Aline Siqueira Ogura

Desenvolvimento foliar e expressão do ortólogo de
ASYMMETRIC LEAVES1/ROUGH
SHEATH2/PHANTASTICA em Aizoaceae

Leaf development and expression of *ASYMMETRIC*
LEAVES1/ROUGH SHEATH2/PHANTASTICA in
Aizoaceae

São Paulo
2017

Resumo

Folhas apresentam grande diversidade morfológica como resultado de diferentes padrões de desenvolvimento. Embora a forma plana das folhas típicas seja eficiente para sua função de fotossíntese, algumas espécies de Aizoaceae também desenvolveram folhas teretes, com simetria radial e lâmina abaxializada. Para entender os mecanismos de desenvolvimento responsáveis pela geração desses padrões, investigamos a ontogênese de folhas com diferentes morfologias no grupo. Neste trabalho, descrevemos o desenvolvimento foliar em espécies de Aizoaceae, incluindo indivíduos com folhas planas e teretes, utilizando as técnicas usuais de anatomia vegetal. Todas as espécies analisadas têm folhas com base bifacial estabelecida em estágios iniciais de desenvolvimento; no entanto, as espécies com folhas de terete possuem lâminas unifaciais. Com interesse no papel do gene *ARP* recente duplicado em Aizoaceae, nós investigamos a possível correlação entre o evento de duplicação e o surgimento da morfologia da folha abaxializada em Aizoaceae. Detectamos, por meio de *hibridização in situ*, que *ARP* é expresso em todo o primórdio foliar, sugerindo que, em Aizoaceae, este gene está envolvido principalmente na determinação do destino das células foliares. Além disso, demonstramos que a expressão dos ortólogos de *ARP* em Aizoaceae são capazes de recuperar o fenótipo selvagem de *Arabidopsis as1*, indicando um alto grau de conservação funcional do gene, mesmo em folhas com uma morfologia tão distinta.

Abstract

Leaves exhibit great morphological diversity as a result of different patterns of development. Although the flat shape of typical leaves is efficient for their photosynthesis function, some Aizoaceae species have also evolved terete leaves, with radial symmetry and abaxialized lamina. In order to understand the development mechanisms responsible for generating such patterns, we investigate the ontogenesis of leaves with different morphologies in the group. In this work, we describe development in Aizoaceae species, including individuals with flat and terete leaves, processed according to usual techniques in plant anatomy. We found that all species have leaves with bifacial base established in early stages of development; however, terete leaved species have unifacial leaf blades. Interested in the role of the recent duplicated *ARP* gene in Aizoaceae, we investigate the possible correlation between the duplication event and the emergence of the abaxialized leaf morphology in Aizoaceae. We detected, by *in situ hybridization* assays, that *ARP* is expressed throughout the leaf primordium, suggesting that in Aizoaceae this gene is involved in the determination of leaf cell fate. In addition, we have shown that the expression of *ARP* orthologs of Aizoaceae is capable of recovering the wild-type phenotype of *Arabidopsis as1*, indicating a high degree of functional conservation of the gene, even in leaves with such a distinct morphology.

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 especialização celular em cada face, somada à extensão da lâmina, aprimorou a captação de luminosidade e trocas gasosas, demandados à realização da fotossíntese, função centralizada nas folhas e ao mesmo tempo minimizam as perdas de água para o ambiente (Eames & McDaniels 1947).

A face adaxial é caracterizada por apresentar epiderme recoberta por cutícula espessa, que protege a folha de dessecação, e o parênquima paliçádico é arranjado de forma a favorecer a distribuição de luz pelo mesófilo (Esau 1977). Na face abaxial, por sua vez, é comum a presença de numerosos estômatos e de parênquima frouxamente arranjado, com amplo espaço intercelular, atributos que permitem a regulação das trocas gasosas e o controle da transpiração (Esau 1977). As células que compõem o sistema vascular nas folhas são arranjadas com xilema em posição adaxial em relação ao floema, e outras características que podem distinguir os domínios adaxial e abaxial das folhas incluem a densidade e tipo de tricomas presentes e a forma e o tamanho das células epidérmicas.

Embora a condição dorsiventral tenha aprimorado a captação de luminosidade e trocas gasosas, demandados à realização da fotossíntese, algumas espécies dispõem de modificações extraordinárias na morfologia foliar, como a ocorrência de folhas cilíndricas e unifaciais, ou em sua função, como as folhas portadoras de reserva, ou aquelas transformadas em gavinhas ou espinhos. 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, damos continuidade aos nossos estudos de 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. 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 abordaremos o gene *Asymmetric Leaves1/Rough sheath2/Phantastica* (ARP), cuja duplicação em Aizoaceae tem sido apontada como uma das possíveis causas para a grande diversificação morfológica ocorrida no grupo.

