1995), Van Tieghen (*apud* Boke 1944) citou a ocorrência de núcleo em “wbt”, sugerindo que essas células mantivessem seus protoplastos na maturidade.

A parede secundária da “wbt” de *D. napiforme* apresenta uma constrição na porção próxima à parede primária, observada nas micrografias eletrônicas de transmissão. Essa constrição não foi observada na “wbt” de *A. filamentosa*, entretanto, com os dados disponíveis, não é possível afirmar se esse caráter é pontual de *D. napiforme*, ou se ocorre apenas em representantes da família Aizoaceae. Existe, ainda, a possibilidade da constrição estar relacionada ao espessamento de parede secundária do tipo helicoidal, visto que a célula analisada de *A. filamenosa* apresenta espessamento anelar. A análise de mais espécies possibilitaria alguma inferência a respeito.

A partir dos estudos realizados sobre a morfologia, ultraestrutura e marcador molecular de parede nas três espécies selecionadas, concluímos que a definição de “wbt” *sensu* Mauseth *et al.* (1995), que este tipo de célula caracteriza-se pelo amplo espessamento de parede secundária, deve ser mantida nas famílias. No entanto, destacamos a possibilidade de que idioblastos traqueoidais ocorram na região de medular de algumas espécies. Uma vez comprovada a origem não vascular deste tipo de célula, as homologias previamente estabelecidas, devem ser revistas.

Referências

ARRUDA, E. & MELO-DE-PINNA, G.F.A. 2010. Wide-band tracheids in the photosynthetic and non-photosynthetic stem in species of Cactaceae. *The Journal of the Torrey Botanical Society*

- ARRUDA, E. 2010. *Histogênese de segmentos caulinares de espécies de Opuntioideae (Cactaceae)*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- AVCI, U., PATTATHIL, S., HAH, M.G. 2013. Immunological Approaches to Plant Cell Wall and Biomass Characterization: Immunolocalization of Glycan Epitopes. In: Michael E. Himmel (ed.), *Biomass Conversion: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, v. 908.
- BECK, C. B. 2005. *An Introduction to Plant Structure and Development*. Cambridge University Press, 431p.
- BOKE, N.H. 1944. Histogenesis of the Leaf and Areoles in *Opuntia cylindrica*. *American Journal of Botany* 31: 299-316.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSSEN, W.; JONES, R. L. 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists.
- CARLQUIST, S. 1975. *Ecological strategies of xylem evolution*. University of California Press. Berkeley and Los Angeles, California.
- ESAU, K. 1965. *Plant Anatomy*. 2 ed. Wiley International Edition, New York.
- ESAU, K., 1977. *Anatomy of the Seed Plants* 2nd ed., John Wiley & Sons.
- FAHN, A. & CUTLER, D.F. 1992. *Xerophytes*. Gerbrüder Borntraeger. Berlin.
- GODOFREDO, V. 2009. *Ontogênese, função e evolução das traqueídes vasculares em Cactaceae, tendo como modelo o cacto colunar de Pilosocereus aurisetus (Werderh.) Byles & G.D.Rowley*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo.

- HAGEMANN, W. & GLEISSBERG, S., 1996. Organogenetic capacity of leaves : the significance of marginal blastozones in angiosperms. *Plant Systematics and Evolution*, 199, pp.121–152.
- JOHANSEN, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book Co. 523p.
- JONES, L.; MILNE, J.L.; ASHFORD, D. & MCQUEEN-MASON, S.J. 2003. *Cell wall arabinan is essential for guard cell function*. Proceedings of the National Academy of Sciences 100(20):11783-8.
- KLAK, C.; KHUNOU, A; REEVES, G; HEDDERSON, T. 2003. A Phylogenetic Hypothesis for the Aizoaceae (Caryophyllales) Based on four plastid DNA Regions. *American journal of botany*, 90(10), pp.1433–1445.
- KNOX, P. J. LINSTEAD, J. K., COOPER, C., ROBERTS, K. 1990. Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta* 181:512-521.
- KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. 1997. *Manual Básico de Anatomia Vegetal*. Ed. Universidade Rural, Rio de Janeiro.
- LANDRUM, J.V. 2001. Wide-band tracheids in leaves of genera in Aizoaceae the systematic occurrence of a novel cell type and its implications for the monophyly of the subfamily Ruschioideae. *Plant Systematic Evolution* 227: 49-61
- LANDRUM, J.V. 2002. Four succulent families and 40 million years of evolution and adaptation xeric environments: What can stem and leaf anatomical characters tell us about their phylogeny? *Taxon* 51: 463-473.

