

---

Juliana Castelo Branco Brasileiro

Morfologia e ontogenia de estípulas no gênero  
*Passiflora* L. (Passifloraceae)

Morphology and ontogeny of stipules in the  
genus *Passiflora* L. (Passifloraceae)

São Paulo

2021

Juliana Castelo Branco Brasileiro

Morfologia e ontogenia de estípulas no gênero  
*Passiflora* L. (Passifloraceae)

Morphology and ontogeny of stipules in the  
genus *Passiflora* L. (Passifloraceae)

Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade de São  
Paulo, para a obtenção de Título de  
Doutor em Ciências Biológicas, na  
Área de Botânica.

Orientador(a): Gladys Flavia de  
Albuquerque Melo de Pinna.

São Paulo

2021

## Ficha Catalográfica

---

Brasileiro, Juliana C. B. B.

Morfologia e ontogenia de estípulas  
no gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae)

92 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de  
Biotecnologia da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Botânica.

1. Reconstrução do estado ancestral  
2. Subgênero *Decaloba* 3. Subgênero  
*Passiflora* I. Universidade de São Paulo.  
Instituto de Biotecnologia. Departamento de  
Botânica.

### Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).  
Orientador(a)

## Dedicatória

---

Aos meus pais, dedico.

## Epígrafe

---

Nada é permanente, exceto a mudança.

Heráclito de Éfeso

## Agradecimentos

---

À minha admirável e inspiradora orientadora, Gladys Flávia de Albuquerque Melo de Pinna, que me recebeu de braços abertos desde o primeiro instante, me proporcionou a honra de trabalhar em sua equipe desde o mestrado, investigando a anatomia de uma surpreendente família botânica. Serei eternamente grata.

Ao CNPQ pela concessão de bolsa de doutorado e pelo auxílio financeiro dado a este trabalho.

Ao professor Marcelo Dornelas por disponibilizar parte do material para análise.

Ao professor Armando C. Cervi, *in memoriam*, a quem tive a honra de conhecer ainda no mestrado, pelo auxílio na identificação das espécies.

Pelas valiosas contribuições durante a aula de qualificação, agradeço a queridíssima professora Nanuza Luíza de Menezes, ao professor Diego Demarco e ao pesquisador e amigo José Hernandes.

À professora Fernanda Cordeiro pelo auxílio nas análises filogenéticas, querida amiga sempre disponível.

Aos técnicos do laboratório Irwandro Pires, pela obtenção das imagens em MEV, Tássia Santos e Gisele Costa pelo auxílio nas atividades de laboratório e pela disponibilidade.

Aos demais colegas e amigos de equipe, Leyde Nayane, Yasmim Hirao, Rafael Cruz, Priscila Cortez, Bruno, Karla, Carlos, e aos demais, adorei conhecer e participar dessa equipe nota 10. Não posso esquecer dos que por aqui passaram, contribuíram e deixaram saudades, a Aline, a Marília, novamente o Zé e a Fer, e especialmente a Renata pelas coletas, fotografias, hospedagem... Por tudo Re!

À Thália Gama e Karina Gagliardi, amigas e irmãs que ganhei em São Paulo, e que facilitaram minha vida nessa cidade grande. Obrigada por toda paciência meninas. Vou levá-las por toda vida. São Paulo não é a mesma sem vocês.

Aos demais colegas de laboratório, em destaque Maria Camila, Natali Capelli, Mariana Victorio, Luíza Teixeira. Foi um enorme prazer conhecer todos vocês e compartilhar momentos maravilhosos no laboratório e, principalmente, na copa do laboratório.

Aos professores da anatomia Verônica Angyalossy, Gregório Ceccantini pela experiência em disciplinas. À Dra. Berta Lange de Morretes, *in memoriam*, com quem tive o prazer de aprofundar conhecimento sobre a influência ambiental na anatomia foliar.

Aos meus admiráveis e primeiros incentivadores, hoje amigos e colegas da Botânica, Ana Paula Lacchia e Iranildo Melo.

Aos meus pais, Francisco Brasileiro e Adalgisa C. B. Brasileiro por tudo. À eles que, sempre acreditaram em mim, até mais do que eu. Aos meus irmãos Alexandre, Andrezza, Andréa e Rebeca, e aos meus seis sobrinhos lindos que amo muito, Victor, Vinicius, Bernardo, Daniel, Murilo e Gustavo. Aos meus cunhados Alex, Val e, especialmente, Samara.

Ao meu esposo José Barboza Neto, mesmo sendo brindado com a distância, me incentivou desde o momento que soube de meus planos. Obrigada pela torcida, pelas horas no telefone e no Skype e por compreender quando não eu tinha essas horas disponíveis, pela paciência nos momentos mais difíceis. O amo e admiro ainda mais!

Á minha eterna amiga Juliana Sales, que sempre se faz presente, dando o apoio de sempre. À querida amiga, colega de profissão, companheira de viagens e desafios, Elisabeth Tolke.

À todos, meu muito obrigada!

## Índice

---

I - Introdução	09
II - Objetivos	19
III - Material e Métodos	20
IV - Resultados e discussão	27
1. Morfologia das estípulas maduras	27
2. Anatomia das estípulas maduras	35
3. Desenvolvimento das estípulas	44
4. Reconstrução dos caracteres ancestrais	61
V - Conclusões	72
VII - Resumo	75
VIII - <i>Abstract</i>	77
Referências bibliográficas	79
Anexos	85



## I. Introdução

---

Passifloraceae é mundialmente conhecida por sua importância econômica (frutos comestíveis, formulação de fármacos), e pela exuberância de suas flores, que apresentam características importantes para a taxonomia da família (Ulmer & MacDougal 2004), em especial, a corona de filamentos (Judd *et al.* 2008). Além dos órgãos reprodutivos, as folhas e suas estípulas também possuem uma grande diversidade morfológica, mostrando-se igualmente úteis na taxonomia do grupo (Ulmer & MacDougal 2004).

A maioria das espécies desta família são trepadeiras ou lianas que possuem gavinhas axilares, ou, menos frequente, possuem hábito arbustivo ou arbóreo com ausência de gavinhas; geralmente apresentam tricomas tectores com diferentes morfologias (Ulmer & MacDougal 2004, Judd *et al.* 2008). Filotaxia é alterna espiralada e, frequentemente, apresentam folhas simples e lobadas ou inteiras e serreadas, com venação palmada, nectários peciolares e laminares, e estípulas presentes. (Cervi 1997, Ulmer & MacDougal 2004, Judd *et al.* 2008).

Passifloraceae possui quatro subfamílias: Malesherbioideae Burnett, contendo 1 gênero e 24 espécies; Turneroideae Eaton, com 12 gêneros e 229 espécies; Passifloroideae Burnett, com 16 gêneros e 705 espécies (Stevens 2001, APG III 2009, APG IV 2016); e Pibirioideae Chase & Christenhusz, a mais recente aquisição de Passifloraceae, com um único gênero monotípico, único grupo da família com estípulas ausentes (Stevens 2001, Maas *et al.* 2019). Totalizando cerca de 30 gêneros e 975 espécies (Stevens 2001), representantes de Passifloraceae estão distribuídos entre as regiões tropicais e temperadas, principalmente entre as américas e a África (Stevens 2001, Simpson 2010). De acordo com a lista da flora do Brasil, existem 4 gêneros e 162 espécies pertencentes a

subfamília Passifloroideae (Passifloraceae *sensu stricto*), e 2 gêneros e 159 espécies da subfamília Turneroideae (Flora do Brasil 2020a, b).

Passifloroideae, a subfamília mais numerosa, tem como principal característica a coroa bem desenvolvida (de Wilde 1971, Ulmer & MacDougal 2004). Está subdividida em duas tribos: Paropsieae de Candolle e Passifloreae de Candolle (Stevens 2001, Muschner *et al.* 2003, Ulmer & Macdougal 2004, Judd *et al.* 2008).

A tribo Paropsieae é um grupo parafilético representado por espécies arbustivas e arbóreas originárias da África, desprovidas de gavinhas (Muschner *et al.* 2003), e que, de acordo com Judd *et al.* (2008), provavelmente representa um grupo basal em Passifloraceae. Em contraste, o hábito lianescente, a presença de gavinhas e as flores especializadas, fazem da tribo Passifloreae um grupo monofilético (Muschner *et al.* 2003, Judd *et al.* 2008). É a tribo mais representativa no continente americano, com quatro gêneros ocorrendo no Brasil: *Ancisthrothyrus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L. (Araújo 2009, Bernacci *et al.* 2015).

O gênero *Passiflora* L. é representado por aproximadamente 625-650 espécies (Stevens 2001, Cervi 2006), sendo que destas 142 ocorrem no Brasil (Bernacci *et al.* 2015). Espécies deste gênero são facilmente reconhecidas por suas características: cinco estames e presença de androginóforo (Ulmer & MacDougal 2004).

A revisão do gênero *Passiflora* realizada por Feuillet & MacDougal (2003), baseada em caracteres morfológicos, reconhece quatro subgêneros: *Astrophea* (57 espécies), *Decaloba* (204 espécies), *Deidamioides* (17 espécies) e *Passiflora* (234 espécies). Posteriormente, Krosnick *et al.* (2009) adicionaram um novo subgênero, *Tetrapathea* (3 espécies).

As espécies do subgênero *Astrophea* são reconhecidas por apresentar características como o hábito lianescente ou arbóreo, de tamanho pequeno a médio, e

folhas não lobadas. O subgênero *Decaloba* é composto por pequenas trepadeiras, com pequenas flores e frutos, as folhas são frequentemente bilobadas e variegadas, com nectários peciolares ausentes. Em contraste, o subgênero *Passiflora* é caracterizado por possuir grandes flores com vistosas coronas (Ulmer & MacDougal 2004, Krosnick *et al.* 2013).

As três espécies do subgênero *Tetrapathea* também são lianescentes, mas chamam atenção por se tratar de espécies dioicas. No subgênero *Deidamioides* estão as espécies mais basais do gênero *Passiflora*, segundo Ulmer & MacDougal (2004), as quais apresentam um conjunto de características que não se encaixam nos demais, como estípulas minúsculas, glândulas peciolares, folhas não-lobadas e compostas possuindo de 3-9 folíolos. A forma juvenil pode possuir gavinhas com um disco adesivo distal, além de as flores surgirem das gavinhas (Ulmer & MacDougal 2004, Krosnick *et al.* 2013).

Apesar das diferenças morfológicas das folhas, do hábito, do tamanho das flores, frutos e brácteas, e da distribuição dos nectários entre os representantes dos subgêneros, esses são grupos monofiléticos, sustentados por dados moleculares e morfológicos (Muschner *et al.* 2003, Hansen *et al.* 2006, Yotoko *et al.* 2011, Muschner *et al.* 2012).

Relações entre os subgêneros *Astrophea*, *Decaloba*, *Deidamioides* e *Passiflora* são propostas usando caracteres morfológicos, tais como a presença de cinco estames e de androginóforo (Killip 1938, Ulmer & MacDougal 2004), e moleculares (Muschner *et al.* 2003, Hansen *et al.* 2006, Yotoko *et al.* 2011, Muschner *et al.* 2012). Contudo, a nível infrasubgenérico alguns grupos não apresentaram sustentação a partir de filogenias moleculares, como mostrado por Zamberlan (2007) em suas análises com espécies dos quatro subgêneros acima citados. Com relação ao subgênero *Passiflora*, apesar de ser um grupo monofilético, as relações entre as seções e superseções não foram esclarecidas

ainda, assim como as superseções *Astrophea* e *Pseudoastrophea* do subgênero *Astrophea* (Zamberlan 2007).

Algumas superseções dentro do subgênero *Decaloba*, por exemplo, mostraram-se monofiléticas, entre elas *Bryonioides* e *Cieca*. Porém as seções *Xerogona* e *Decaloba* (ambas pertencentes da superseção *Decaloba*) demonstraram não se tratar de grupos monofiléticos, uma vez que *P. sexflora* Juss. e *P. lutea* L., pertencentes à seção *Decaloba*, aparecem agrupadas na seção *Xerogona* (Zamberlan 2007).

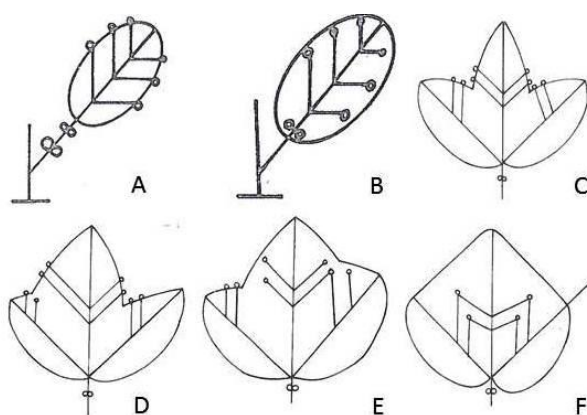
As características morfológicas relacionadas aos órgãos vegetativos que mais contribuem na delimitação desses grupos são: 1) o contorno da lâmina foliar (lobada ou não lobada); 2) a presença e distribuição das glândulas; e 3) a morfologia das estípulas (Ulmer & MacDougal 2004).

Conforme mencionado anteriormente, as folhas em Passifloraceae podem apresentar uma enorme diversidade, podendo ser simples ou compostas, lobadas ou não lobadas, com a margem inteira, denteada ou serreada, apresentando glândulas ou não (Cervi 1997, Ulmer & MacDougal 2004). O caráter lobação da folha contribui, principalmente, na delimitação de três subgêneros: 1) *Decaloba*, que apresenta folhas bilobadas e trilobadas; 2) *Deidamioides*, com folhas não lobadas, porém algumas espécies possuem folhas compostas; e 3) *Passiflora* com folhas não lobadas e lobadas com até nove lobos (Ulmer & MacDougal 2004, Feuillet & MacDougal 2007).

O subgênero *Decaloba* é também caracterizado quanto à distribuição das glândulas foliares, as quais se encontram apenas na superfície abaxial da lâmina foliar, entre as nervuras primárias. Contudo, há espécies desse subgênero que não apresentam glândulas foliares, como espécies da seção *Xerogona* (superseção *Decaloba*). Os demais subgêneros são caracterizados pela presença de glândulas foliares: *Astrophea*, glândulas frequentemente peciolares e, em poucos casos, na margem da lâmina foliar;

*Deidamioides*, com glândulas apenas no pecíolo; e no subgênero *Passiflora* há glândulas peciolares e laminares ocorrendo na posição marginal e submarginal (Ulmer & MacDougal 2004). Em *Tetrapathea* há glândulas peciolares e foliares na região entre as nervuras (Krosnick *et al.* 2009).