Embora as folhas representem os órgãos de maior plasticidade no corpo vegetal, todas as espécies compartilham a identidade de dois domínios distintos ao longo do seu eixo adaxial-abaxial (Kaplan 2001; Yamaguchi *et al.* 2012). Essa polaridade pode ser verificada no mesofilo de folhas com arranjo dorsiventral, no sistema vascular (com o xilema ocupando posição adaxial em relação ao floema) e por especializações epidérmicas que podem diferir entre as duas faces da folha.

Mecanismos do desenvolvimento foliar relacionados ao estabelecimento da identidade adaxial-abaxial

Com o advento da biologia molecular alguns dos principais mecanismos de controle do estabelecimento da polaridade adaxial-abaxial nas folhas foram elucidados, a princípio partindo da observação de mutantes de plantas modelo, como *Antirrhinum majus* e *Arabidopsis thaliana*. Um dos primeiros trabalhos a serem realizados nesse

contexto descreveu o papel do gene *PHANTASTICA (PHAN)* em *Antirrhinum*, realizado por Waites & Hudson, em 1995. Em mutantes *phan* regiões com células características da face abaxial diferenciam-se na face adaxial da folha, sendo que as plantas com mutações mais severas desenvolvem folhas cilíndricas com domínio adaxial inteiramente ocupado por células típicas de face abaxial.

Com base nesses resultados, a importância *PHAN* para a diferenciação adequada no domínio adaxial foi melhor elucidada, e elaborou-se o modelo, posteriormente corroborado, no qual a justaposição de células características de ambas as faces se faz necessária para que haja expansão de lâmina foliar, tornando o órgão amplo e planar (Waites & Hudson 1995). Posteriormente foram descritos ortólogos de *PHAN* em outras espécies, como *ROUGH SHEET2 (RS2)* em *Zea mays* (Timmermans *et al.* 1999) e *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)* em *Arabidopsis* (Byrne *et al.* 2000), os quais são referidos conjuntamente como *ARP*, além de outros genes envolvidos na diferenciação de cada uma das faces.

Os genes Class III Homeodomain Zipper (*HD-ZIP III*) *PHABULOSA (PHB)*, *PHAVOLUTA (PHV)* e *REVOLUTA (REV)* determinam identidade adaxial. Mutantes *phb* de *Arabidopsis* desenvolvem folhas cilíndricas e abaxializadas (McConnell & Barton 1998), fenótipo semelhante àqueles obtidos tanto em *phan* (Waites & Hudson 1995), quanto nos experimentos de incisão (Sussex 1954; Reinhardt *et al.* 2005). Da mesma forma, a expressão ectópica de *PHB* e *PHV* na face abaxial resulta em adaxialização foliar, assim como ocorre com o ganho de função de alelos de *REV* em *Arabidopsis*, comprovando o papel desses genes na determinação da face adaxial (McConnell & Barton 1998; McConnell *et al.* 2001).

Durante a morfogênese foliar o domínio de expressão de *HD-ZIP III* estende-se desde a região do meristema apical caulinar até a porção adaxial do primórdio foliar,

formando um centro de expressão; perifericamente a esse domínio, na porção abaxial da folha, expressam-se no primórdio foliar os fatores de transcrição abaxiais (Wu *et al.* 2008; Husbands *et al.* 2009). Segundo McConnell *et al.* (2001), as proteínas resultantes da expressão desses genes mediam o sinal vindo do meristema apical caulinar e reprimem a expressão de fatores formadores de tecidos abaxiais na região adaxial das folhas.

Os genes da família *KANADI* (*KAN1-4*) se expressam no domínio abaxial durante o desenvolvimento de órgãos laterais (Eshed *et al.* 2001; Kerstetter *et al.* 2001) com padrão de expressão antagônico a *PHB*, *PHV* e *REV* (Izhaki & Bowman 2007) e *ASYMMETRIC LEAVES2* (*AS2*) (Wu *et al.* 2008), corroborando o modelo proposto por Waites & Hudson (1995). Em mutantes com perda ou ganho de função de *KAN*, a condição bifacial das folhas é comprometida, formando órgãos de simetria radial adaxializados e abaxializados, respectivamente (Izhaki & Bowman 2007; Wu *et al.* 2008). Além de *KAN*, os genes da família *YABBY* também se expressam no domínio abaxial na morfogênese foliar (Siegfried *et al.* 1999) e, segundo Eshed *et al.* (2004), a perda de função de *YABBY* acentua o fenótipo radial das folhas de mutantes que não expressam *KAN*, sendo seu papel importante durante a expansão da lâmina, induzindo a divisão celular na região limítrofe entre os domínios adaxial e abaxial. O *AUXIN RESPONSE FACTOR3* (*ARF3*)/*ETTIN* (*ETT*) também se expressa no domínio abaxial da folha, sendo importante na determinação dessa face (Pekker *et al.* 2005).