- LANDRUM, J.V. 2006. Wide-band tracheids in genera of Portulacaceae: novel, non xyrary tracheids possibly evolved as an adaptation to water stress. *Journal Plant of Research* 119: 497-504
- LANDRUM, J.V. 2008. Wide-band tracheide from a southern African succulent and their responses to varying light intensities: a pre-adaptation for future water stress? *International Journal of Botany* 4: 99-103.
- LEMOS, R.C.C., Machado, M.C., Melo-de-Pinna, G.F.A. 2013. Morpho-anatomical diversity of the underground system of *Arrojadoa* (Cactaceae), an endemic Brazialian genus. *Botanical Journal of the Linnean Society* (no prelo 12077).
- MASTROBERTI, A.A. & MARIATH, J.E.A. 2008. Immunocytochemistry of the mucilage cells of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 31: 1-13.
- MAUSETH, J. & LANDRUM, J.V. 1997. Relictual vegetative anatomical characters in Cactaceae: the genus *Pereskia*. *Journal of Plant Research* 110: 55-64.
- MAUSETH, J.D. 2004. Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae. *Journal of Plant Research* 117: 69-76. MAUSETH, J. 1989. Comparative structure-function studies within a strongly dimorphic plant, *Melocactus inortus* (Cactaceae). *Bradleya* 7: 1-12.
- MAUSETH, J.D.; UOZUMI, Y.; PLEMONS, B.J. & LANDRUM, J.V. 1995. Structural and systematic study of an unusual tracheid type in cactic. *Journal of Plant Research* 108: 517-526.

MELO-DE-PINNA, G.F.A.; ARRUDA, E.C. & ABREU, D.D. 2006. Wide band tracheids in Brazilian cacti. *Bradleya* 24: 53-60.

MELO-DE-PINNA, G.F.A.; ARRUDA, E.C. & ABREU, D.D. 2006. Wide band tracheids in Brazilian cacti. *Bradleya* 24: 53-60.

NUNES, A. S. & MELO-DE-PINNA, G. F. A. Ontogênese foliar de Ruschioideae (Aizoaceae). Em preparação.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N. & McCULLY, M.E. 1965. *Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue*. *Protoplasma* 59: 367-373.

RUZIN, S.E. 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press, New York. 322p.

SCHLEIDEN, M.J. 1845. Beiträge zur Anatomie der Cacteen. *Mémoires de l'Académie Imperiale des Sciences de Saint Petersburg* 4: 335-380.

WILLATS, W.G.T.; MCCARTNEY, L.; MACKIE, W. & KNOX, J.P. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* 47: 9-27.