Cusset (1970) relaciona a distribuição das glândulas com a lobação da lâmina foliar em espécies de Passifloraceae, e sugere que o caráter “glândulas foliares marginais” em folhas simples é uma condição ancestral dentro da família, ocupando uma posição submarginal secundariamente (Figuras 1A e 1B). Ainda, a partir das folhas simples não lobadas com glândulas marginais, teriam surgido as folhas lobadas também com glândulas marginais. Estas foram precursoras das lâminas foliares com glândulas comissurais, ou seja, posicionadas na região comissural, a qual o *sinu* sofre uma diminuição. Dessa forma, as glândulas assumiram a posição abaxial da lâmina foliar, como ocorre nas espécies do subgênero *Decaloba*, e não mais marginal, como em espécies do subgênero *Passiflora* (Figuras 1C - 1F) (Cusset 1970). Segundo o mesmo autor, a condição mais derivada é a perda total das glândulas na lâmina foliar, situação encontrada nas espécies da seção *Xerogona* (superseção *Decaloba*, subgênero *Decaloba*).



**Figura 1.** Esquema adaptado de Cusset (1970) sugerindo a evolução das folhas em Passifloraceae a partir da posição das glândulas. **A.** Folhas não lobadas com glândulas marginais e peciolares. **B.** Folhas não lobadas com glândulas submarginais. **C.** Folhas lobadas com glândulas marginais localizadas apenas na região dos sinus (incisão entre os lobos). **D e E.** Ilustram os passos entre a forma C e F, a profundidade dos sinus diminui

até que as glândulas, antes marginais, permanecem e assumem uma posição superficial abaxial (F).

A ocorrência de glândulas nas estípulas de Passifloraceae foi descrita muitas vezes na literatura, apesar disso nem sempre sua presença é mencionada pelos taxonomistas, também sua posição, morfologia e número (Killip 1938, Ulmer & MacDougal 2004, Cervi 2006, Feuillet & MacDougal 2007, Bernacci *et al.* 2015).

Sobre a anatomia das folhas de Passifloraceae, esta é bem conhecida (Metcalf & Chalk 1979, López-Meruvia *et al.* 1993a, 1993b, Kurtz *et al.* 2002, Jáuregui *et al.* 2002, Beraldo & Kato 2008, Brasileiro 2014, Farias *et al.* 2016). A epiderme é frequentemente recoberta por uma fina camada de cutícula e tricomas não glandulares estão quase sempre presentes. Em secção transversal, observa-se, comumente, as células epidérmicas da face adaxial maiores em altura que as células da face abaxial, ou ainda as células da face abaxial papilosas. Os estômatos são do tipo anomocíticos e as folhas podem ser classificadas como epiestomáticas ou anfiestomáticas. O mesofilo é dorsiventral, com o parênquima paliádico composto geralmente de apenas uma camada, e o lacunoso com amplas câmaras subestomáticas. Apenas as espécies do gênero *Adenia* apresentam mesofilo isolateral, como verificado por Metcalfe & Chalk (1979) e Brasileiro (2014). Idioblastos são muito frequentes neste tecido, podem conter compostos fenólicos, ou cristais do tipo drusas e/ou prismáticos. Os feixes vasculares podem ser organizados em um arco aberto ou feixe único, e muitas vezes circundados por fibras pericíclicas (Metcalf & Chalk 1979, López-Meruvia *et al.* 1993a, 1993b, Kurtz *et al.* 2002, Jáuregui *et al.* 2002, Beraldo & Kato 2008, Brasileiro 2014, Farias *et al.* 2016).

Na família Passifloraceae, alguns caracteres anatômicos das folhas demonstraram-se bastante úteis na identificação dos taxos, como no caso da superseção *Decaloba* (subgênero *Decaloba*), em que células epidérmicas papilosas são muito frequentes. Esta superseção é subdividida nas seções *Decaloba* e *Xerogona*, que apresentam como

principal diferença anatômica a organização do sistema vascular, arco aberto em *Decaloba* e feixe central único em *Xerogona* (Brasileiro 2014).

Os tricomas não glandulares em forma de gancho auxiliam na identificação de espécies da superseção *Bryonioides* (subgênero *Decaloba*) (Ulmer & MacDougal 2004).

No subgênero *Passiflora*, a superseção *Coccinea* se diferencia das demais por apresentar células epidérmicas papilosas; e a superseção *Laurifolia* apresenta frequentemente células epidérmicas com contorno reto em vista frontal, fibras associadas a todos os feixes e o sistema vascular organizado em arco aberto (Brasileiro 2014).

Muito se conhece a respeito da morfologia e anatomia das folhas de Passifloraceae (Metcalfe & Chalk 1979, López-Meruvia *et al.* 1993a, 1993b, Kurtz *et al.* 2002, Jáuregui *et al.* 2002, Beraldo & Kato 2008, Brasileiro 2014, Farias *et al.* 2016), e quão úteis podem ser na classificação e identificação dos taxos (Ulmer & MacDougal 2004), enquanto que as estípulas, mesmo fornecendo dados importantes, são muitas vezes despercebidas em diversos grupos de plantas (Weberling 2006).

O termo estípula foi inicialmente empregado por Lineu (Lubbock 1899) e trata-se de estruturas que se desenvolvem na base de uma folha, frequentemente, pareadas em lados opostos no ponto de inserção do pecíolo ao eixo caulinar, mas podem estar individualizadas quando as estruturas opostas se fundem – interpeciolar – ou quando há fusão entre estípulas de uma mesma folha – intrapeciolar (Lubbock 1899, Bell 1991, Weberling 2006, Judd *et al.* 2008, Simpson 2010). Por vezes as estípulas são tão diminutas que se assemelham à escamas, mas podem ser tão conspícuas idênticas à folhas inteiras – a partir das quais podem ser reconhecidas pela ausência de gemas axilares (Lubbock 1899, Bell 1991, Judd *et al.* 2008, Simpson 2010). Elas podem apresentar uma infinidade de modificações como espinhos, ócreas, gavinhas, nectários extraflorais, tricomas (Bell 1991, Judd *et al.* 2008) e coléteres (Capelli *et al.* 2017).

Por serem órgãos com morfologia característica e constantemente presente em muitos grupos de plantas, principalmente entre as angiospermas, as estípulas são bastante utilizados na descrição de espécies e, além disso, podem ser um indicativo de parentescos entre taxas (Weberling 2006, Judd *et al.* 2008).

A presença de estípulas é um caráter predominante em Passifloraceae, apresentam ampla diversidade morfológica (Ulmer & Macdougall 2004, Judd *et al.* 2008), e, por isso, é um caráter largamente empregado na distinção entre grupos de espécies (Killip 1983). Nos subgêneros *Decaloba* e *Deidamioides* (gênero *Passiflora*), estípulas inconspícuas e não foliáceas são frequentes, enquanto que entre as espécies do subgênero *Passiflora*, as estípulas são, geralmente, conspícuas com simetria dorsiventral, semelhante a uma folha, sendo descritas como foliáceas (Ulmer & MacDougall 2004, Feuillet & MacDougall 2007).

Durante a formação de uma folha há a atividade de diferentes regiões de crescimento que vão resultar na folha madura (Foster 1936, Esau 1960, Fahn 1989, Dengler & Tsukaya 2001, Beck 2005, Tsukaya 2010, Melo-de-Pinna & Cruz 2020). Para alguns autores, como Foster (1936), Esau (1960) e Fahn (1989), o desenvolvimento foliar pode ser dividido em quatro estágios: 1) iniciação, 2) diferenciação inicial, 3) desenvolvimento do eixo da folha, e 4) origem e histogênese da lâmina foliar. Os três primeiros estágios são caracterizados pelo estabelecimento dos eixos próximo-distal e adaxial-abaxial do primórdio foliar. Segundo estes autores, a iniciação do primórdio foliar surge a partir de divisões que ocorrem em um pequeno grupo de células lateralmente situadas ao meristema apical caulinar. Já nas primeiras etapas do desenvolvimento, o primórdio assume uma forma cônica com a face adaxial achatada e, anatomicamente, consiste em uma protoderme, tecido fundamental e procâmbio. A atividade do meristema apical, geralmente, tem curta duração em angiospermas e o crescimento próximo-distal



ocorre por atividade do meristema intercalar. Ao mesmo tempo ocorrem divisões celulares na região adaxial proporcionando um aumento em volume do primórdio foliar (Foster 1936, Esau 1960, Fahn 1989).

No último estágio de desenvolvimento, é determinada a morfologia da lâmina foliar, caráter este que está relacionado com os meristemas marginal e em placa (“plate meristem”). A lâmina foliar inicia seu desenvolvimento ainda durante o crescimento em comprimento e espessura do primórdio por meio de células das margens que se dividem continuamente, formando o meristema marginal. A atividade do meristema marginal varia entre as regiões do primórdio foliar, de modo que, nas folhas pecioladas, tal crescimento é reprimido na base, da qual se originará o pecíolo (Fahn 1989, Esau 1960, Foster 1936).

O processo da ontogênese foliar também pode ser descrito a partir de três estágios de desenvolvimento: 1) iniciação; 2) morfogênese primária – processos que estabelecem a forma básica da folha, relacionada à sua simetria e sub-regiões; e 3) expansão e morfogênese secundária – ocorre aumento na superfície e no volume final da folha, cuja expansão pode ser isométrica ou alométrica, podendo o órgão manter ou alterar a forma estabelecida durante a morfogênese primária (Dengler & Tsukaya 2001, Beck 2005, Tsukaya 2010; Melo-de-Pinna & Cruz 2020).

De acordo com os autores, na iniciação, tem-se a formação do primórdio foliar, o qual já apresenta polaridade adaxial-abaxial. Na morfogênese primária, são estabelecidas as subregiões da folha, isto é, sua lâmina e a base. Na morfogênese secundária, ocorre um aumento da área superficial e volume por meio da expansão e diferenciação celular, que definirá a forma final da folha, por isso leva um período de tempo maior. Dois padrões de expansão podem ser identificados nesse momento: 1) isométrico – retém a forma estabelecida pela morfogênese primária; e 2) alométrico – a forma inicial é alterada. O

restante do crescimento se dá pela atividade do meristema intercalar e difuso, com um aumento na área e volume (Dengler & Tsukaya 2001, Beck 2005, Tsukaya 2010).

Desde o início da formação da lâmina foliar, os meristemas marginal e em placa encontram-se ativos formando uma expansão centro-lateral de uma determinada região do primórdio. A variação da atividade desses meristemas pode resultar em uma grande diversidade de formas foliares (Dengler & Tsukaya 2001, Beck 2005, Tsukaya 2010). Desta maneira, folhas com diferentes morfologias surgem como resultados de diferentes padrões de desenvolvimento, especialmente perceptíveis na atividade do meristema marginal, que pode ser: 1) prolongada (Dengler & Tsukaya 2001, Beck 2005, Tsukaya 2010); 2) reduzida (Hernandes-Lopes *et al.* 2016, Melo-de-Pinna *et al.* 2016); ou 3) ausente, como, por exemplo, em folhas com morfologia cilíndrica (Dengler & Tsukaya 2001, Beck 2005, Tsukaya 2010).

Recentes estudos realizados por Hernandez-Lopes *et al.* (2016) e Melo-de-Pinna *et al.*(2016) mostram que em folhas suculentas cilíndricas a região de crescimento marginal é periférica, diferente do observado em folhas planas (achatadas no sentido adaxial-abaxial), onde tal região se mantém nos flancos da face adaxial do primórdio.

A partir dos padrões de atividades das regiões meristemáticas, durante a formação de lâminas foliares com simetria dorsiventral ou radial, surgem algumas questões quando pensamos em estípulas que também podem apresentar os dois planos de simetria: 1) Há variação na localização do meristema marginal entre estípulas cilíndricas e as dorsiventrais? 2) Nas estípulas dorsiventrais, a assimetria observada pode ser o resultado da atividade diferencial do meristema marginal em apenas um lado do primórdio de estípula?

## II. Objetivos

---

### 2.1. Objetivo geral:

Realizar um estudo sobre desenvolvimento das estípulas de espécies de *Passiflora* (Passifloraceae) a partir da sua diversidade morfológica, buscando estabelecer as homologias primárias e possíveis sinapomorfias estruturais tendo como base as relações filogenéticas propostas por Yotoko *et al.* (2011).

### 2.2. Objetivos específicos:

- Descrever características morfoanatômicas das estípulas, identificando padrões representados nos subgêneros *Decaloba*, *Deidamioides* e *Passiflora* (gênero *Passiflora*);
- Estabelecer as regiões de crescimento nos diferentes estágios de desenvolvimento das estípulas a partir do ápice caulinar até estípulas completamente expandidas;
- Relacionar as regiões de crescimento envolvidas na formação das estípulas aos padrões morfológicos registrados no gênero *Passiflora*; e
- Realizar mapeamento de caracteres morfológicos e anatômicos estipulares a partir da filogenia proposta por Yotoko *et al.* (2011).

### III. Material e Métodos

---

**Material botânico:** Foram analisadas 20 espécies pertencentes ao gênero *Passiflora*, sendo 6 espécies do subgênero *Decaloba*, 2 do subgênero *Deidamioides* e 12 representantes do subgênero *Passiflora*, selecionadas a partir de caracteres morfológicos das estípulas: formas foliáceas/não foliáceas, conspicuas/inconspícuas, glândulas presentes/ausentes. O material testemunho será depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo (SPF) (Tabela 1).