Aizoaceae

Pertencente às Caryophyllales suculentas, Aizoaceae tem como centro de origem o sul da África (Ihlenfeldt 1994, Klak *et al.* 2004, Burke 2005). Suas espécies são conhecidas popularmente como *ice plants* (plantas de gelo) e *flowering stones*

(pedras que florescem), em referência às suas folhas suculentas de morfologia muito peculiar, que atraem a atenção de colecionadores e admiradores em todo o mundo.

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).

A classificação da família Aizoaceae fora tradicionalmente baseada em caracteres morfológicos de estruturas reprodutivas e na presença de células epidérmicas especiais (*bladder cells*, células-bexiga) nas folhas (Bittrich & Hartmann 1988, Hartmann 1993, 1998, 2001a, 2001b, Chesselet *et al.* 2002), tendo havido diversas circunscrições. A filogenia molecular mais atual (Klak *et al.* 2003), apresenta Aizoaceae dividida em 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).

Entre as Ruschioideae observam-se arbustos, ervas e diversas geófitas com constituição notavelmente reduzida (Ihlenfeldt 1994). Poucas espécies de Aizoaceae

apresentam folhas achatadas com lâmina expandida lateralmente (fig. 1 A, B); na família folhas trígonas são mais frequentes (fig. C, D), e algumas espécies apresentam folhas cilíndricas (fig. 1 E) (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) (fig. 1 B-D, F, G).

Anatomicamente, as folhas de Aizoaceae apresentam parênquima clorofiliano margeando o parênquima armazenador, cujo centro é ocupado pela nervura central da folha, arranjo frequente observado em folhas suculentas (Landrum 2001; Melo-de-Pinna *et al.* 2014, 2016). O diferencial observado em Aizoaceae reside na ocorrência de pequenos feixes vasculares marginais dispostos ao longo da periferia da folha, denominados feixes vasculares periféricos (*peripheral vascular bundles* - PVB, Melo-de-Pinna *et al.* 2014), 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.* 2014). Nessa configuração, 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 da folha apresenta xilema e floema com polaridade convencional, sendo a inversão dos feixes observada apenas na margem da folha (Melo-de-Pinna *et al.*, 2014). Segundo as autoras, células características da face abaxial se diferenciam no domínio adaxial da folha, sugerindo um possível processo de abaxialização foliar envolvido na formação de feixes vasculares com polaridade invertida na face adaxial das folhas de Aizoaceae.

Figura 1. Exemplos de padrões morfológicos de Aizoaceae. A – *Skiatophytum tripolium*, folhas dorsiventrais planas com bases livres; B – *Delosperma tradescantioides*, folhas dorsiventrais planas com bases conadas; C – *D. napiforme*, folhas trígonas com bases conadas; D – *Gibbaeum heathii*, idem a C; E – *Fenestraria rhopalophylla*, folhas teretes com bases conadas; F – *Lithops aucampiae*, folhas quase totalmente conadas; G – *Muiria hortenseae*, folhas completamente conadas.

Ontogênese foliar

Logo após a iniciação do primórdio, a folha em desenvolvimento define seu eixo proximal-distal, e diferencia o cordão de procâmbio da nervura principal (Esau 1977; Evert 2006). A expansão da lâmina foliar ocorre posteriormente, com a atividade da blastozona marginal (Hagemann & Gleissberg 1996; Dengler & Tsukaya 2001). Dessa forma, a abaxialização foliar em Aizoaceae provavelmente se expressa durante a formação da lâmina foliar. Isso se sustenta no fato de que os feixes vasculares

invertidos distribuem-se ao longo do eixo proximal-distal em toda a lâmina, porém estão ausentes na base da folha.

A disposição dos feixes marginais de Aizoaceae assemelha-se ao que se observa em folhas unifaciais, frequentes em monocotiledôneas (Eames & McDaniels 1947). As folhas unifaciais exibem dois domínios morfológicamente distintos ao longo de seu eixo proximal-distal: a lâmina, que compõe a porção unifacial propriamente dita, e a bainha que representa a base da folha e tem estrutura dorsiventral (Kaplan 1973). Em folhas bifaciais, tanto a lâmina quanto a base diferenciam-se mantendo a polaridade adaxial-abaxial, entretanto, nas folhas unifaciais a lâmina foliar é formada apenas por tecidos de face abaxial. Em seção transversal, nota-se a ausência de arranjo dorsiventral dos tecidos, e a presença de feixes vasculares dispostos ao longo de uma elipse, com os polos de xilema sempre voltados ao centro da folha (Kaplan 1973, Yamaguchi & Tsukaya 2010). A partir da ontogênese desse tipo foliar, observa-se uma intensa atividade da blastozona adaxial que proporciona divisões periclinais de células em direção ao meristema (Hagemann & Gleissberg 1999, Kaplan 2001).