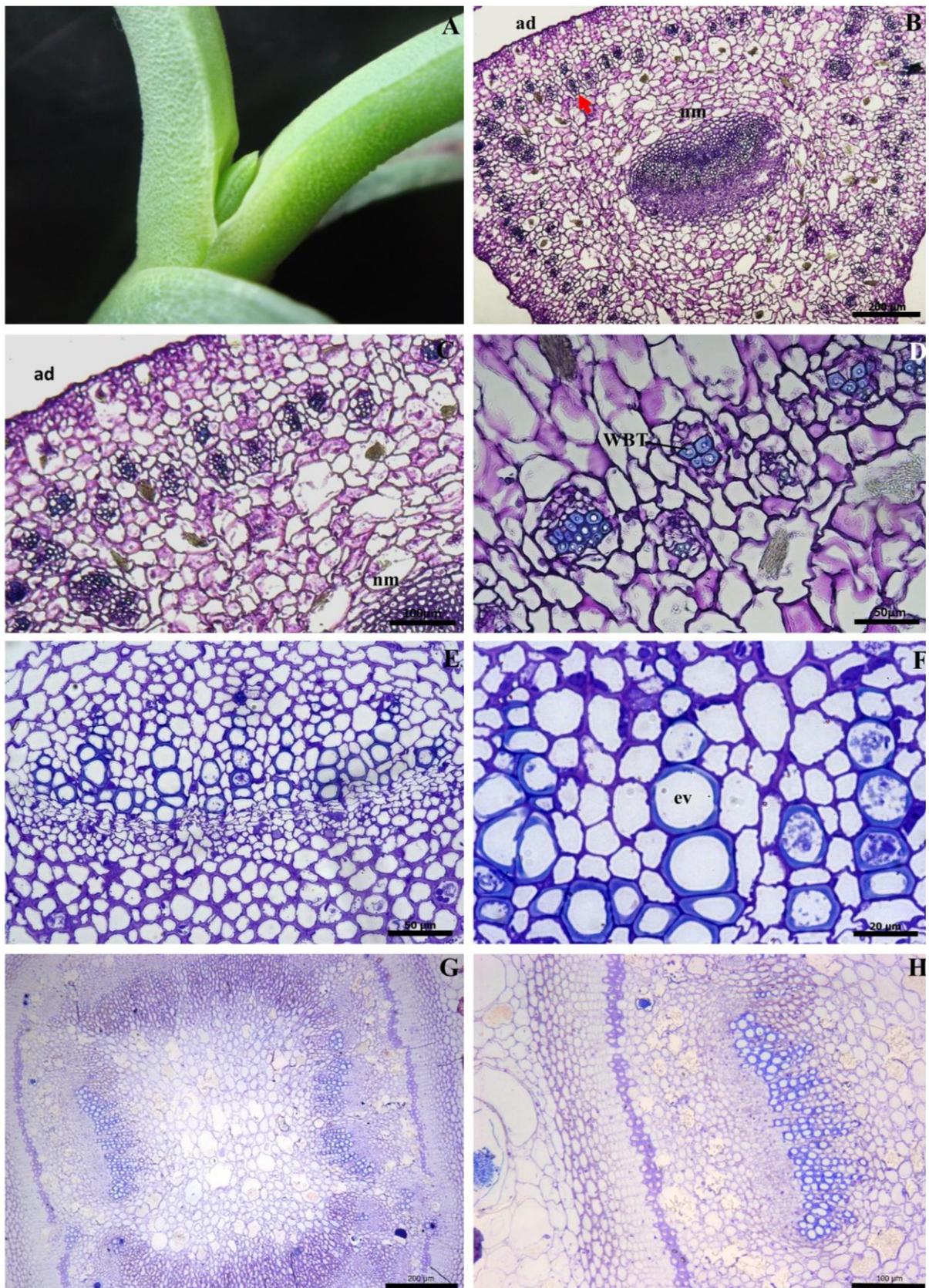


Figura 1. Morfologia e anatomia da folha e do caule de *Delosperma napiforme*. A – morfologia do ápice caulinar, com filotaxia oposta cruzada e bases foliares conadas. B – seção transversal (s. t.) da folha, aspecto geral. C – detalhe da s. t. da folha, mostrando feixes vasculares periféricos próximos à superfície adaxial. D – feixes vasculares periféricos com xilema composto por *wide-band tracheids* (WBTs). E – nervura mediana da folha. F – detalhe da nervura mediana, mostrando elementos de vaso. G – s. t. do caule, mostrando região do cilindro vascular. H – detalhe do caule, mostrando xilema composto por elementos de vaso. (ad) superfície adaxial; (nm) nervura mediana; (seta) feixes vasculares periféricos; (ev) elemento de vaso.