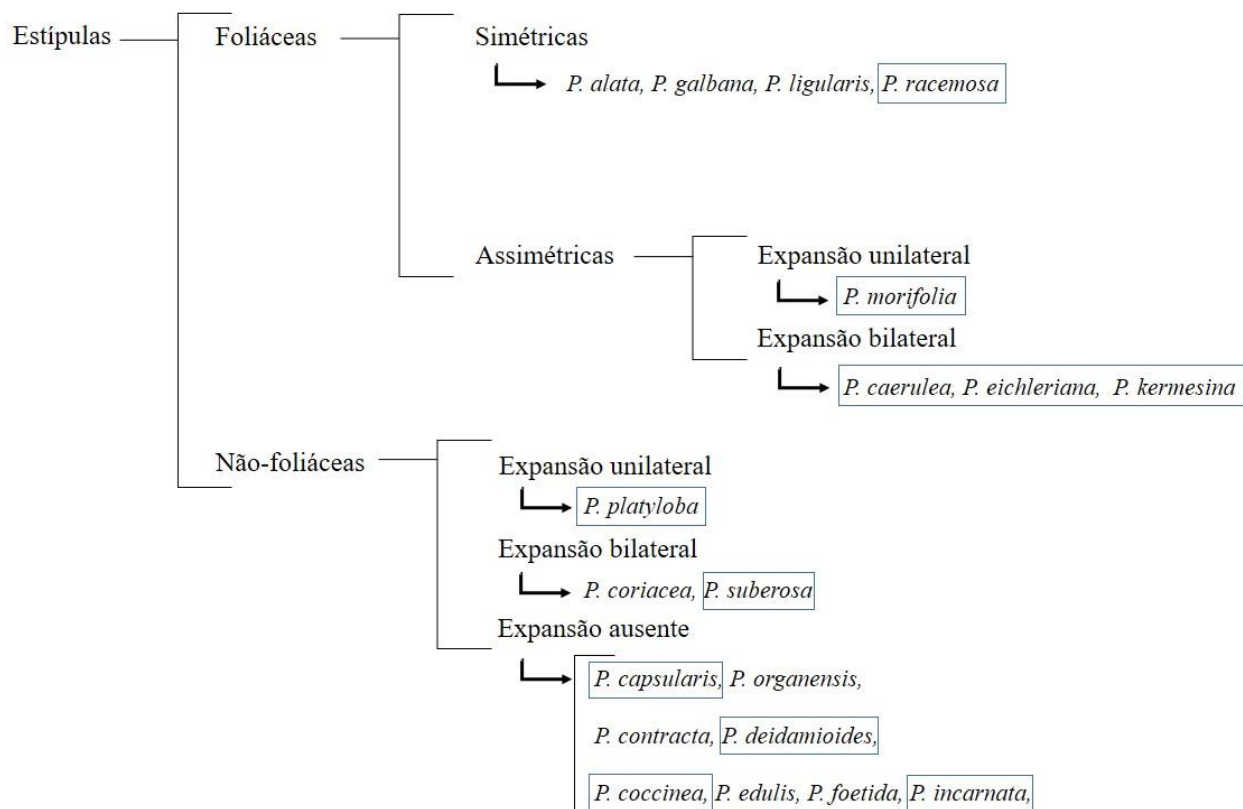
As 20 espécies foram analisadas quanto ao aspecto morfológico e anatômico, porém para o estudo ontogenético, apenas 11 espécies foram analisadas incluindo representantes dos três subgêneros. Para a seleção destas espécies foram consideradas as diferenças morfológicas das estípulas, tais como formato (foliácea ou não), simetria e expansão da lâmina foliar (unilateral, bilateral ou ausente), como mostra a figura 2. Desta forma, as espécies selecionadas foram: *Passiflora racemosa* (foliácea, simétrica), *P. morifolia* (foliácea, assimétrica com expansão unilateral), *P. caerulea*, *P. eichleriana*, *P. kermesina* (foliácea, assimétrica, expansão bilateral), *P. platyloba* (não-foliácea, expansão unilateral), *P. suberosa* (não-foliácea, expansão bilateral), *P. capsularis*, *P. deidamioides*, *P. coccinea* e *P. incarnata* (não-foliácea, expansão lateral ausente).

**Morfologia e anatomia das estípulas maduras:** Estípulas expandidas, por volta do primeiro nó visível, de 3-5 indivíduos/espécie foram fixadas em FAA<sub>50</sub> (formaldeído, ácido acético e etanol 50%) por 24h (Johansen 1940) e em seguida estocados em etanol 70%. Para a classificação da morfologia foram utilizadas fontes bibliográficas disponíveis (Gonçalves & Lorenzi 2007, Ellis *et al.* 2009).

**Tabela 1.** Lista de espécies analisadas, local de coleta e número de coletor.

Subgêneros/Espécies	Coletor e número de coleta
Subgênero <i>Deidamioides</i>	
<i>Passiflora deidamioides</i> Harms	Lemos, R.C.C. 31
<i>P. contracta</i> Vitta	Lemos, R.C.C. 61
Subgênero <i>Decaloba</i>	
<i>P. capsularis</i> L.	Melo-de-Pinna, G.F.A. 231
<i>P. coriacea</i> Juss.	Brasileiro, J.C.B. 121
<i>P. micropetala</i> Mart. ex Mast.	Brasileiro, J.C.B. 121
<i>P. morifolia</i> Mast.	Lemos, R.C.C. 62
<i>P. organensis</i> Gardner	Lemos, R.C.C. 51
<i>P. suberosa</i> L.	Lemos, R.C.C. 59
Subgênero <i>Passiflora</i>	
<i>P. alata</i> Curtis	Brasileiro, J.C.B. 131
<i>P. caerulea</i> L.	Brasileiro, J.C.B. 105
<i>P. coccinea</i> Aubl.	Lemos, R.C.C. 24
<i>P. eichleriana</i> Mast.	Lemos, R.C.C. 15
<i>P. edulis</i> Sims	Brasileiro, J.C.B. 116
<i>P. foetida</i> L.	Lemos, R.C.C. 48
<i>P. galbana</i> Mast.	Lemos, R.C.C. 45
<i>P. incarnata</i> L.	Lemos, R.C.C. 60
<i>P. kermesina</i> Link & Otto	Lemos, R.C.C. 50
<i>P. ligularis</i> Juss.	Lemos, R.C.C. 56
<i>P. platyloba</i> Killip	Brasileiro, J.C.B. 112
<i>P. racemosa</i> Brot.	Lemos, R.C.C. 4

**Ontogênese das estípulas:** Os ápices caulinares de 3-5 indivíduos de onze espécies foram fixados em FAA<sub>50</sub> (formaldeído, ácido acético e etanol 50%) por 24h (Johansen 1940) e estocados em etanol 70%. As espécies foram selecionadas a partir dos padrões morfológicos: 1) estípulas foliáceas simétricas: *Passiflora racemosa*; 2) estípulas foliáceas assimétricas com expansão unilateral: *P. morifolia*; 3) estípulas foliáceas assimétricas com expansão bilateral: *P. caerulea*, *P. eichleriana* e *P. kermesina*; 4) estípulas não foliáceas com expansão da lâmina unilateral: *P. platyloba*; 5) estípulas não foliáceas com expansão da lâmina bilateral: *P. suberosa*; e 6) estípulas não foliáceas com expansão laminar ausente: *P. capsularis*, *P. coccinea*, *P. deidamioides* e *P. incarnata*.



**Figura 2.** Esquema mostrando os principais padrões morfológicos das estípulas de Passifloraceae, a partir dos tipos foliáceos e não-foliáceos, da simetria e da expansão da lâmina. Em destaque espécies selecionadas para a análise ontogenética.

Após esta etapa, o material foi desidratado em série butílica e incluído em parafina seguindo a metodologia descrita por Ruzin (1999). Secções seriadas transversais foram obtidas em micrótomo rotativo e montadas em lâminas histológicas. O material foi desparafinado com acetato de butila e corado com safranina e azul de Astra (Gerlach 1969), em seguida montadas em lâminas permanentes com resina sintética.

**Padrão de vascularização:** Os padrões foram determinados a partir de material diafanizado, empregando-se a técnica de Strittmater (1973), na qual o material foi fervido por três minutos em etanol 95% e depois fervido por mais três minutos numa solução de NaOH 5% e etanol 95%. Em seguida, lavado em água destilada, clarificado em solução de hipoclorito de sódio a 50%, lavado novamente, desidratado em série etanólica e corado com safranina 1% em etanol 70%, sendo então distendido em placas de vidro, tendo como meio de montagem resina sintética. Foi utilizada a terminologia descrita por Ellis *et al.* (2009), adaptada para as estípulas, com a finalidade de descrever os padrões de vascularização em estípulas.

**Identificação dos compostos fenólicos:** Estípulas maduras previamente fixadas em FAA por 24h (Johansen 1940) e FNT (formalina neutra tamponada) por 48h (Lillie 1965), foram incluídas em parafina (Ruzin 1999), seccionadas transversalmente e, sobre a lâmina, foi aplicado o reagente cloreto férrico a 10% (Johansen 1940).

Em todas as situações o registro fotográfico foi realizado por meio do Sistema de Digitalização de Imagem IM50 acoplado ao microscópio Leica DMLB do Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB/USP).

**Microscopia eletrônica de varredura (MEV):** Ápices caulinares e estípulas maduras por volta do primeiro nó visível foram dissecados sob estereomicroscópio e, posteriormente, submetido à desidratação em série etanólica e ao ponto crítico com gás carbônico para secagem (CPD 030, Balzer). Depois de secas, as amostras foram montadas em suportes metálicos (*stubs*) e metalizadas com ouro (Silveira, 1989) para observação em Microscópio Zeiss (DSM 940) pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB/USP.

**Obtenção das sequências e análises filogenéticas:** As sequências gênicas de RBCL, rps4, trnL (intron) e trnL-trnF foram adquiridas no portal do GenBank, NCBI, através dos acessos fornecidos por Yotoko *et al.* (2011) (Tabela 2) e alinhadas pelo programa Muscle (Edgar 2004). Após o alinhamento, as sequências foram conferidas manualmente através do programa Mesquite (Madisson & Maddison 2015). Para cada alinhamento foi estimado o melhor modelo evolutivo através do método AIC- Akaike Information Criterion, utilizando-se o software MEGA. Todos os alinhamentos tiveram como melhor modelo evolutivo GTR+G.

Para as análises Bayesiana e de Máxima Verossimilhança as sequências foram concatenadas em uma única matrix, tendo o melhor modelo evolutivo aplicado a cada uma das sequências. Para ambas as análises, trabalhamos com dois conjuntos de espécies. O primeiro conjunto inclui todas as espécies presentes na Tabela 2 (46 espécies), para posterior reconstrução dos caracteres ancestrais referentes à morfologia das estípulas. O segundo, apenas com as espécies destacadas com \*, as quais foram inicialmente selecionadas (Tabela 2) para posterior reconstrução dos caracteres ancestrais referentes à anatomia de tais estípulas.

Para cada um dos grupos mencionados acima realizamos a análise Bayesiana no programa Mr. Bayes v. 3.2.6 (Ronquist *et al.* 2012). Nós utilizamos a cadeia MCMC (Markov Chain Monte Carlo) em 10.000.000 de gerações, com amostragem a cada 1.000 gerações, descartando as primeiras 500.000 gerações de burn-in (5%). As hipóteses foram sumarizadas em uma única árvore. A árvore foi enraizada em *Passiflora deidamioides*, assim como no artigo de Yotoko *et al.* (2011).

Também, para cada um dos grupos mencionados anteriormente, realizamos a análise de Máxima Verossimilhança (ML), utilizando o programa RAXMLgui (Silvestro



& Michalak 2012). A análise foi realizada em 10.000 repetições com bootstrap. A árvore foi enraizada em *P. deidamioides*, assim como no artigo de Yotoko *et al.* (2011).

Como a topologia de ambas as análises mostraram as mesmas relações entre as espécies para os dois grupos, optamos utilizar as árvores originárias da análise de Máxima Verossimilhança para a reconstrução de caracteres ancestrais.

**Reconstrução dos caracteres ancestrais:** De posse da hipótese filogenética (árvore de ML) e da descrição dos caracteres morfológicos e anatômicos (Anexos I e II), uma matriz táxon/caracteres foi elaborada. Os caracteres codificados na matriz, tratados como não ordenados, foram utilizados para a reconstrução dos caracteres ancestrais por meio da Máxima Verossimilhança pelo programa Mesquite (Maddison & Maddison 2015).

**Tabela 2.** Número de acesso das sequências gênicas de *Passiflora* disponíveis no portal NCBI utilizadas neste estudo. Todas provêm do trabalho de Yotoko *et al.* (2011).

Espécies	RBCL	rps4	trnL intron	trnL-trnF
<i>P. actínia</i>	HQ900845	HQ900897	HQ900949	HQ901001
<i>P. alata</i> *	HQ900846	HQ900898	HQ900950	HQ901002
<i>P. auriculata</i>	HQ900847	HQ900899	HQ900951	HQ901003
<i>P. caerulea</i> *	HQ900848	HQ900900	HQ900952	HQ901004
<i>P. campanulata</i>	HQ900849	HQ900901	HQ900953	HQ901005
<i>P. caparidifolia</i>	HQ900850	HQ900902	HQ900954	HQ901006
<i>P. capsularis</i> *	HQ900851	HQ900903	HQ900955	HQ901007
<i>P. cerasina</i>	HQ900852	HQ900904	HQ900956	HQ901008
<i>P. coccinea</i> *	HQ900854	HQ900906	HQ900958	HQ901010
<i>P. deidamioides</i> *	HQ900855	HQ900907	HQ900959	HQ901011
<i>P. edmundoi</i>	HQ900856	HQ900908	HQ900960	HQ901012
<i>P. edulis</i> *	HQ900857	HQ900909	HQ900961	HQ901013
<i>P. eichleriana</i> *	HQ900858	HQ900910	HQ900962	HQ901014
<i>P. foetida</i> *	HQ900859	HQ900911	HQ900963	HQ901015
<i>P. galbana</i> *	HQ900860	HQ900912	HQ900964	HQ901016
<i>P. gardnerii</i>	HQ900861	HQ900913	HQ900965	HQ901017
<i>P. gibertii</i>	HQ900862	HQ900914	HQ900966	HQ901018
<i>P. hatschbachi</i>	HQ900863	HQ900915	HQ900967	HQ901019
<i>P. incarnata</i> *	HQ900864	HQ900916	HQ900968	HQ901020
<i>P. kermesina</i> *	HQ900868	HQ900920	HQ900972	HQ901024
<i>P. leptoclada</i>	HQ900869	HQ900921	HQ900973	HQ901025
<i>P. ligularis</i> *	HQ900870	HQ900922	HQ900974	HQ901026
<i>P. loefgrenii</i>	HQ900871	HQ900923	HQ900975	HQ901027
<i>P. micropetala</i>	HQ900872	HQ900924	HQ900976	HQ901028
<i>P. miersii</i>	HQ900873	HQ900925	HQ900977	HQ901029
<i>P. misera</i>	HQ900874	HQ900926	HQ900978	HQ901030
<i>P. morifolia</i> *	HQ900875	HQ900927	HQ900979	HQ901031
<i>P. mucronata</i>	HQ900876	HQ900928	HQ900980	HQ901032
<i>P. organensis</i> *	HQ900877	HQ900929	HQ900981	HQ901033
<i>P. nítida</i>	HQ900878	HQ900930	HQ900982	HQ901034
<i>P. palmeri</i>	HQ900879	HQ900931	HQ900983	HQ901035
<i>P. picturata</i>	HQ900880	HQ900932	HQ900984	HQ901036
<i>P. pilosicorona</i>	HQ900881	HQ900933	HQ900985	HQ901037
<i>P. platyloba</i> *	HQ900882	HQ900934	HQ900986	HQ901038
<i>P. racemosa</i> *	HQ900884	HQ900936	HQ900988	HQ901040
<i>P. serratodigitata</i>	HQ900885	HQ900937	HQ900989	HQ901041
<i>P. sidaefolia</i>	HQ900886	HQ900938	HQ900990	HQ901042
<i>P. suberosa</i> *	HQ900888	HQ900940	HQ900992	HQ901044
<i>P. sub-rotunda</i>	HQ900889	HQ900941	HQ900993	HQ901045
<i>P. tricuspis</i>	HQ900890	HQ900942	HQ900994	HQ901046
<i>P. truncata</i>	HQ900891	HQ900943	HQ900995	HQ901047
<i>P. tulae</i>	HQ900892	HQ900944	HQ900996	HQ901048
<i>P. urubiscensis</i>	HQ900893	HQ900945	HQ900997	HQ901049
<i>P. vespertillio</i>	HQ900894	HQ900946	HQ900998	HQ901050
<i>P. vitifolia</i>	HQ900895	HQ900947	HQ900999	HQ901051
<i>P. watsoniana</i>	HQ900896	HQ900948	HQ901000	HQ901052

## IV. Resultados e Discussão

---

### 4.1. Morfologia das estípulas maduras

Apesar da grande diversidade morfológica (Figuras 3, 4 e Anexo II), todas as espécies estudadas apresentam estípulas sésseis, simples, aos pares e inseridas na base do pecíolo. A partir do material analisado, as estípulas foram classificadas em dois grandes grupos: foliáceas (Figura 3) – apresentam expansão semelhante a uma folha dorsiventral – e não foliáceas (Figura 4).