Os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de folhas unifaciais foram tema de estudo de Yamaguchi & Tsukaya (2010) e Yamaguchi *et al.* (2010). De acordo com esses trabalhos, a lâmina de *Juncus prismatocarpus* é abaxializada, uma vez que a expressão de um ortólogo de *ARF3* (identidade abaxial) ocorre na margem foliar ao longo de toda a lâmina, ao mesmo tempo em que um ortólogo de *PHB* (identidade adaxial) se expressa apenas no xilema. Na bainha foliar a expressão desses genes é convencional, e por isso essa parte da folha é dorsiventral. Com base em nossos estudos de anatomia do desenvolvimento foliar em Aizoaceae (Melo-de-Pinna *et al.* 2014, 2016), acrescidas do conhecimento disponível sobre desenvolvimento de folhas unifaciais, nos âmbitos morfoanatômico (Kaplan 1970,

1973) e molecular (Yamaguchi & Tsukaya 2010; Yamaguchi *et al.* 2010), nós elaboramos a hipótese de que ocorra processo de abaxialização em algumas espécies desta família, sendo essa a explicação ao fato de tecidos característicos de face abaxial se diferenciarem na região adaxial.

ASYMMETRIC LEAVES1/ROUGH SHEET2/PHANTASTICA (ARP) em Aizoaceae

Segundo o trabalho de Illing *et al.* (2009), durante a diversificação entre Mesembryanthemoideae e Ruschioideae, a duplicação do gene ortólogo de *ASYMMETRIC LEAVES1 (ASI)*, configurou uma importante novidade a partir da qual houve uma importante diversificação morfológica em Aizoaceae. A atividade do gene *ARP* pode estar relacionada à determinação da identidade adaxial, e uma alteração no seu padrão de expressão pode estar associada ao desenvolvimento de células características de face abaxial na face adaxial da folha (Waites & Hudson 1995). A observação do padrão de expressão de *ARPa* e *ARPb* em diferentes tipos foliares de Aizoaceae possibilitaria inferir a influência da atividade desses genes na formação de células abaxiais no domínio adaxial das folhas, e concluir se de fato ocorre abaxialização foliar em Aizoaceae.

Diante deste cenário, propõe-se realizar uma investigação inédita sobre a expressão do ortólogo de *ARP* durante a ontogênese foliar em duas espécies de Aizoaceae, sendo uma de Mesembryanthemoideae e uma de Ruschioideae. O padrão de expressão de *ASYMMETRIC LEAVES1/ROUGH SHEET/PHANTASTICA (ARP)* observado pode fornecer evidências que sustentem a hipótese de abaxialização foliar, elaborada com base em estudos de desenvolvimento foliar. Além disso, busca-se discutir se a duplicação do gene (*ARPa* e *ARPb*), ocorrida durante a diversificação de

Mesembryanthemoideae e Ruschioideae, contribuiu para a diversificação na morfologia foliar em Aizoaceae. Para tanto, nossos objetivos são:

§ Descrever a ontogênese foliar de espécies de Ruschioideae com folha dorsiventral e folha unifacial.

§ Verificar se as duas cópias do ortólogo de *ASYMMETRIC LEAVES1/ROUGH SHEET/PHANTASTICA* - (*ARPa* e *AR Pb*) detectadas no genoma, de fato são expressas durante a ontogênese foliar em Ruschioideae.

§ Descrever o padrão de expressão *in situ* de *ARP* durante o desenvolvimento de folhas em representantes de Mesembryanthemoideae e Ruschioideae.

§ Observar se o gene *ARP* em Aizoaceae tem função homóloga à de seu ortólogo em *Arabidopsis thaliana*.

A presente tese apresenta-se em dois capítulos. No primeiro, abordamos a ontogênese foliar, enfatizando a atividade diferencial de suas regiões de crescimento. No segundo capítulo investigamos o padrão de expressão de *ARP*, a homologia das sequências obtidas, bem como sua possível função do gene durante o desenvolvimento foliar. Em anexo encontram-se a lista de todos os primers utilizados, e as sequências de genes obtidas no presente estudo e o resumo das publicações realizadas ao longo do doutorado.

Referências

- BITTRICH, V.; HARTMANN, H. E. K. 1988. The Aizoaceae: a new approach. *Botanical Journal of the Linnean Society* 97: 239-254.
- 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.
- BURKE, A. 2005. Endemic plants of the arid Succulent Karoo in Namibia: towards hypothesis for their evolution. *Ecography* 28: 171-180.
- CHESSELET, 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: 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.