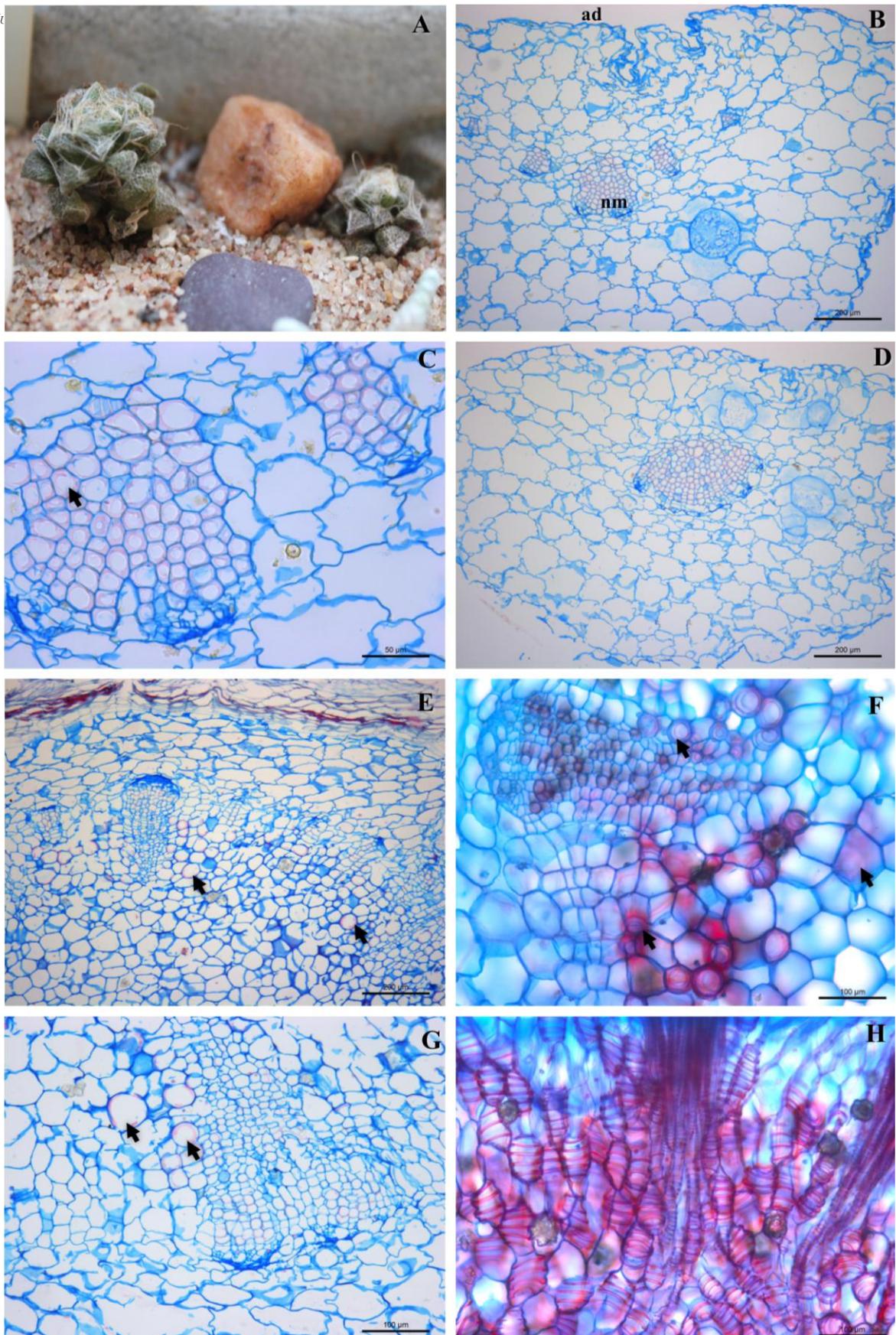


Figura 2. Distribuição das *wide-band tracheids* (wbts) em *Anacampseros filamentosa* (Anacampserotaceae). A – morfologia de *A. filamentosa*. B – seção transversal (s. t.) da lâmina foliar. C – s. t. do pecíolo. D – detalhe da s. t. da lâmina foliar, mostrando nervuras mediana e secundária. E–G s. t. do caule. H – seção longitudinal do caule, na região do cilindro vascular. (ad) face adaxial da folha; (nm) nervura mediana da folha. Setas indicam wbts.

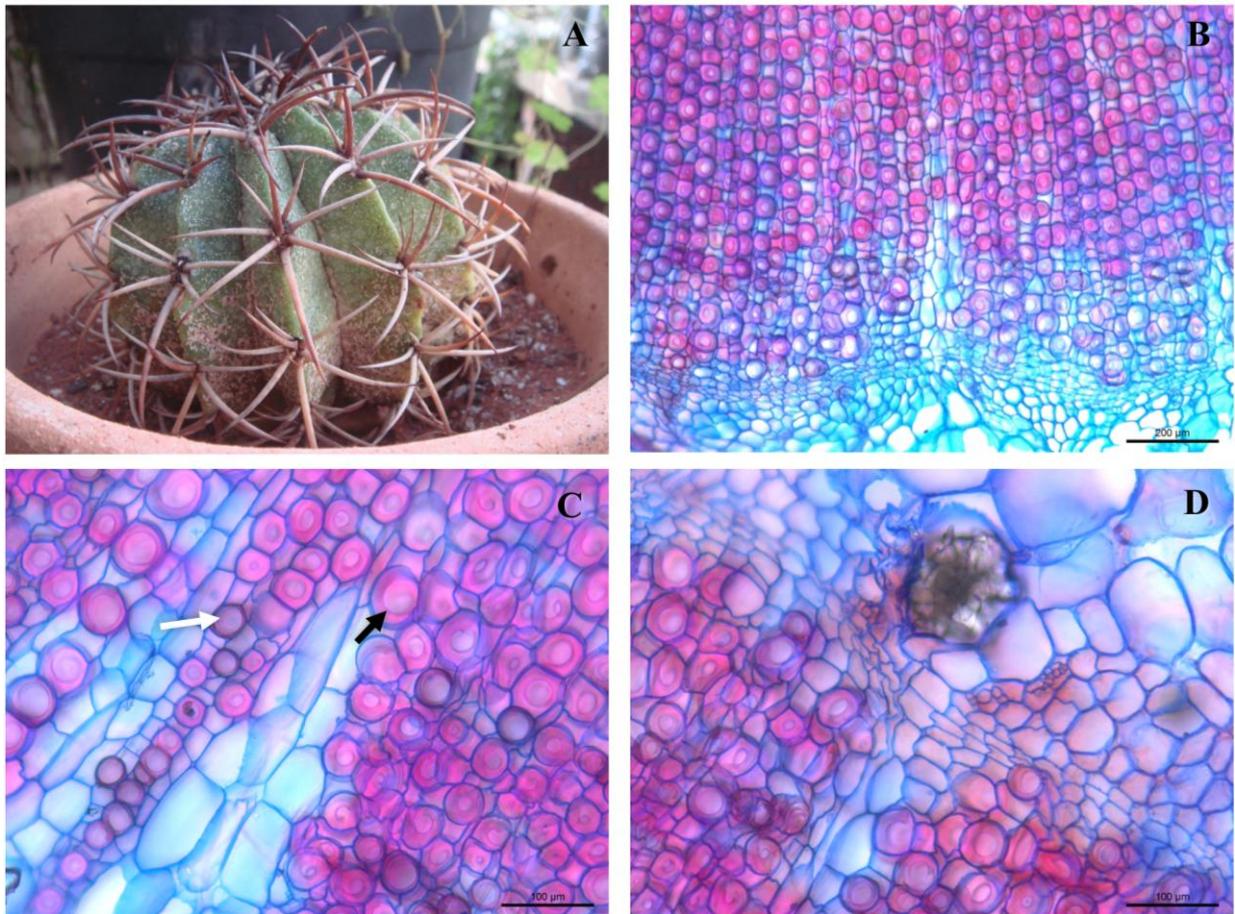


Figura 3. Distribuição das *wide-band tracheids* (WBTs) no cladódio de *Melocactus bahiensis*. A – morfologia de *M. bahiensis*. B – Secção transversal (s. t.) de parte do cilindro vascular do cladódio. C – detalhe da s. t. do cladódio mostrando região do xilema primário. D – detalhe da s. t. do cladódio mostrando região do câmbio vascular. Seta preta indica wbt; seta branca indica elemento de vaso.