Entre as foliáceas, as estípulas apresentaram expansões laterais simétricas (Figuras 3A-D), ou assimétricas (Figuras 3E-H). Todas as estípulas do tipo foliácea simétrica possuem forma ovada (*Passiflora galbana*, *P. ligularis* e *P. racemosa*) ou lanceolada (*P. alata*) e ápice agudo ou ápice acuminado, como em *P. ligularis* e *P. racemosa*.

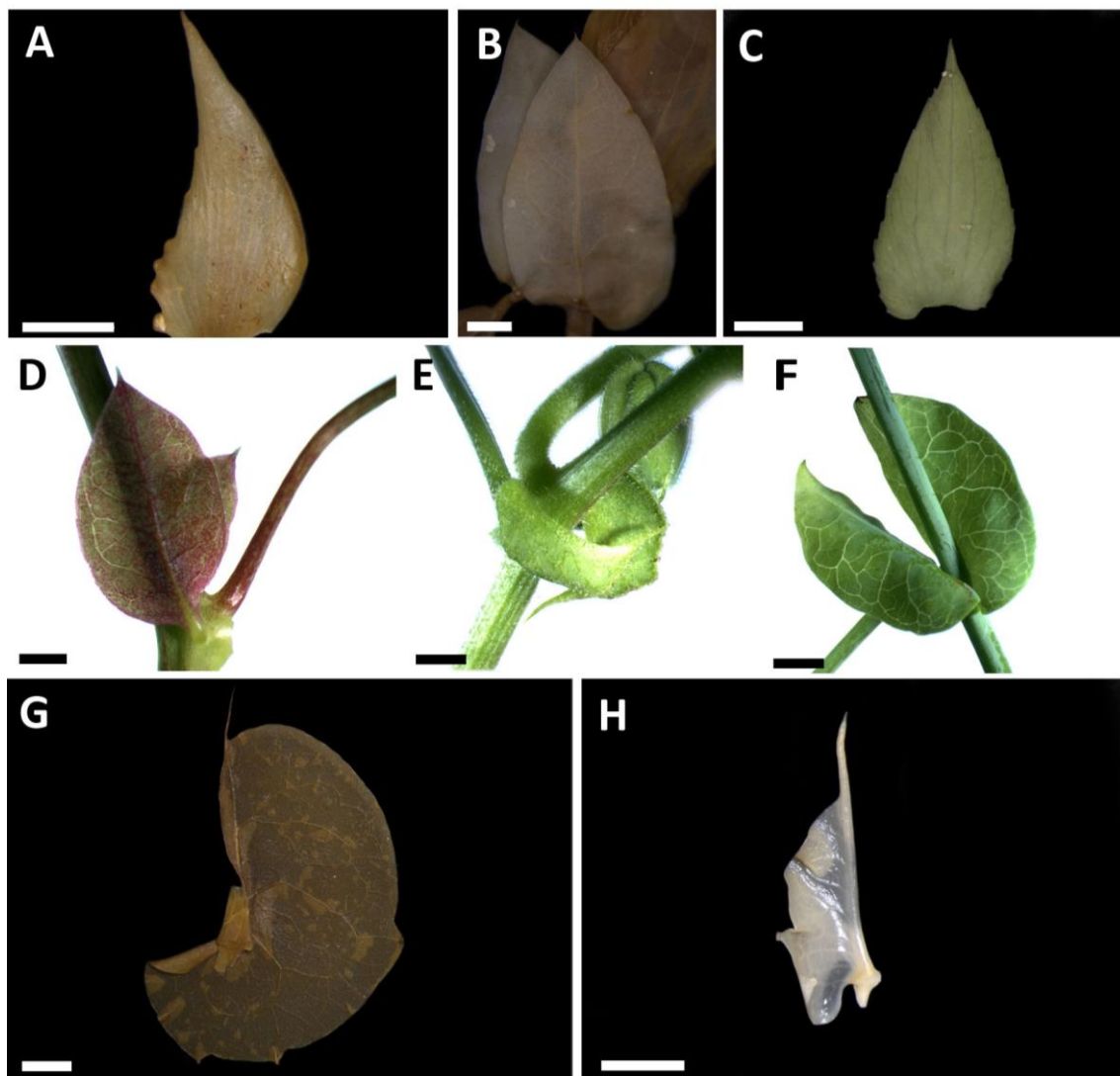
Já as formas foliáceas assimétricas são falciformes (*P. morifolia*), reniformes (*P. kermesina*) ou subreniformes (*P. caerulea* e *P. eichleriana*) (Figuras 3E-H), geralmente com o ápice caudado, e apenas *P. eichleriana* com o ápice agudo.

Estípulas do tipo foliáceas são amplamente descritas na família Passifloraceae (Feuillet 2004, Ulmer & MacDougal 2004), e mostrou-se muito frequente no gênero *Passiflora*, especialmente, entre as espécies do subgênero *Passiflora*. No entanto, em meio as espécies do subgênero *Decaloba* analisadas, foi confirmado este tipo de estípula apenas em *Passiflora morifolia*, subgênero que apresenta com frequência estípulas não foliáceas.

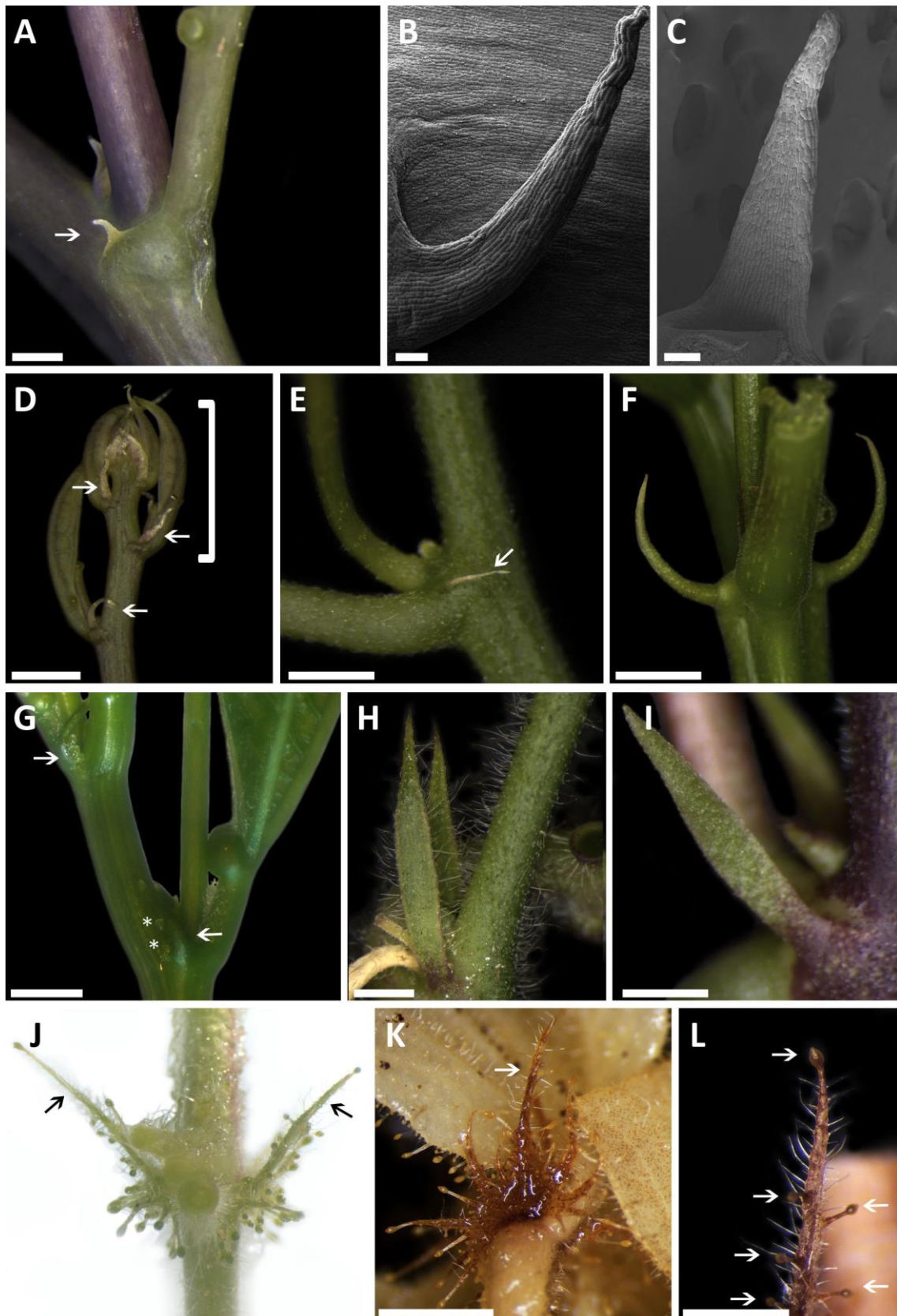
Além da excepcional estípula foliácea, *P. morifolia* apresenta as folhas recobertas por tricomas tectores em forma de gancho (Ulmer & MacDougal 2004, Brasileiro 2014), que é uma das características que auxiliam na identificação das espécies da superseção

Bryonioides da qual *P. morifolia* pertence (Ulmer & MacDougal 2004). Além disso, essa espécie possui folhas trilobadas com o lobo central maior que os laterais, enquanto as demais folhas do subgênero *Decaloba* apresentam o encurtamento do lobo central (Ulmer & MacDougal 2004, Brasileiro 2014). Dessa forma, é provável que este seja um conjunto de caracteres morfológicos únicos da superseção *Bryonioides* dentro do subgênero *Decaloba*.

Em relação às as estípulas não foliáceas foram registrados os tipos setácea, linear ou sectada/partida (Figura 4). As setáceas são alongadas e apresentam uma discreta diminuição do tamanho, de forma gradual, do ápice à base, observada em *P. contracta*, *P. deidamioides*, *P. capsularis*, *P. micropetala*, *P. organensis*, *P. coccinea*, *P. edulis*, *P. incarnata* e *P. platyloba*. As espécies do subgênero *Deidamioides* apresentam uma estípula diminuta (Figuras 4A – 4D), semelhante a uma cerda, e com coloração esbranquiçada. As demais estípulas setáceas possuem coloração esverdeada-acastanhada (Figuras 4E – 4I).



**Figura 3.** Morfologia das estípulas foliáceas de Passifloraceae. **A-D.** Estípulas foliáceas com lâmina simétrica; **A.** *Passiflora alata*, estípula com morfologia lanceolada, ápice agudo e denteações apenas na margem em que se localizam as glândulas (margem esquerda da estípula), e margem oposta (à direita) inteira; **B.** *P. galbana*, estípula com morfologia ovada, ápice agudo e margem inteira; **C.** *P. ligularis*, estípula com morfologia ovada, ápice acuminado e margem denteada; **D.** *P. racemosa*, estípula com morfologia ovada, ápice acuminado e margem inteira; **E-H** Estípulas foliáceas com lâmina assimétrica; **E.** Estípula falciforme de *P. morifolia*, com ápice caudado e margem inteira; **F.** Estípula reniforme de *P. eichleriana*, ápice agudo e margem inteira; **G.** Estípula reniforme de *P. kermesina*; ápice caudado e margem denteada na porção das glândulas marginais; **H.** Estípula subreniforme de *P. caerulea*, com ápice caudado e margem denteada na porção das glândulas marginais. Barra = 2mm.

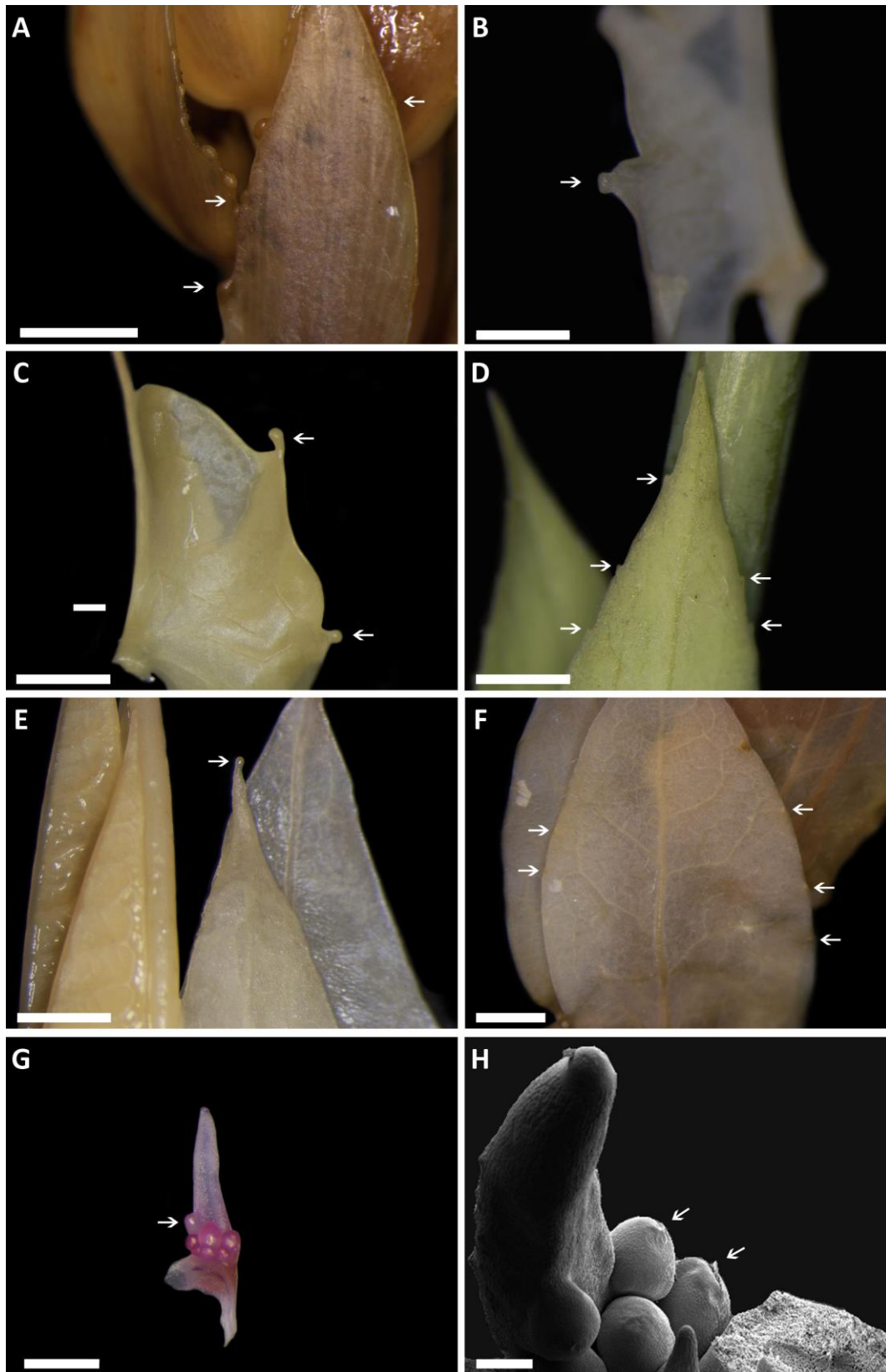


**Figura 4.** Morfologia das estípulas não foliáceas de Passifloraceae. **A.** Estípula setácea de *Passiflora deidamioides* (seta) (Barra = 500 $\mu$ m); **B.** Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da face abaxial da estípula de *P. deidamioides*, evidenciando a total ausência de estômatos (Barra = 100 $\mu$ m); **C.** Face adaxial da estípula de *P. deidamioides* (MEV), estômatos também ausentes (Barra = 100 $\mu$ m); **D.** Estípula setácea de *P. contracta*