- 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.
- ESHED, Y.; IZHAKI, A.; BAUM, S.F.; FLOYD, S.K. & BOWMAN, J.L. 2004. Asymmetric leaf development and blade expansion in *Arabidopsis* are mediated by KANADI and YABBY activities. *Development* 131: 2997-3006
- 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.
- 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: 121–152.
- 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.
- 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: 521-546.
- 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): 331–338.
- 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.
- KAPLAN, D.R. 1970. Comparative foliar histogenesis in *Acorus calamus* and its bearing on the phyllode theory of monocotyledonous leaves. *Am J Bot* 57:331–361.
- KAPLAN, D. R. 1973. The problem of leaf morphology and evolution in the monocotyledons. *Q. Rev. Biol.* 48: 437–457.
- 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): 465-474.
- 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): 1433–1445.
- KLAK, C, REEVES, G & HEDDERSON, T, 2004. Unmatched tempo of evolution in Southern African semi-desert ice plants. *Nature* 427: 63–65.
- KERSTETTER, R.A.; BOLLMAN, K.; TAYLOR, R.A.; BOMBLIES, K. & POETHIG, R.S. 2001. KANADI regulates organ polarity in *Arabidopsis*. *Nature* 411.6838 : 706-9.

- 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
- MCCONNELL, J.R. & BARTON, M.K., 1998. Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. *Development* 125(15): 2935-42.
- MCCONNELL, J.R.; EMERY, J.; ESHED, Y.; BAO, N. *et al.* 2001. Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *Nature* 411: 709-13.
- MELO-DE-PINNA, G. F.A., NUNES, S. A., ARRUDA, E. C.P., KLAK, C. 2014 Repeated evolution of endoscopic peripheral vascular bundles in succulent leaves of Aizoaceae (Caryophyllales). *Taxon* 63: 1037-1052.
- MELO-DE-PINNA, G. F.A.; HERNANDES-LOPES, J.; OGURA, A.S.; SANTOS, L.K.; SILVA, D.C.S. & HAEVERMANS, T. 2016. Growth patterns and different arrangements of vascular tissues in succulent leaves. *Int. J. Plant Sci.* 177: 643-660.
- 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: 535-552.
- PEKKER, I.; ALVAREZ, J.P. & ESHED, Y. 2005. Auxin Response Factors Mediate *Arabidopsis* Organ Asymmetry via Modulation of KANADI Activity. *The Plant Cell* 17: 2899-2910.
- REINHARDT, D.; FRENZ, M.; MANDEL, T.; KUHLEMEIER, C. 2005. Microsurgical and laser ablation analysis of leaf positioning and dorsoventral patterning in tomato. *Development* 132: 15-26.
- 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): 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.
- SUSSEX, I.M. 1954. Experiments on the cause of dorsiventrality in leaves. *Nature* 174: 351 – 352.
- TIMMERMANS, M.C.P., HUDSON, A., BECRAFT, P.W. AND NELSON, T. 1999. ROUGH SHEATH2: A MYB protein that represses *knox* homeobox genes in maize lateral organ primordia. *Science* 284: 151-153.
- WAITES, R. & HUDSON, A., 1995. *phantastica*: a gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. *Development* 121: 2143–2154.
- 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.; YANO, S.; TSUKAYA, H. 2010. Genetic framework for flattened leaf blade formation in unifacial leaves of *Juncus prismatocarpus*. *The Plant Cell* 22(7): 2141-2155.
- YAMAGUCHI, T. & TSUKAYA, H. 2010. Evolutionary and developmental studies of unifacial leaves in monocots: *Juncus* as a model system. *J. Plant Res.* 123:35–41.
- YAMAGUCHI, T., NUKAZUKA, A. & TSUKAYA, H., 2012. Leaf adaxial-abaxial polarity specification and lamina outgrowth: evolution and development. *Plant & cell physiology* 53(7): 1180–1194.

Acknowledgements

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 2011/04286-0 and 2015/15158-4) and CNPq (Proc. 300810/2016-4). We Thank to Cornelia Klak (Bolus) for kindly identify the species.