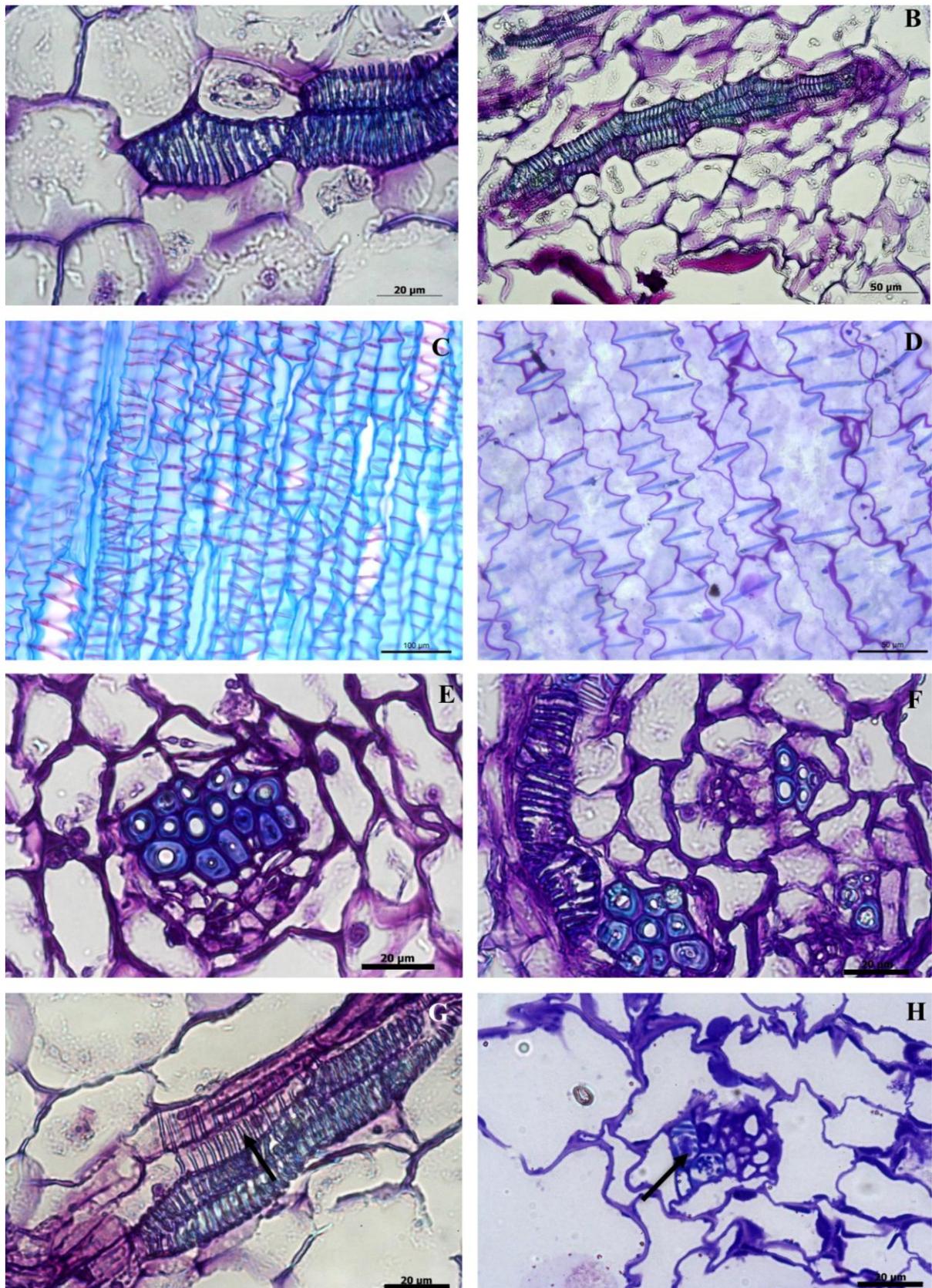


Figura 4. Morfologia das *wide-band tracheids* (wbts) presentes folha de *Delosperma napiforme* (Aizoaceae) e no cladódio de *Melocactus bahiensis* (Cactaceae). A e B –wbts presentes nos feixes vasculares periféricos observadas em plano longitudinal. C e D – wbts presentes no cladódio de *M. bahiensis* observadas em plano longitudinal. E e F – aspecto das wbts de *D. napiforme* em seção transversal. G e H – wbts em formação na folha de *D. napiforme* em seções longitudinal e transversal, respectivamente. Setas indicam células com parede secundária lignificada e protoplasto presente.