(seta) (Barra = 1mm); **E.** Estípula setácea de *P. organensis* (seta) (Barra = 1mm); **F.** Estípula setácea de *P. edulis* (Barra = 2mm); **G.** Estípula setácea de *P. incarnata* (seta), com glândulas marginais presentes (\*) (Barra = 2mm); **H.** Estípula linear de *P. suberosa* com ápice acuminado (Barra = 1mm); **I.** Estípula linear de *P. coriacea* com ápice agudo (Barra = 1mm); **J.** Vista lateral das estípulas sectadas de *P. foetida*, é possível observar uma das projeções, a projeção central (setas) que corresponde a nervura principal e, ainda, as glândulas distribuídas por toda a estípula; **K.** Vista frontal da estípula de *P. foetida*, onde é possível observar toda a estípula (base e projeções), cada projeção com uma glândula terminal, na seta a projeção central (fotografia feita a partir de material fixado) (Barra = 2mm); **L.** Destaque para uma das projeções da estípula de *P. foetida* com uma glândula terminal e glândulas marginais (setas) (Barra = 1mm).

Apenas duas espécies apresentam a estípula com a morfologia linear, *P. coriacea* e *P. suberosa*, sendo distintas quanto ao ápice. Em *P. coriacea*, as estípulas apresentam ápice agudo; e em *P. suberosa*, o ápice é acuminado (Figura 4H). O terceiro tipo não foliácea é a estípula de *P. foetida*, classificada como estípula sectada (Figuras 4J – 4L). No terço proximal da estípula há uma porção inteira que se divide formando segmentos paralelos entre si, com uma nervura de calibre semelhante em cada segmento (Figura 4K). O ápice de cada segmento termina em uma glândula, as quais também se encontram distribuídas por toda a margem dos segmentos e da porção basal (Figura 4L).

Um segundo tipo de glândula, semelhante aos nectários extraflorais, foi observado nas estípulas da maioria das espécies analisadas do subgen. *Passiflora* (Figura 5), exceto em *P. racemosa* e *P. edulis* (Figuras 3B e 4F). Estas, assim como as demais espécies do subgen. *Decaloba* e *Deidamioides*, não apresentam glândulas nas estípulas (Figuras 4A – 4E, 4H e 4I). As glândulas estipulares de *Passiflora* estão localizados preferencialmente nas margens, nas estípulas foliáceas ou não foliáceas. Em *P. incarnata*, além de marginais, as glândulas também estão localizados na face adaxial no terço proximal da estípula (Figura 4G, 5G e 5H).



**Figura 5.** Glândulas marginais (setas) das estípulas de espécies do subgênero *Passiflora*. **A.** Estípula foliácea simétrica de *Passiflora alata*, glândulas mais frequentes na margem denteada (Barra = 2mm); **B.** Estípula foliácea assimétrica de *P. caerulea*, glândulas apenas na margem da porção laminar que tem maior expansão e denteações (Barra = 1mm); **C.** Estípula foliácea assimétrica de *P. kermesina* ainda jovem, glândulas apenas na porção laminar que tem maior expansão e denteações (Barra = 1mm); **D.** Estípula



foliácea simétrica de *P. ligularis*, glândulas distribuídas por toda a margem, margem totalmente denteada (Barra = 1mm); **E.** Estípula foliácea assimétrica de *P. eichleriana* ainda jovem, com apenas uma glândula terminal (Barra = 1mm); **F.** Estípula foliácea simétrica de *P. galbana* com glândulas distribuídas por toda a margem, margem inteira (Barra = 2mm); **G.** Estípula não foliácea de *P. incarnata* diafanizada, glândulas localizadas na porção basal (face adaxial) e marginal (Barra = 500 $\mu$ m); **H.** Microscopia eletrônica de varredura da estípula de *P. incarnata* com glândulas na porção basal e marginal (Barra = 200 $\mu$ m).

Em muitas estípulas, as glândulas se encontram na porção denteada da margem, como em *Passiflora alata*, *P. caerulea*, *P. kermesina* e *P. ligularis* (Figuras 5A – 5D). No caso de *P. galbana*, estas glândulas estão distribuídas por toda a margem (Figura 5F). Já *P. eichleriana* possui apenas uma glândula terminal para cada estípula (Figura 5E) e esta, provavelmente, encerra sua atividade antes mesmo que a folha (a qual está associada) atinja a completa expansão. Isso é verificado nos nós seguintes, nos quais as glândulas apresentam aparência ressequida, coloração acastanhada e as células da epiderme secretora colapsadas.

Nectários extraflorais são comuns em estípulas, e já foram descritos ocorrendo em muitas espécies de Passifloraceae (Killip 1938, Cervi 1997, Ulmer & MacDougal 2004). Nas espécies analisadas, essas glândulas ocorrem apenas na posição marginal das estípulas do subgênero *Passiflora*, sejam elas foliáceas ou não foliáceas. Nas estípulas das espécies do subgênero *Decaloba*, os nectários são ausentes.

Nas folhas, a presença de nectários extra florais também já foi descrita em Passifloraceae (Metcalf & Chalk 1979, Roth 1974a, Roth 1974b, Durkee *et al.* 1981, Durkee 1982, Durkee 1983, Elias 1983, Durkee *et al.* 1984, Garcia *et al.* 2000, Jaurégui *et al.* 2002a, Ulmer & MacDougal 2004, Rocha & Silva 2008, Cardoso 2010, Brasileiro 2014, Lemos *et al.* 2017). No subgênero *Passiflora*, é comum a ocorrência de nectários laminares marginais ou submarginais, e peciolares; enquanto nas folhas das espécies do

subgênero *Decaloba*, os nectários estão distribuídos na superfície abaxial da lâmina foliar, quando presentes.

Dessa forma, entendemos que os mecanismos moleculares que estão envolvidos na formação das glândulas nas folhas estendem-se às estípulas, e, por tanto, os nectários marginais ocorrem apenas nas estípulas de espécies do subgênero *Passiflora*, e estão ausentes nas estípulas das espécies dos subgêneros *Decaloba* e *Deidamioides*.

De um modo geral, nectários extraflorais em Passifloraceae têm uma ampla distribuição, lâmina foliar, pecíolo, estípulas e brácteas (Ulmer & MacDougal 2004). Porém, em revisões taxonômicas a presença ou ausência de glândulas nas estípulas são muitas vezes não citadas, provavelmente pela dificuldade de visualização após a herborização. Nos trabalhos de Araújo (2009), Short (2011) e Costa *et al.* (2015), a presença ou ausência dessas glândulas não são mencionadas.

Killip (1938) realizou o tratamento taxonômico de cerca de 360 espécies de Passifloraceae, destas, 22 espécies foram descritas com glândulas nas estípulas sempre em posição marginal. Algumas espécies não foram citadas a presença ou ausência dessas glândulas, como em *Passiflora alata*, *P. caerulea*, *P. eichleriana*, *P. galbana*, *P. gardineri*, *P. incarnata*, *P. kermesina* e *P. ligularis*, as 8 espécies foram descritas no atual trabalho com o estado de caráter nectários extraflorais presentes nas estípulas.

Cervi (1997) também realizou uma descrição morfológica criteriosa de 50 espécies do gênero *Passiflora*, incluindo a morfologia das estípulas. O autor descreveu a presença de glândulas estipulares em 8 espécies, e em 6 espécies que há glândulas nas estípulas não foram mencionadas sua presença/ausência (*Passiflora alata*, *P. caerulea*, *P. eichleriana*, *P. galbana*, *P. gardineri*, e *P. kermesina*).

No atual trabalho, das 20 espécies analisadas, 9 espécies possuem nectários extraflorais nas estípulas, todas do subgênero *Passiflora*, ou seja, das 12 espécies

analisadas deste subgênero, 75% apresentaram este estado de caráter. Este resultado nos leva a reflexão de que as estípulas de Passifloraceae precisam ser analisadas *in vivo*, ou armazenadas em material fixador apropriado para uma melhor análise estrutural.

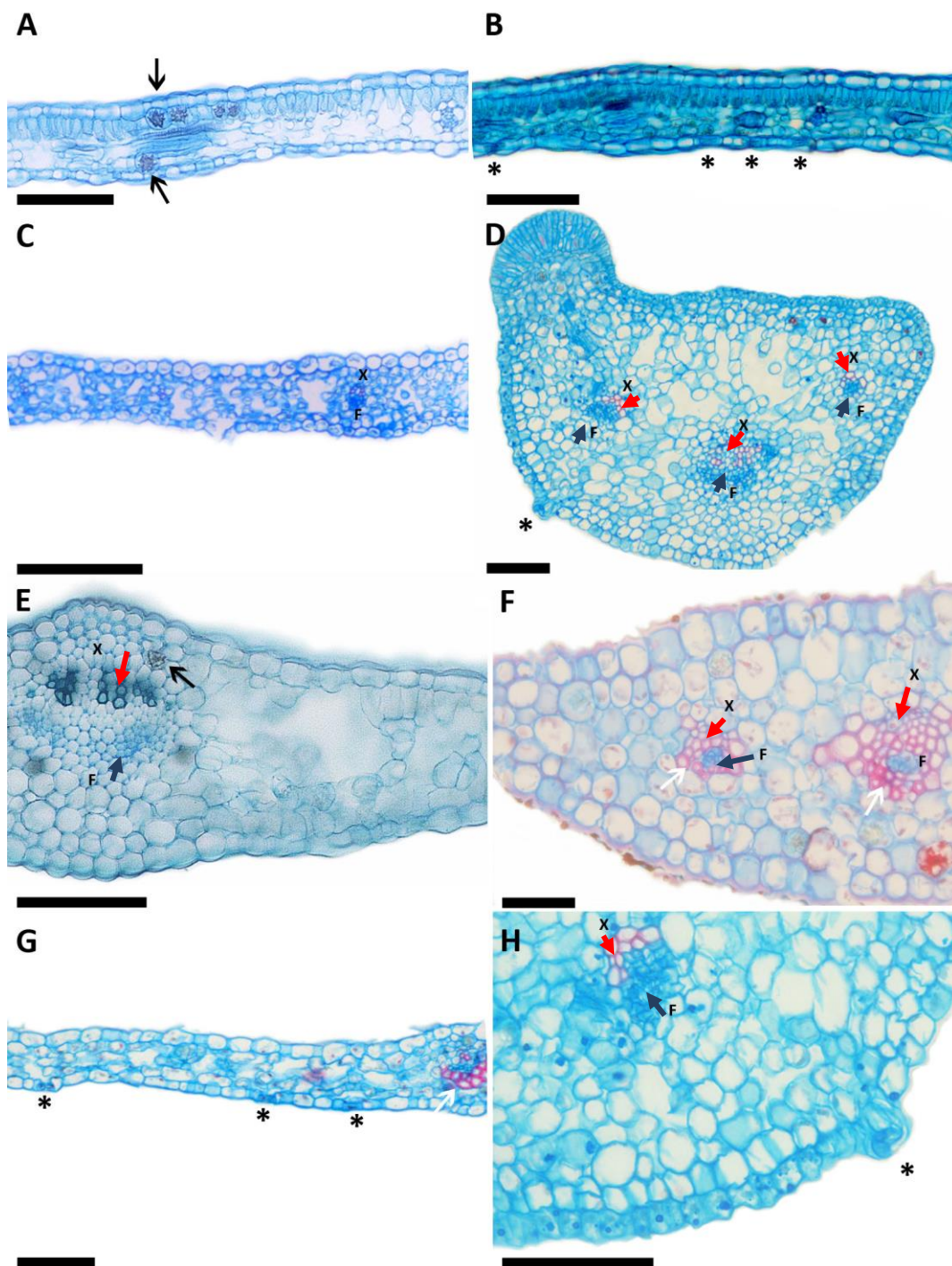
A presença/ausência, a forma, a posição, o número dos nectários são uma importante fonte de informação, como verificou Cervi (1997) analisando as glândulas peciolares de espécies de Passifloraceae, e constatou ser um caráter diferencial entre grupos e entre espécies.

*Passiflora foetida*, por exemplo, é a única espécie do subgenênero *Passiflora* que não apresenta nectários extraflorais na folha e nas estípulas, contudo faz parte de um grupo infrasubgenérico (*Dysosmia*) caracterizado pela presença de glândulas de resina (Durkee *et al.* 1984, Lemos *et al.* 2017). Essas glândulas também estão distribuídas nas estípulas, na porção marginal, assim como na folha, e atingem a maturidade ainda no início da expansão da folha jovem. A estípula de *P. foetida* é sectada e, assim como suas brácteas, possui uma glândula terminal, como verificado por Cervi (1997). A folha jovem também possui uma glândula terminal que, aparentemente, encerra a atividade secretora muito cedo, sugerido pelo tecido glandular necrosado.

## **4.2. Anatomia das estípulas maduras**

### **4.2.1. Sistema de revestimento**

Analisadas a partir das secções transversais, as células epidérmicas das faces adaxial e abaxial possuem a mesma altura na maior parte das estípulas (Figuras 6A e 6B). Apenas *Passiflora morifolia* e *P. foetida* apresentam as células epidérmicas da face adaxial maiores em altura que as células da face abaxial (Figura 6C). Já em *P. incarnata*, as células da face adaxial são menores em altura que as células da face abaxial (Figura 6D).