Literature cited

- Boke NH 1944 Histogenesis of the leaf and areole in *Opuntia cylindrica*. Am. J. Bot. 31: 299–316.
- Bukatsch F 1972 Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. Mikrokosmos 61: 255.
- Dengler NG, Tsukaya H 2001 Leaf morphogenesis in dicotyledons: Current Issues. Int. J. Plant Sci. 162: 459–464.
- Eames AJ, MacDaniels LH 1947 An introduction to plant anatomy. McGraw-Hill, New York.
- Esau K 1960 Anatomy of seed plants, Soil Science. Wiley & Sons, New York.
- Fahn A 1990 Plant anatomy., 4th ed. Pergamon Press, Oxford.
- Freeman T 1970 The developmental anatomy of *Opuntia basilaris*. II. Apical meristem, leaves, areoles, glochids. Am. J. Bot. 57: 616–622.
- Gibson AC 1977 Vegetative Anatomy of *Maihuenia* (Cactaceae) with some Theoretical Disussions of Ontogenetic Changes in Xylem Cell Types. Bull. Torrey Bot. Club 104: 35–48.
- Hagemann W 1970 Studien zur Entwicklungsgeschichte der Angiospermenblätter. Bot Jahrb 90: 297–413.

- Hagemann W, Gleissberg S 1996 Organogenetic capacity of leaves: the significance of marginal blastozones in angiosperms. *Plant Syst. Evol.* 199: 121–152.
- Hartmann HEK 2002 *Illustrated Handbook of Succulent Plants: Aizoaceae A-Z*.
- Hernandes-Lopes J, Oliveira-Neto MA, Melo-de-Pinna GFA 2016. Different Ways to Build Succulent Leaves in Portulacineae (Caryophyllales). *Int. J. Plant Sci.* 177: 198–208.
- Ihlenfeldt H 1994 Diversification in an Arid World: The Mesembryanthemaceae. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25: 521–547.
- Ihlenfeldt HD 1985 Lebensformen und Überlebensstrategien bei Sukkulente. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 98: 409–423.
- Illing N, Klak C, Johnson, C, Brito D, Negrao N, Baine F, van Kets V, Ramchurn KR, Seoighe C, Roden L 2009 Duplication of the asymmetric leaves1/rough sheath 2/Phantastica (ARP) gene precedes the explosive radiation of the ruschioideae. *Dev. Genes Evol.* 219: 331–338.
- Kaplan DR 1973 The problem of leaf morphology and evolution in the monocotyledons. *Q. Rev. Biol.* 48: 437–457.
- Kaplan DR 2001 Fundamental concepts of leaf morphology and morphogenesis: a contribution to the interpretation of molecular genetic mutants. *Int. J. Plant Sci.* 162: 465–474.
- Karnovsky MJ 1965 A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27: 137.
- Klak C, Reeves G, Hedderson T 2004 Unmatched tempo of evolution in Southern African semi-desert ice plants. *Nature* 427: 63–65.

- Klak C, Bruyns PV, Hanáček P 2013 A phylogenetic hypothesis for the recently diversified Ruschieae (Aizoaceae) in southern Africa. *Mol. Phylogenet. Evol.* 69: 1005–1020.
- Klak C, Bruyns PV, Hedderson TAJ 2007 A Phylogeny and New Classification for Mesembryanthemoideae (Aizoaceae). *Taxon* 56: 737–756.
- Klak C, Khunou A, Reeves G, Hedderson T 2003 A phylogenetic hypothesis for the Aizoaceae (Caryophyllales) based on four plastid DNA regions. *Am. J. Bot.* 90: 1433–1445.
- Kobayashi Y 1999 A Pair of Related Genes with Antagonistic Roles in Mediating Flowering Signals. *Science* 286: 1960–1962.
- Machida C, Nakagawa A, Kojima S, Takahashi H, Machida Y 2015 The complex of ASYMMETRIC LEAVES (AS) proteins plays a central role in antagonistic interactions of genes for leaf polarity specification in *Arabidopsis*. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 4: 655–671.
- Melo-de-Pinna GFA, Ogura AS, Arruda ECP, Klak C 2014 Repeated evolution of endoscopic peripheral vascular bundles in succulent leaves of Aizoaceae (Caryophyllales). *Taxon* 63: 1037–1052.
- Melo-de-Pinna GFA, Hernandez-Lopes J, Ogura AS, Santos LK, Silva DC, Haevermans T 2016 Growth patterns and different arrangements of vascular tissues in succulent leaves. *Int. J. Plant Sci.* 177: 643–660.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME 1964 Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368–373.
- Ogburn RM, Edwards EJ 2013 Repeated Origin of Three-Dimensional Leaf Venation Releases Constraints on the Evolution of Succulence in Plants. *Curr. Biol.* 23: 1–5.

Ozerova LV, Timonin AC 2009 On the evidence of subunifacial and unifacial leaves:

Developmental studies in leaf-succulent *Senecio* L. species (Asteraceae). *Wulfenia* 16: 61–77.