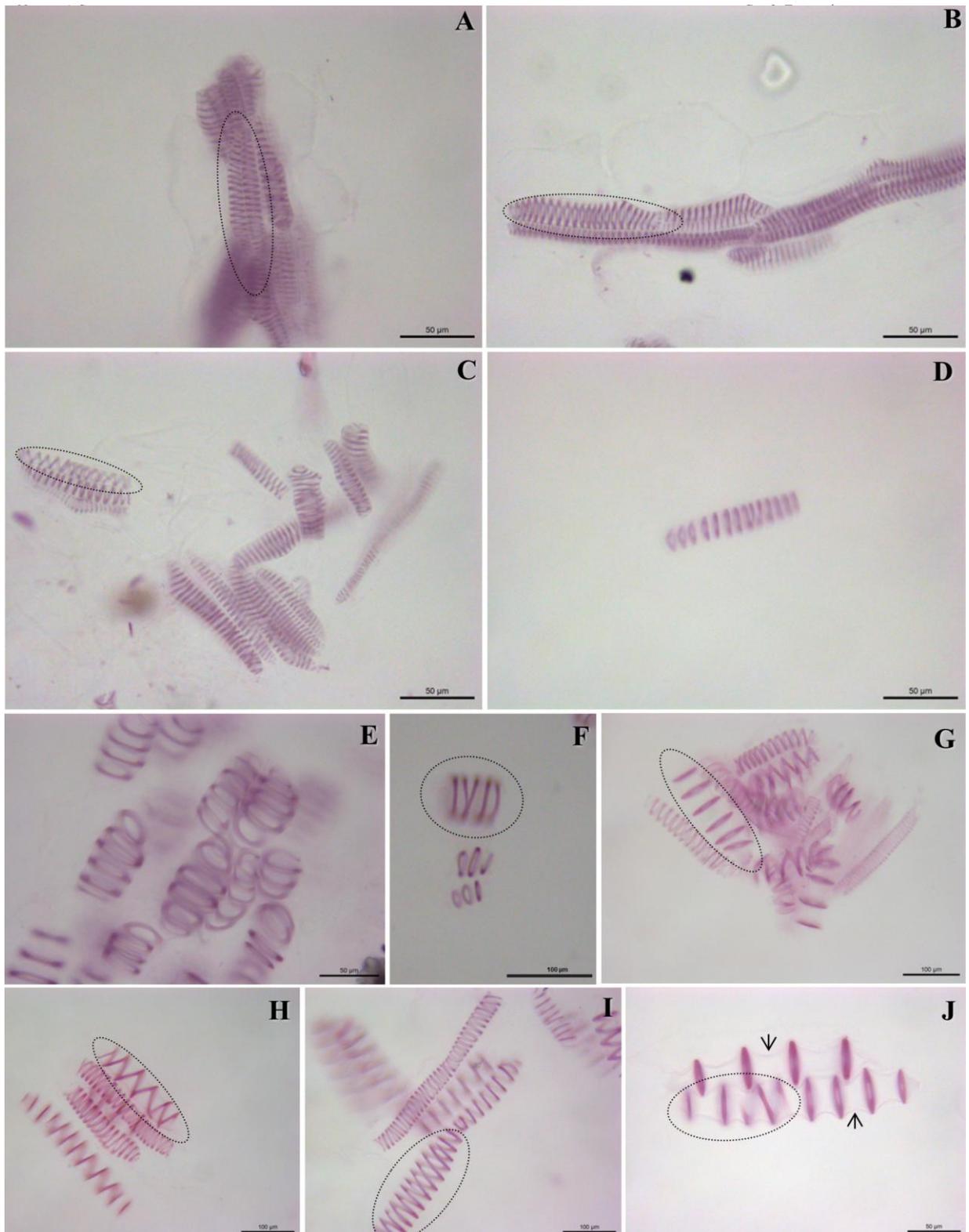


Figura 5. Tipos de espessamento de parede secundária encontrados em *wide-band tracheids* (wbts) presentes em material dissociado. A-C – folha de *Delosperma napiforme* (Aizoaceae): A - destaque para wbt com espessamento do tipo helicoidal; B – espessamento em dupla hélice; C – espessamento helicoidal-dupla hélice. D - folha de *Anacampseros filamentosa*, espessamento anelar. E-F – caule de *A. filamentosa*: E – espessamento anelar; F – espessamento anelar, com anéis unidos. G-J – cladódio de *Melocactus bahiensis*: G – espessamento anelar; H – espessamento helicoidal; I – espessamento em dupla hélice; J – espessamento anelar-helicoidal. Setas indicam invaginação da parede primária em direção ao lume celular.