**Figura 6.** Secções transversais das estípulas de Passifloraceae. **A.** *Passiflora kermesina* (estípula foliácea, subgênero *Passiflora*), células epidérmicas da face adaxial e abaxial com mesma altura, mesofilo com organização bilateral do parênquima, amplos espaços intercelulares e idioblastos contendo drusas próximas a região da nervura (seta negra) (Barra = 100µm); **B.** *P. caerulea* (estípula foliácea, subgênero *Passiflora*), células epidérmicas aba e adaxial com a mesma altura, mesofilo com organização bilateral, estômatos na face adaxial (\*) (Barra = 100µm); **C.** *P. morifolia* (estípula foliácea, subgênero *Decaloba*), células epidérmicas da face adaxial maiores em altura que as células da face abaxial, mesofilo homogêneo com amplos espaços intercelulares, feixe vascular colateral (Barra = 200µm); **D.** Região proximal da estípula não foliácea de *P. incarnata*, estômato (\*) em nível superior que as demais células epidérmicas, feixes vasculares colaterais (Barra = 100µm); **E.** Região da nervura central da estípula de *P.*

*galbana*, espessamento da parede periclinal externa das células epidérmicas de ambas as faces, idioblastos contendo drusas (seta negra), feixe central colateral (Barra = 100µm); **F.** *P. coriacea*, paredes lignificadas das células epidérmicas das faces adaxial e abaxial, fibras pericíclicas em todos os feixes vasculares (seta branca), feixes colaterais (Barra = 50µm); **G.** *P. racemosa* (subgênero *Passiflora*, estípula foliácea) estômatos na face adaxial (\*), mesofilo homogêneo, feixe vascular colateral (seta branca) (Barra = 100µm); **H.** *P. incarnata*, detalhe do estômato em nível superior que as demais células da epiderme (Barra = 100µm). X = xilema e F = floema.

O espessamento da parede periclinal externa das células epidérmicas não é comum, tendo sido observado apenas nas células das faces adaxial e abaxial das estípulas de *P. galbana* (Figura 6E). Em *P. coriacea*, observamos a lignificação das células epidérmicas nas faces adaxial e abaxial (Figura 6F).

Estômatos estão presentes em todas as estípulas, exceto nas diminutas de *P. deidamioides* e *P. contracta* (subgen. *Deidamioides*) (Figuras 4A e 4D). A distribuição dos estômatos é variável, mas ocorrem, preferencialmente, em ambas as faces da superfície das estípulas. Entretanto algumas possuem estômatos apenas na face adaxial, como *P. organensis* e *P. platyloba* (ambas não foliáceas), e outras apenas na face abaxial, como as estípulas foliáceas de *P. alata*, *P. eichleriana*, *P. kermesina*, *P. morifolia* e *P. racemosa*, e na estípula não foliácea de *P. incarnata* (Figuras 6D, 6F – 6H).

As células estomáticas estão geralmente no mesmo nível das demais células epidérmicas quando observadas em secção transversal (Figuras 6B e G). Apenas *P. coriacea* e *P. incarnata* apresentam as células estomáticas em um nível superior as demais células epidérmicas (Figura 6H).

#### 4.2.2. Parênquima fundamental e região da nervura central

Nas espécies que apresentaram o desenvolvimento da lâmina foram verificados dois tipos principais de mesofilo: o homogêneo e o bilateral (Figuras 6 e 7). O primeiro é o mais comum, está presente em quase todas as estípulas (Figuras 6C, 6F e 6G, 7A, 7B e

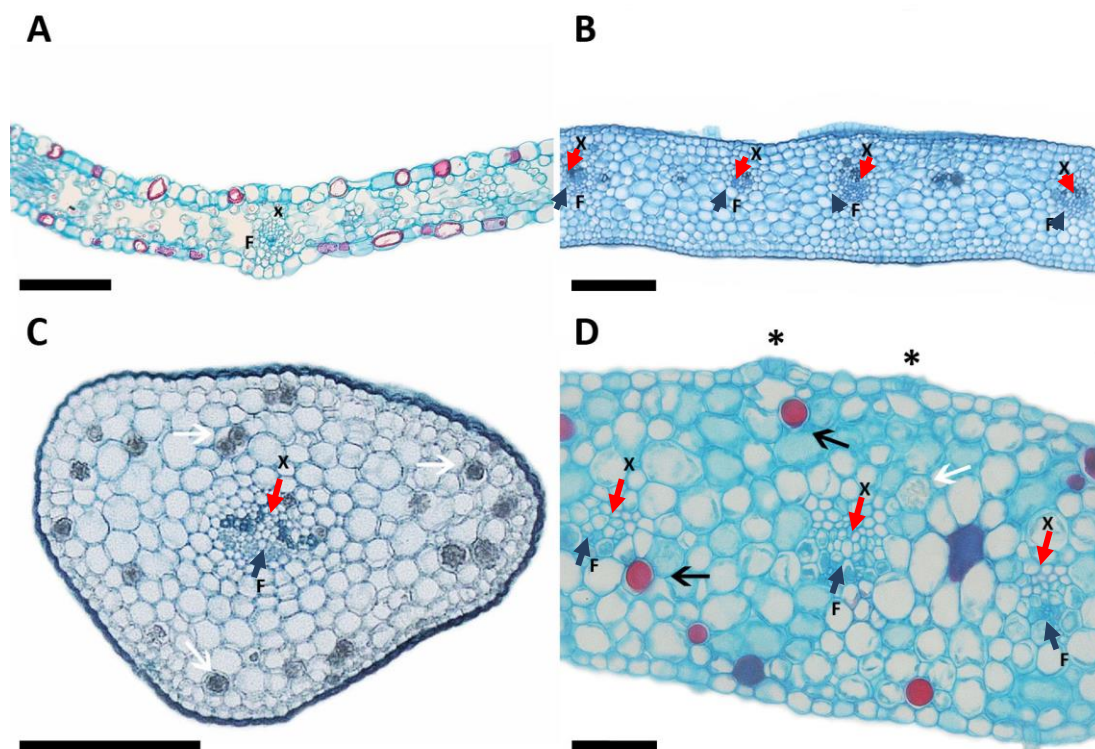
7D). O segundo tipo, mesofilo bilateral, foi verificado apenas em estípulas foliáceas (exclusivamente em *P. caerulea*, *P. eichleriana* e *P. kermesina*) (Figuras 6A e 6B). No mesofilo das estípulas foliáceas, é comum a presença de amplos espaços intercelulares, exceto em *P. alata* que possui poucos espaços (Figura 7B). Nas estípulas que não houve a formação do mesofilo, como *P. contracta*, *P. deidamioides*, *P. edulis* e *P. organensis*, o tecido parenquimático apresenta células isodiamétricas e reduzidos espaços intercelulares (Figura 7C).

A estípula não foliácea de *P. incarnata* apresenta o tecido parenquimático com uma organização ao longo do eixo próximo-distal diferente, de modo que, nas secções transversais da porção proximal ocorrem numerosos espaços intercelulares, quando comparado à porção distal da mesma estípula, diferente do que foi observado em outras estípulas com a mesma morfologia (Figuras 8 e 9).

Tecido colenquimático também foi observado nas estípulas de algumas espécies, sendo encontrado na região das nervuras de maior calibre, uma ou duas camadas de células internamente adjacentes a epiderme (Figuras 6E e 7A), como nas estípulas foliáceas de *P. caerulea*, *P. galbana*, *P. kermesina* e *P. ligularis*; e em estípulas não foliáceas, como *P. coriacea*, *P. micropetala*, *P. suberosa*, *P. edulis* e *P. platyloba*, ocorrendo poucas camadas (1 a 3 camadas) adjacentes a epiderme, em toda circunferência da estípula (Figura 6F). Nas demais espécies não foram observadas células colenquimáticas.

Ainda no mesofilo é possível observar idioblastos contendo compostos fenólicos, confirmado por meio do teste com cloreto férrico e, ainda, idioblastos contendo drusas (Figuras 6A e 6E, 7A, 7C e 7D). Em algumas espécies há apenas idioblastos com compostos fenólicos (*P. contracta* e *P. incarnata*), em outras há apenas idioblastos com drusas (*P. organensis*, *P. suberosa*, *P. eichleriana*, *P. edulis*, *P. galbana*, *P. kermesina*,

*P. ligularis* e *P. platyloba*), e há ainda aquelas que possuem os dois tipos de idioblastos (*P. deidamiodes*, *P. capsularis*, *P. coriacea*, *P. micropetala*, *P. coccinea* e *P. foetida*).



**Figura 7.** Secção transversal de estípulas de Passifloraceae. **A.** *Passiflora ligularis* (subgênero *Passiflora*, estípula foliácea), mesofilo homogêneo com amplos espaços intercelulares (Barra = 100 $\mu$ m); **B.** *P. alata* (subgênero *Passiflora*, estípula foliácea), mesofilo homogêneo com poucos espaços intercelulares e feixes vasculares colaterais (Barra = 200 $\mu$ m); **C.** *P. edulis*, células parenquimáticas isodiamétricas, tecido com poucos espaços intercelulares, idioblastos contendo drusas (seta branca), feixe único central colateral (Barra = 200 $\mu$ m); **D.** *P. capsularis* (subgênero *Decaloba*, estípula não foliácea), estômatos na face adaxial (\*), idioblastos contendo drusas (seta branca) e compostos fenólicos (seta negra) (Barra = 50 $\mu$ m). X = xilema e F = floema.

Em relação ao sistema vascular, as estípulas apresentam feixes vasculares do tipo colateral na maior parte das espécies (Figuras 6 e 7). Com exceção da estípula setácea de *P. incarnata*, que possui em sua porção distal um feixe central concêntrico do tipo anfigasal e na porção proximal feixes colaterais (Figura 8). Diferente do que se observa

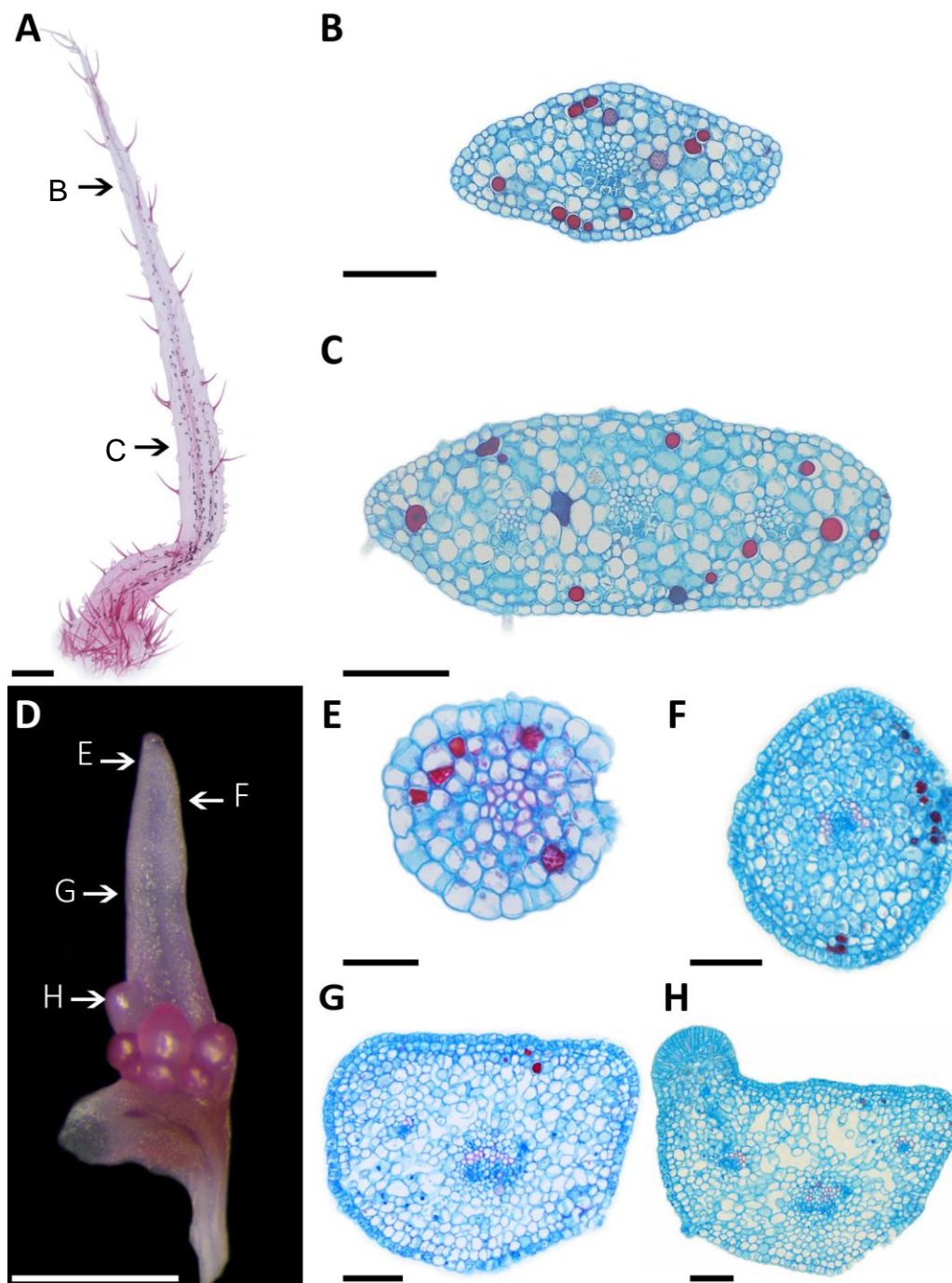
nas outras estípulas não foliáceas, também classificadas como setáceas, a exemplo de *P. capsularis* (Figura 8).

O mesofilo de *P. incarnata* chama bastante atenção por apresentar-se diferente em suas porções distal e proximal, mas não só o mesofilo, como também o feixe vascular central, que é do tipo concêntrico anfivasal na porção distal, e colateral na porção proximal. Na porção proximal, esta estípula se assemelha anatomicamente às demais, com uma simetria claramente dorsiventral, porém na porção distal ela assemelha-se muito às folhas unifaciais de monocotiledôneas, já descritas por Kaplan (1970) e Yamaguchi *et al.* (2010).

A anatomia de *P. incarnata* é, ainda, muito semelhante ao que foi verificado por McConnel & Barton (1998) na secção transversal da folha de um mutante de *Arabidopsis thaliana*, a qual possui uma nervura central do tipo anfivasal, enquanto o tipo selvagem possui um feixe central dorsiventral colateral. O que nos leva a inferir que os mecanismos moleculares para este resultado na estípula da espécie selvagem de *P. incarnata* sejam os mesmos que ocorreram no mutante de *A. thaliana*, resultando na perda da identidade adaxial-abaxial que possui a porção proximal e as demais estípulas de espécies de Passifloraceae.

Um outro caráter anatômico ainda relacionado ao sistema vascular que diferiu entre as espécies foi a presença de fibras pericíclicas apenas em *P. coriacea*, *P. alata*, *P. ligularis* e *P. racemosa* (Figura 6F e 6G). Nas demais espécies, o periciclo é parenquimático.