Platonova AG, Remizowa MV, Briggs BG, von Mering S, Lock IE, Sokoloff DD 2016

Vegetative morphology and anatomy of *Maundia* (Maundiaceae: Alismatales) and patterns of peripheral bundle orientation in angiosperm leaves with three-dimensional venation. *Bot. J. Linn. Soc.* 182: 757–790.

Ruzin S 1999 Plant microtechnique and microscopy. Oxford University Press, New York.

Timonin AC, Ozerova LV, Remizowa MV 2006 Development of unifacial leaves in *Senecio* L. s. lat. (Asteraceae) *Results Apical bud* 13: 217–227.

Yamaguchi T, Yano S, Tsukaya H 2010 Genetic framework for flattened leaf blade formation in unifacial leaves of *Juncus prismatocarpus*. *Plant Cell* 22: 2141–2155.

References

- BYRNE M, TIMMERMANS M, KIDNER C, MARTIENSSEN R. 2001. Development of leaf shape. *Current Opinion Plant Biology* 4(1):38-43.
- EMERY JF, FLOYD SK, ALVAREZ J, ESHED Y, HAWKER NP, IZHAKI A, BAUM SF, BOWMAN JL. 2003. Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by *Class III HD-ZIP* and *KANADI* genes. *Current Biology* 13(20): 1768–1774.
- ENGSTROM EM, IZHAKI A, BOWMAN JL. 2004. Promoter bashing, microRNAs, and *KNOX* genes. New insights, regulators, and targets-of-regulation in the establishment of lateral organ polarity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 135: 685-694.
- FUKUSHIMA K & HASEBE M. 2014. Adaxial–abaxial polarity: The developmental basis of leaf shape diversity. *Genesis* 52(1): 1–18.
- GLOVER BJ, PEREZ-RODRIGUEZ M, MARTIN C. 1998. Development of several epidermal cell types can be specified by the same MYB-related plant transcription factor. *Development* 125: 3497–3508.
- HAY A, TSIANTIS M. 2006. The genetic basis for differences in leaf form between *Arabidopsis thaliana* and its wild relative *Cardamine hirsuta*. *Nature Genetics* 8(8): 942-947.
- HUSBANDS AY, BENKOVICS AH, NOGUEIRA FTS, LODHA M, TIMMERMANS, MCP. 2015. The ASYMMETRIC LEAVES complex employs multiple modes of regulation to affect adaxial-abaxial patterning and leaf complexity. *The Plant Cell* 27: 3321–3335.

- HUSBANDS AY, CHITWOOD DH, PLAVSKIN Y, TIMMERMAN MCP. 2009. Signals and pre-patterns: new insights into organ polarity in plants. *Genes and Development* 23: 1986-1997.
- IHLENFELDT H -D. 1994. Diversification in an arid world: The Mesembryanthemaceae. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 25: 521-546.
- ILLING N, KLAK C, JOHNSON C, BRITO D, NEGRAO N, BAINE F, VAN KETS V, RAMCHURN KR, SEOIGHE C, RODEN L. 2009. Duplication of the *ASYMMETRIC LEAVES1/ROUGH SHEATH2/PHANTASTICA* (ARP) gene precedes the explosive radiation of the Ruschioideae. *Development Genes and Evolution* 219(6): 331–338
- IWAKAWA H, IWASAKI M, KOJIMA S, UENO Y, SOMA T, TANAKA H, SEMIARTI E, MACHIDA Y, MACHIDA C. 2007. Expression of the *ASYMMETRIC LEAVES2* gene in the adaxial domain of *Arabidopsis leaves* represses cell proliferation in this domain and is critical for the development of properly expanded leaves. *Plant Journal* 51(2): 173-184.
- KEARSE M, MOIR R, WILSON A, STONES-HAVAS S, CHEUNG M, STURROCK S, BUXTON S, COOPER A, MARKOWITZ S, DURAN C, THIERER T, ASHTON B, MENTJES P, DRUMMOND A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12): 1647-1649.
- KIM M, MCCORMICK S, TIMMERMAN M, SINHA N. 2003. The expression domain of *PHANTASTICA* determines leaflet placement in compound leaves. *Nature* 424: 438–443.