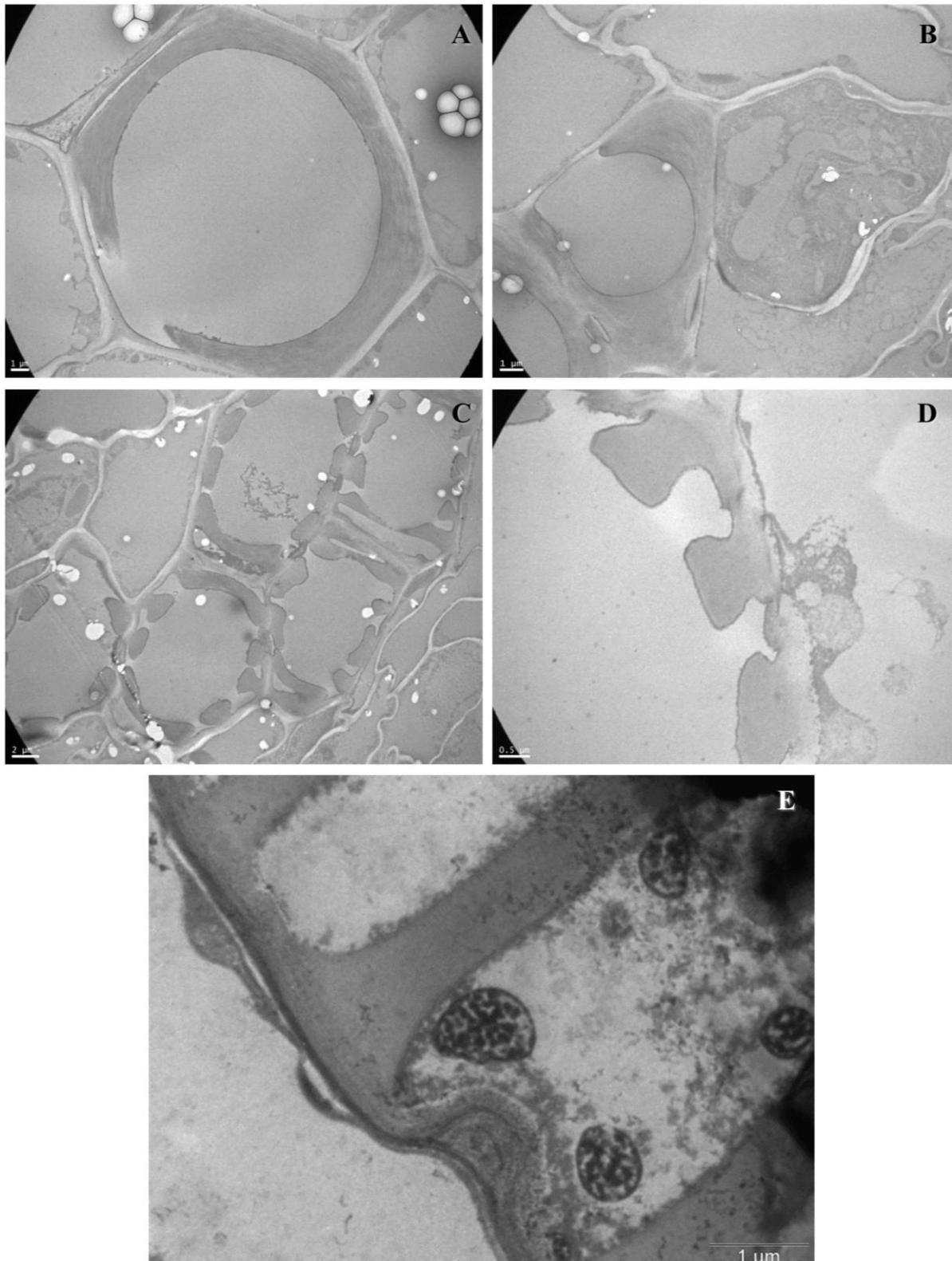


Figura 6. Micrografias eletrônicas de transmissão de elementos traqueais. A – elemento de vaso da folha de *Delosperma napiforme* observado em seção transversal (s. t). B – *wide-band tracheid* (wbt) da folha de *D. napiforme* observada em s. t. C e D – wbt's da folha de *D. napiforme* observadas em seção longitudinal (s. l.). E – wbt do caule de *Anacampseros filamentosa* observada em s. l., com bandas de parede celular secundária e protoplasto presente.