**Figura 8.** Comparação anatômica entre as estípulas de *Passiflora capsularis* e *P. incarnata*, classificadas morfologicamente como setáceas. **A.** Estípula diafanizada de *P. capsularis*, as setas indicam o nível em que foram realizadas as secções representadas nas imagens B e C (Barra = 400 $\mu$ m); **B.** Secção transversal da porção distal da estípula com feixe único colateral (Barra = 100 $\mu$ m); **C.** Secção da porção proximal com três feixes colaterais (Barra = 100 $\mu$ m); **D.** Estípula de *P. incarnata*, setas indicando os quatro pontos que foram realizadas as secções representadas nas imagens E, F, G e H (Barra = 500 $\mu$ m); **E.** Secção transversal da porção distal da estípula com feixe único concêntrico anivasal (Barra = 50 $\mu$ m); **F.** Secção transversal do terço médio da estípula com um único feixe central em estágio transitório, após esse ponto o feixe concêntrico se tornará dois feixes colaterais (Barra = 100 $\mu$ m); **G.** Secção transversal do terço médio com dois feixes

colaterais (Barra = 100 $\mu$ m); **H.** Secção transversal do terço proximal com três feixes colaterais, espaços intercelulares amplos e presença de estômatos (Barra = 100 $\mu$ m).

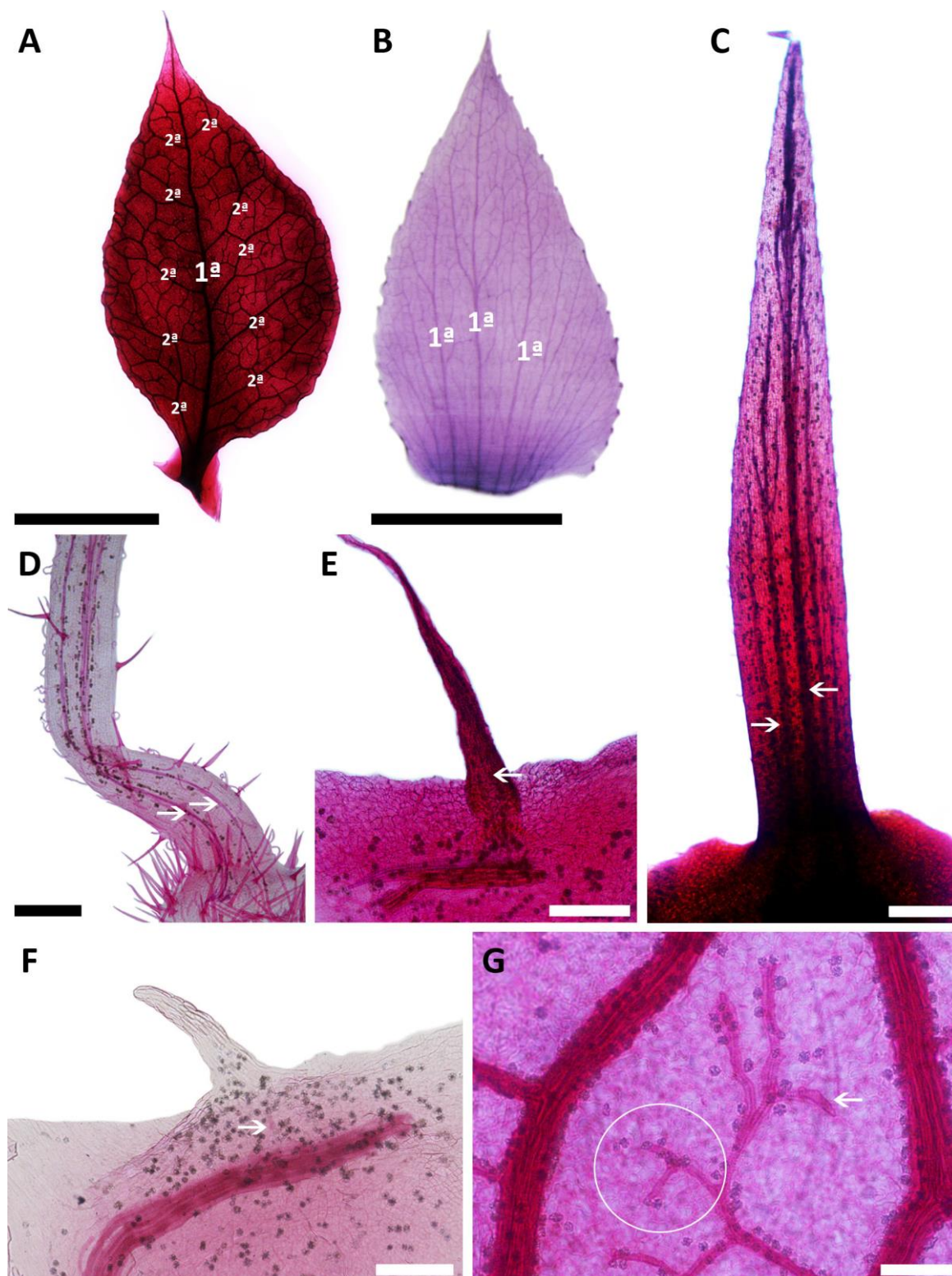
#### 4.2.3. Padrão de venação

Os padrões de vascularização pinada ou palmada foram observados nas estípulas que apresentam expansões laterais, ou seja, com simetria dorsiventral, tanto nas foliáceas como nas não foliáceas (Figura 9).

A venação do tipo pinada foi observada em grande parte das espécies foliáceas. Destas apenas *Passiflora alata* e *P. ligularis* possuem venação palmada, ou seja, feixes com calibres semelhantes partem da base, e seguem paralelamente todo o comprimento até atingir o terço distal da estípula. As estípulas não foliáceas lineares (*P. coriacea* e *P. suberosa*) também apresentam mais de uma nervura partindo da base, semelhante ao observado nas estípulas foliáceas com venação pinada (Figura 9C).

As estípulas setáceas podem apresentar mais de um feixe partindo da base e ramificando-se até o terço distal, como *P. capsularis*, ou apenas um feixe único, como observado em *P. organensis* e nas diminutas estípulas das espécies do subgênero *Deidamioides* (Figuras 9F).

Ambos os tipos, pinada e palmada, apresentam aréolas pouco desenvolvidas e as terminações livres podem ser idioblastos traqueoidais, ou traqueídes simples e idioblastos traqueoidais como em *P. racemosa* (Figura 9G).



**Figura 9.** Vascularização das estípulas diafanizadas em espécies de Passifloraceae. **A.** Estípula foliácea de *Passiflora racemosa* com venação pinada, em destaque a nervura principal/primária (1ª) e as secundárias (2ª) (Barra = 5mm); **B.** Estípula foliácea de *P. ligularis* com venação palmada, em destaque as três nervuras primárias (1ª), de calibre semelhante, partindo da base em direção ao terço apical da folha (Barra = 5mm); **C.** Nervura não foliácea de *P. suberosa* com mais de uma nervura partindo da base (setas) (Barra = 400µm); **D.** Estípula não foliácea de *P. capsularis*, com mais de uma nervura partindo da base (setas) (Barra = 400µm); **E.** Estípula de *P. organensis* com feixe único

(seta) (Barra = 200 $\mu$ m); **F.** Estípula de *P. deidamiodes* com feixe único (seta) (Barra = 200 $\mu$ m); **G.** Aréola da estípula de *P. racemosa*, em destaque as terminações livres em traqueídes simples (círculo) e idioblastos traqueoidais (seta)

Anatomicamente, as folhas de muitas espécies de Passifloraceae já foram bem registradas (Metcalf & Chalk 1979, López-Meruvia 1993a e 1993b, Jáuregui *et al.* 2002, Kurtz *et al.* 2002, Beraldo *et al.* 2008). Observamos que a estrutura anatômica das estípulas é muito semelhante à das folhas, possuindo mesofilo homogêneo e algumas vezes heterogêneo, feixes vasculares frequentemente dorsiventrais colaterais, organizados em um padrão de venação algumas vezes pinada, outras vezes palmada, como já observado em folhas lobadas (Ulmer & MacDougal 2004, Brasileiro 2014).

### **4.3. Desenvolvimento das estípulas**

Como descrito acima, as estípulas das espécies estudadas apresentam distintos padrões morfológicos na maturidade. No entanto, o início do desenvolvimento é comum a todas, podendo ser visualizado a partir do segundo plastocrono, logo após a iniciação foliar e antes do surgimento dos lobos foliares, no caso das folhas lobadas, ou dos folíolos, no caso das folhas compostas, que acontece frequentemente no terceiro plastocrono (Figura 10). Em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da região do meristema apical caulinar, observamos a fase de iniciação das estípulas por meio de duas protuberâncias laterais ao primórdio foliar, correspondentes aos primórdios das estípulas (Figura 10A).

Nas secções transversais do ápice caulinar vegetativo, os primórdios de estípula no segundo plastocrono apresentam células meristemáticas em diversos planos de divisão, circundadas pela protoderme que se dividem no plano anticlinal dando volume ao primórdio. No terceiro plastocrono, observamos que as células da face abaxial passam por um processo de expansão e de divisão mais acentuado, enquanto que as células da

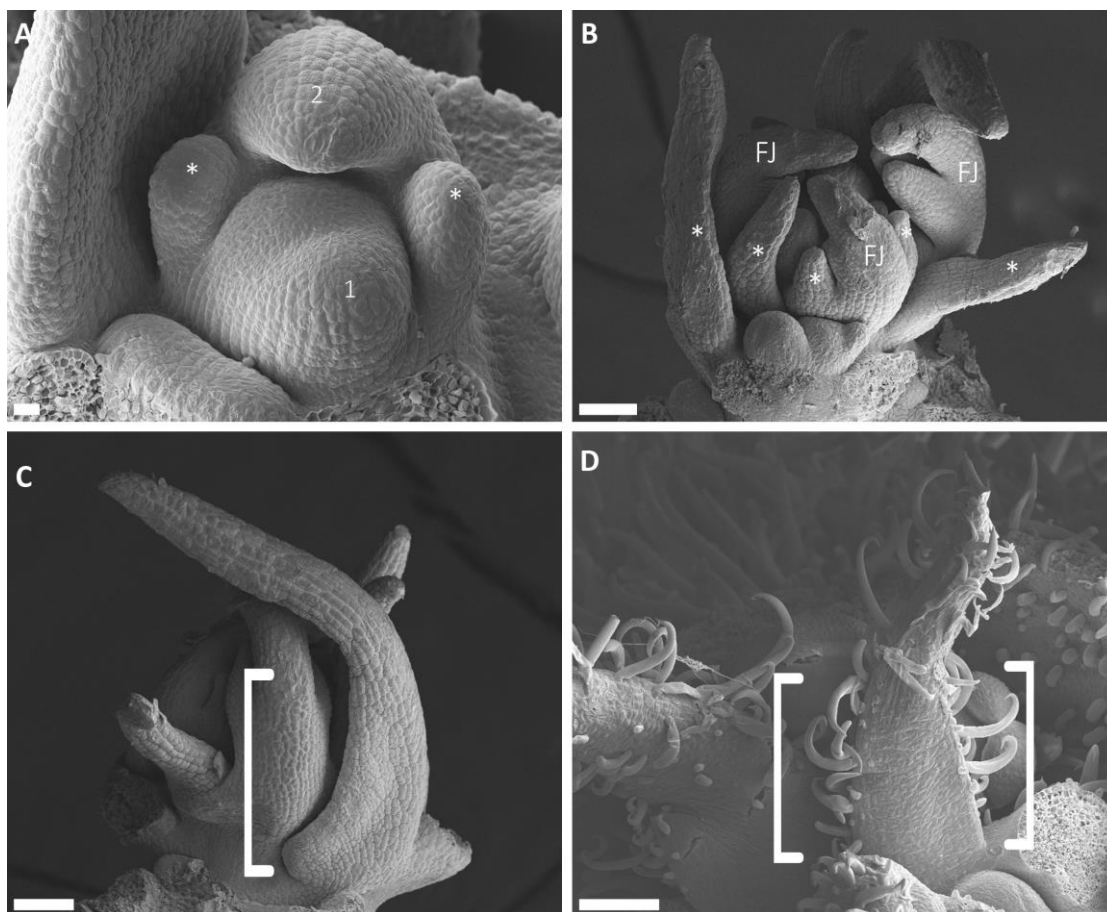
face adaxial estão em divisão, resultando em crescimento no sentido adaxial-abaxial, no qual a estrutura assumi uma forma convexa abaxialmente, com a face adaxial ligeiramente plana (Figura 11A).

Por volta do quarto ou quinto plastocrono, os primórdios de estípulas encontram-se alongados em seu eixo próximo-distal (Figura 10B). Nesse estágio, em secções transversais do meristema apical caulinar, também é possível identificar a polaridade adaxial-abaxial estabelecida, por meio de características como intensa atividade meristemática no domínio adaxial, e células em estágio de expansão no domínio abaxial (Figura 11A).

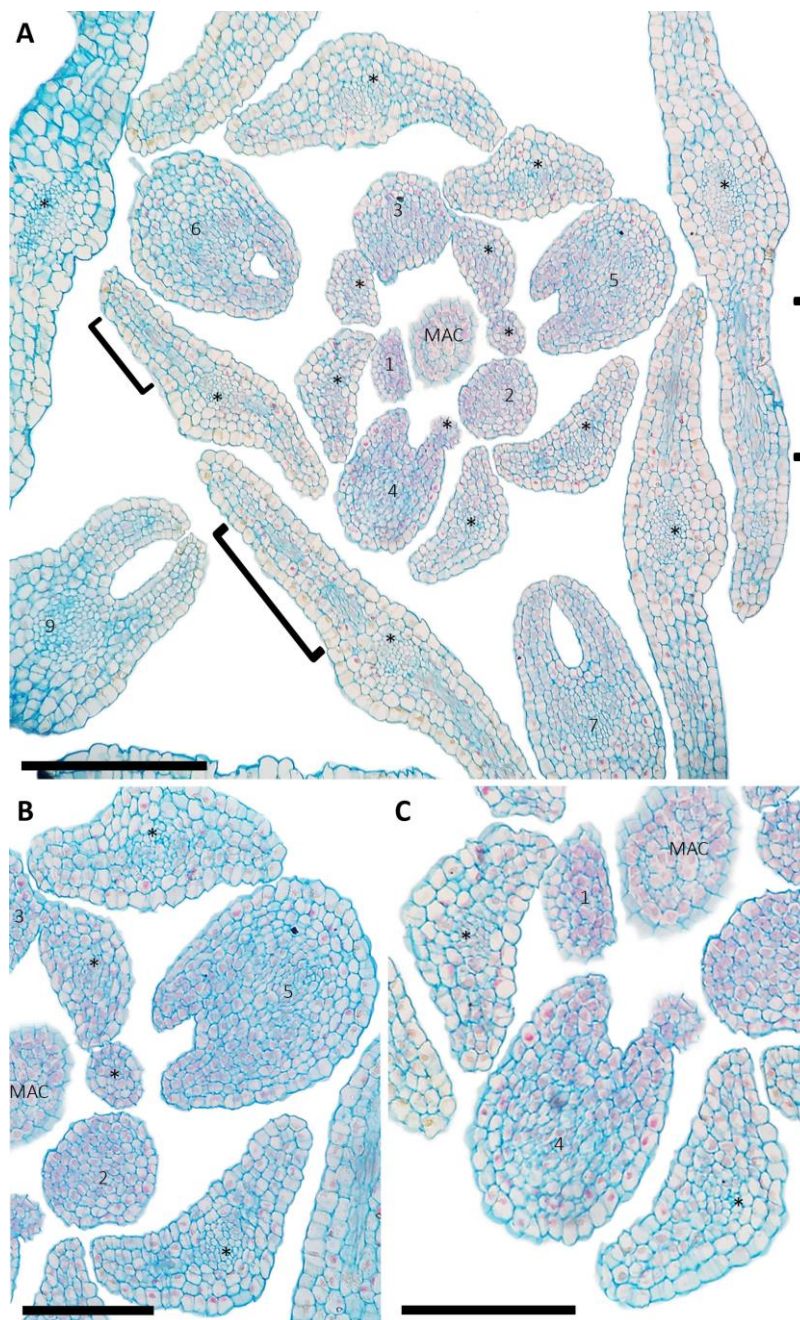
Nos próximos estágios, principalmente na morfogênese primária, é possível identificar a atividade meristemática diferenciada que resultará nos diferentes tipos estipulares. Abaixo são descritos os principais eventos durante o desenvolvimento dos diferentes tipos morfológicos de estípulas encontrados.