- 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): 1433–1445.
- KLAK C, REEVES G & HEDDERSON T. 2004. Unmatched tempo of evolution in Southern African semi-desert ice plants. *Nature* 427: 63–65.
- LANFEAR R, FRANDSEN PB, WRIGHT AM, SENFELD T, CALCOTT B. 2016. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 34: 772-773.
- LIN WC, SHUAI B, SPRINGER PS. 2003. The *Arabidopsis* lateral organ boundaries-domain gene *ASYMMETRIC LEAVES2* functions in the repression of *KNOX* gene expression and in adaxial-abaxial patterning. *The Plant Cell* 15(10): 2241-2252.
- MACHIDA C, NAKAGAWA A, KOJIMA S, TAKAHASHI H, MACHIDA Y. 2015. The complex of ASYMMETRIC LEAVES (AS) proteins plays a central role in antagonistic interactions of genes for leaf polarity specification in *Arabidopsis*. *Wiley Interdisciplinary Reviews Developmental Biology* 4(6): 655-671.
- MCCONNELL JR, EMERY J, ESHED Y, BAO N, BOWMAN J, BARTON MK. 2001. Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots. *Nature* 411(6838): 709-713.
- MCHALE NA, KONING RE. 2004. *PHANTASTICA* regulates development of the adaxial mesophyll in *Nicotiana* leaves. *The Plant Cell* 16(5): 1251-1262.
- MELO-DE-PINNA GFA, HERNANDES-LOPES J, OGURA AS, SANTOS LK, SILVA DC, AND HAEVERMANS T. 2016. Growth Patterns and Different Arrangements of Vascular

- Tissues in Succulent Leaves. *International Journal of Plant Sciences* 177 (8): 643-660.
- MELO-DE-PINNA GFA, OGURA AS, ARRUDA ECP, KLAK C. 2014. Repeated evolution of endoscopic peripheral vascular bundles in succulent leaves of Aizoaceae (Caryophyllales). *Taxon* 63 (5): 1037-1052.
- ROMERO I, FUERTES A, BENITO MJ, MALPICA JM, LEYVA A, PAZ-ARES J. 1998. More than 80R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 14(3): 273-284.
- STAMATAKIS A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312–1313.
- THEODORIS G, INADA N, FREELING M. 2003. Conservation and molecular dissection of *ROUGH SHEATH2* and *ASYMMETRIC LEAVES1* function in leaf development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 6837–6842.
- TIMMERMANS MCP, HUDSON A, BECRAFT PW, NELSON T. 1999. ROUGH SHEATH2: A Myb Protein that Represses knox Homeobox Genes in Maize Lateral Organ Primordia. *Science* 284(5411): 151–153.
- TSIANTIS M, SCHNEEBERGER R, GOLZ JF, FREELING M, LANGDALE JA. 1999. The maize *ROUGH SHEATH2* gene and leaf development programs in monocot and dicot plants. *Science* 284(5411): 154-156.
- WAITES R & HUDSON A. 1995. phantastica: a gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. *Development* 121: 2143–54.

XU L, XU Y, DONG A, SUN Y, PI L, XU Y, HUANG H. 2003. Novel *as1* and *as2* defects in leaf adaxial-abaxial polarity reveal the requirement for *ASYMMETRIC LEAVES1* and 2 and *ERECTA* functions in specifying leaf adaxial identity. *Development* 130(17): 4097-40107.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O primeiro passo na elaboração desta pesquisa surgiu do estudo de ontogênese foliar em espécies de Ruschioideae (Capítulo 1). O desenvolvimento foliar foi observado nas mais diferentes morfologias foliares, entre dorsiventrais e teretes, mostrando a instalação e atividade das regiões de crescimento envolvidas na histogênese da base e da lâmina foliar. Sugerimos que mecanismos moleculares de abaxialização sejam desencadeados durante a formação da lâmina foliar, uma vez demonstrado que o caráter dorsiventral da nervura mediana é definido anteriormente, assim como ocorre na base foliar. A realização de estudos sobre desenvolvimento foliar a partir de análises anatômicas em grupos que apresentam diferentes morfologias foliares - dorsiventrais e teretes- reforça a necessidade de mais estudos sobre os processos envolvidos na formação de folhas cilíndricas dentro das plantas vasculares.

Ferramentas complementares aos estudos do desenvolvimento foliar são de extrema importância quando se aborda aspectos envolvendo os processos de abaxialização e adaxialização. Neste sentido, a partir da análise de expressão gênica e conservação da função de genes relacionados ao estabelecimento da morfologia foliar in Ruschioideae (Capítulo 2), consideramos a hipótese da variação morfológica presente no grupo ser produto de uma possível interferência entre as duas cópias de *ARP* modulando sua capacidade de estabelecer o domínio adaxial.

Em síntese, avanços em técnicas moleculares tem nos permitido desvendar alguns dos mecanismos do desenvolvimento vegetal e um progresso significativo tem sido feito no entendimento da identidade adaxial-abaxial em plantas modelo. Ainda pouco se conhece sobre o controle genético do desenvolvimento foliar em outros grupos, mas estudos comparativos com base em *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e outras espécies nos auxiliam a entender o desenvolvimento vegetal em ampla perspectiva.

Análises de espécies diferentes vão ainda fornecer um entendimento sobre como esses mecanismos influenciam na diversidade e plasticidade fenotípica dos mais diferentes grupos de plantas.