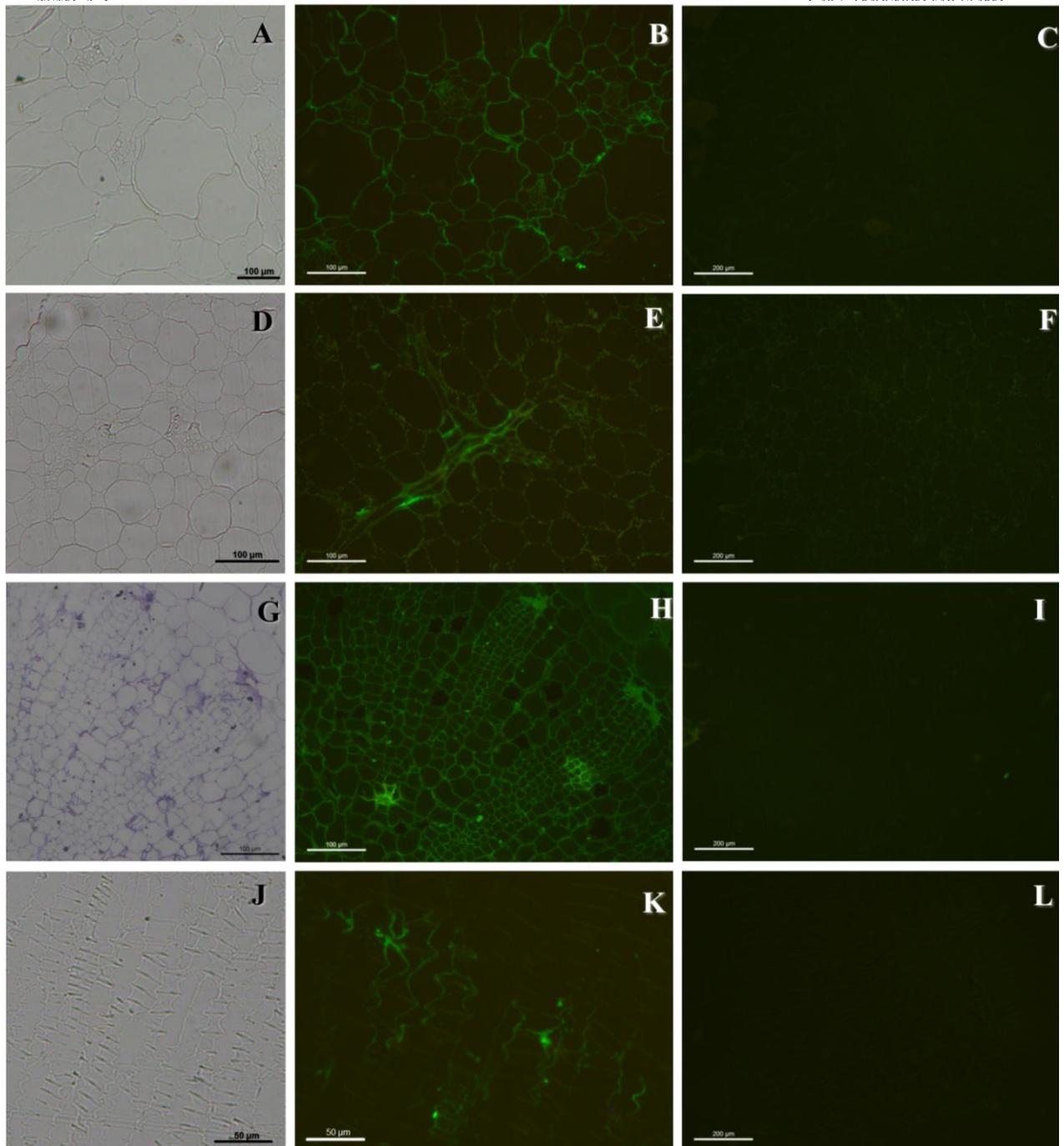


Figura 7. Teste de imunomarcção com anticorpo para pectina (JIM5). Cada material, é observado sob microscopia de luz, microscopia de floorescência com anticorpo JIM 5 e microscopia de fluorescência do controle, respectivamente. A-C – seção transversal (s. t.) da folha de *Delosperma napiforme*. D-F – s. t. da folha de *Anacampseros filamentosa*. G-I – s. t. do caule de *A. filamentosa*. J-L – seção longitudinal do cladódio de *Melocactus bahiensis*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O primeiro passo na elaboração deste projeto partiu da ocorrência de grande diversidade na morfologia foliar em Ruschioideae, um grupo de diversificação recente. A princípio, o projeto previa investigar a atuação das diferentes regiões de crescimento durante a morfogênese de diferentes tipos foliares. A partir das informações morfoanatômicas de folhas adultas, envolvendo a descrição de feixes vasculares periféricos com xilema endoscópico em folhas com simetria radial, estruturou-se o projeto, com o objetivo de fornecer evidências anatômicas da formação, e posterior perda, da identidade adaxial/abaxial durante o desenvolvimento foliar em Aizoaceae.

As contribuições do primeiro capítulo incluem o estudo de ontogênese foliar em espécies de Ruschioideae com diferentes morfologias foliares, mostrando a instalação e atividade das diferentes regiões de crescimento durante a elaboração da base e da lâmina foliar. Evidenciamos que folhas de Ruschioideae com bases foliares conadas e feixes vasculares periféricos com xilema endoscópico apresentam uma identidade abaxial na lâmina foliar, uma condição única entre as Caryophyllales. Além disso, sugerimos que os mecanismos moleculares envolvidos na abaxialização sejam desencadeados durante a formação da margem foliar (lâmina foliar), uma vez demonstrado que o caráter dorsiventral da nervura mediana é definido anteriormente, bem como da base foliar.

O segundo capítulo resulta de um projeto à parte. Por ter sido elaborado e concluído durante o período do mestrado, optamos por incorporar seus resultados à dissertação. A partir da distribuição de *wide-band tracheids* (“wbts”) em Aizoaceae e Anacampserotaceae, demonstrou-se a continuidade na sua ocorrência entre a nervura central da folha e o xilema primário do caule; e o estudo comparativo dos tipos de

espessamento dessas traqueídes mostrou que Cactaceae apresenta uma maior complexidade. Além disso, a flexibilidade, característica das “*wbts*”, foi corroborada pela demonstração de pectina na parede primária, e uma constrição peculiar na parede secundária foi reportada nas “*wbts*” de Aizoaceae. Esses resultados contribuem ao entendimento da estrutura e função desse tipo particular de célula, em representantes das três famílias.

Assim, temos que os objetivos inicialmente propostos foram atingidos, e os resultados deste trabalho contribuem ao conhecimento da anatomia e ontogênese foliar de Aizoaceae, abrindo novas oportunidades de estudos sobre os mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento da dorsiventralidade em folhas de simetria radial. Além disso, a análise anatômica comparativa de *wide-band tracheids* “*wbts*” em representantes de Aizoaceae, Anacampserotaceae e Cactaceae permitiu uma melhor compreensão quanto à distribuição e características dessas células nos diferentes órgãos.