#### 4.3.1. Foliáceas simétricas (*Passiflora racemosa*)

Em secções transversais do ápice caulinar vegetativo, após o estabelecimento da identidade adaxial-abaxial, o primórdio de estípula de *P. racemosa* apresenta uma intensa atividade do meristema marginal em dois pontos opostos na base do eixo, que dão início ao desenvolvimento da lâmina (Figura 11). Contudo, essa atividade parece ser breve, pois a partir do quinto plastocrono é possível observar que o crescimento da lâmina da estípula é decorrente principalmente do meristema em placa e da expansão celular.



**Figura 10.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do ápice caulinar vegetativo de espécies de Passifloraceae com ênfase nas estípulas. **A.** *Passiflora ligularis*, fase de iniciação das estípulas (\*) que acontece no segundo plastocrono, primórdios foliares presentes enumerados em ordem crescente (1 e 2) (Barra = 20 $\mu$ m); **B.** *P. kermesina*, estípulas (\*) com o eixo principal alongado em diferentes fases (FJ = folha jovem, barra = 100 $\mu$ m). **C.** *P. kermesina*, em destaque o início da formação da lâmina unilateral, na base do eixo principal (Barra = 100 $\mu$ m); **D.** Estípula jovem de *P. morifolia* no sétimo plastocrono, em destaque o crescimento lateral ao eixo principal que ocorre inicialmente na porção basal de forma equivalente (Barra = 100 $\mu$ m).



**Figura 11.** Secções transversais do ápice caulinar vegetativo de *Passiflora racemosa* (subgênero *Passiflora*), estípula foliácea simétrica. **A.** Plastocronos enumerados em ordem crescente (1-7) a partir do meristema apical caulinar (MAC), primórdios foliares e folhas jovens acompanhadas de um par de primórdios de estípulas e estípulas jovens (\*). Nos plastocronos mais avançados, observa-se a atividade do meristema em placa (destaque) (Barra = 200 $\mu$ m); **B.** Primórdio foliar no segundo plastocrono (2) e uma de suas estípulas em atividade meristemática (Barra = 100 $\mu$ m); **C.** Destaque do primórdio foliar com um par de primórdios de estípulas (\*) no quarto plastocrono com células abaxiais em expansão (Barra = 100 $\mu$ m).

#### 4.3.2. Foliáceas assimétricas com expansão unilateral (*Passiflora morifolia*)

Esta é a única espécie do subgênero *Decaloba* analisada que, na maturidade, apresenta uma expansão laminar e unilateral, resultando em uma estípula falciforme.

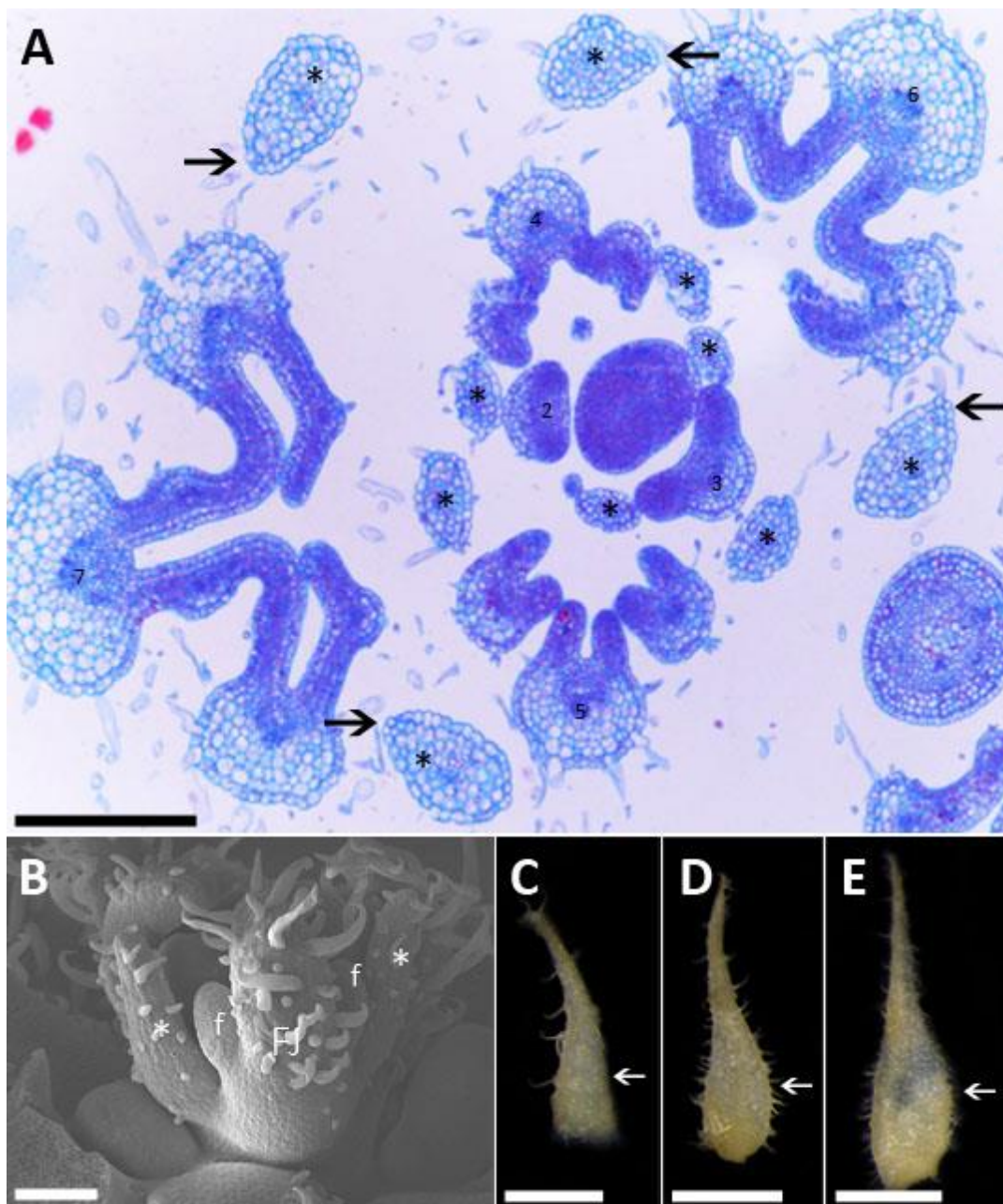
Nessa estípula, a expansão lateral, que tem início na base do eixo, se dá por volta do sétimo plastocrono (Figura 10D), e a partir do nono plastocrono apenas uma das margens continua a expandir, dando origem a lâmina da estípula (Figura 12). Em secções transversais da estípula jovem, observamos a atividade do meristema lateral em apenas um dos flancos (Figura 12A).

Até o décimo primeiro plastocrono a lâmina tem um crescimento próximo-distal mais evidente se comparado ao centro-lateral, e é possível observar seu comprimento maior que a folha jovem. No décimo terceiro plastocrono, a expansão laminar, que é unilateral, torna-se mais evidente (Figura 12C).

#### 4.3.3. Foliáceas assimétricas com expansão bilateral (*Passiflora caerulea*, *P. eichleriana* e *P. kermesina*)

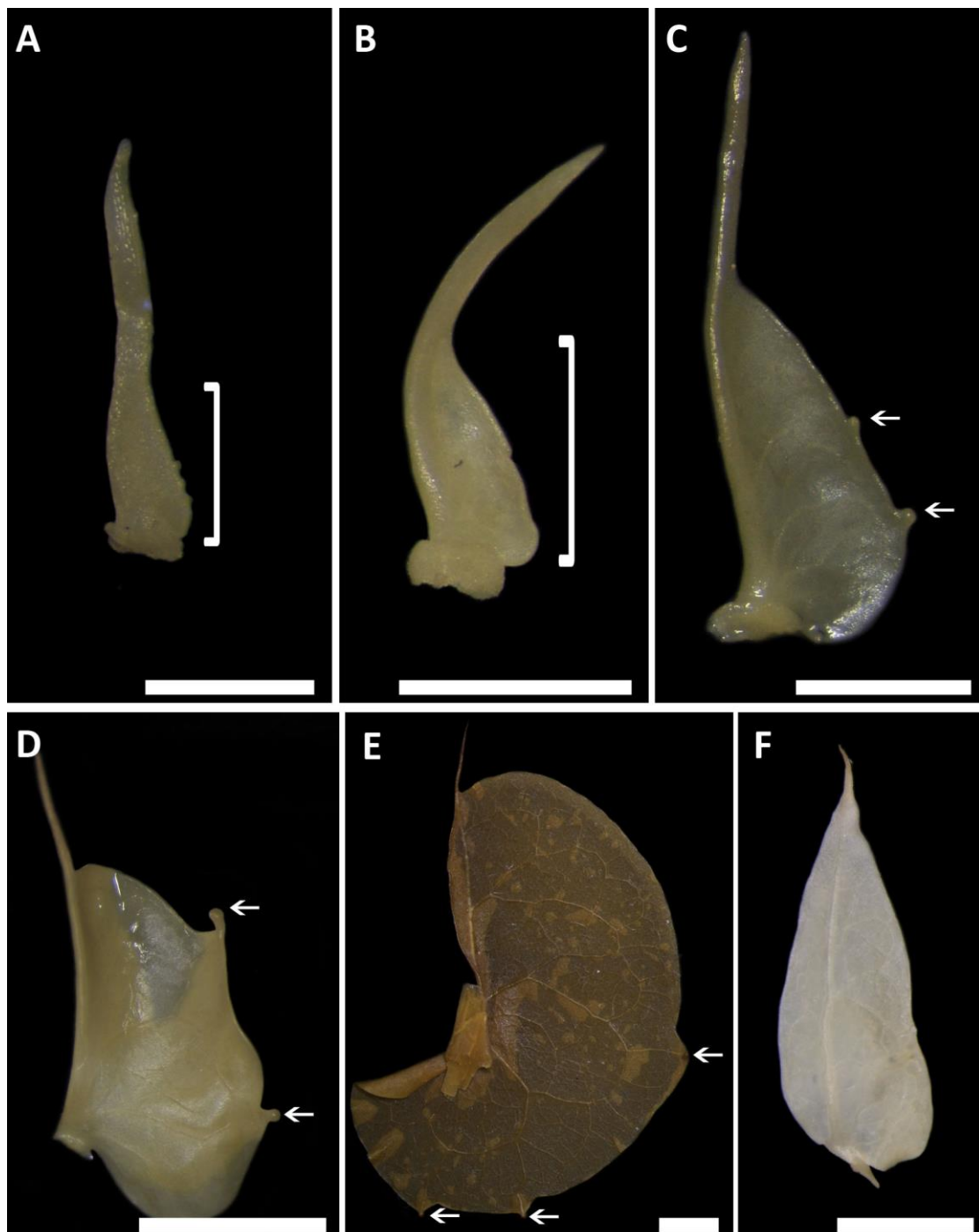
A atividade meristemática resulta na formação de estípulas subreniformes em *P. caerulea* e *P. eichleriana*, e estípulas reniformes em *P. kermesina*. A principal diferença entre estas é a ausência de glândulas marginais (Figuras 3F – 3H) e a distinta atividade do meristema marginal em *P. eichleriana*.





**Figura 12.** Estágios de desenvolvimento da estípula foliácea de *Passiflora morifolia* (subgênero *Decaloba*). **A.** Secções transversais do ápice caulinar vegetativo de *P. morifolia*, plastocronos enumerados em ordem crescente (1-7), primórdios foliares acompanhados de um par de primórdios de estípulas e estípulas jovens (\*), em destaque ponto da estípula que ocorre o crescimento da lâmina (seta) (Barra = 200 $\mu$ m); **B.** MEV da folha jovem (FJ) de *P. morifolia* (f = folíolos laterais), e suas estípulas (\*) no quarto plastocrono (Barra = 100 $\mu$ m); **C, D e E.** Estípulas jovens de *P. morifolia*, material fotografado em estereomicroscópio; **C.** Nono plastocrono, seta indicando o ponto no qual ocorre o crescimento da lâmina (Barra = 500 $\mu$ m); **D.** Décimo quarto plastocrono, seta indicando a lâmina em crescimento (Barra = 1mm); **E.** Décimo sexto plastocrono, seta indicando a lâmina em crescimento (Barra = 1mm).

Nestas espécies a atividade inicial do meristema marginal é semelhante em ambos os flancos, visível entre o quarto ou quinto plastocrono (Figura 10C). Em *P. caerulea* e *P. kermesina*, o meristema marginal permanece ativo por um maior período, e dá origem a porção da lâmina que se expande. Enquanto isso, no flanco oposto essa atividade cessa e retorna após a quase completa expansão da porção laminar oposta. Essa porção da lâmina não possui glândulas e é inconspícua, algumas vezes imperceptível (Figura 13E).



**Figura 13.** Estípulas foliáceas de *Passiflora kermesina* (A-E) evidenciando a formação da lâmina (crescimento lateral), acompanhado do crescimento próximo-distal e *P. eichleriana* (F) para comparação. **A.** Oitavo plastocrono, lâmina inicialmente se desenvolve na base do eixo principal (destaque) (Barra = 1mm); **B.** Nono plastocrono, destaque para a lâmina em formação (Barra = 1mm); **C.** Décimo segundo plastocrono com glândulas marginais presentes (setas) (Barra = 1mm); **D.** Décimo terceiro plastocrono, lâmina em crescimento com as glândulas marginais desenvolvidas (seta) (Barra = 2mm); **E.** Estípula madura com glândulas marginais (seta) (Barra = 2mm); **F.** *P. eichleriana* no décimo quinto plastocrono com as duas porções laminares crescendo de forma assincrônica (Barra = 2mm).

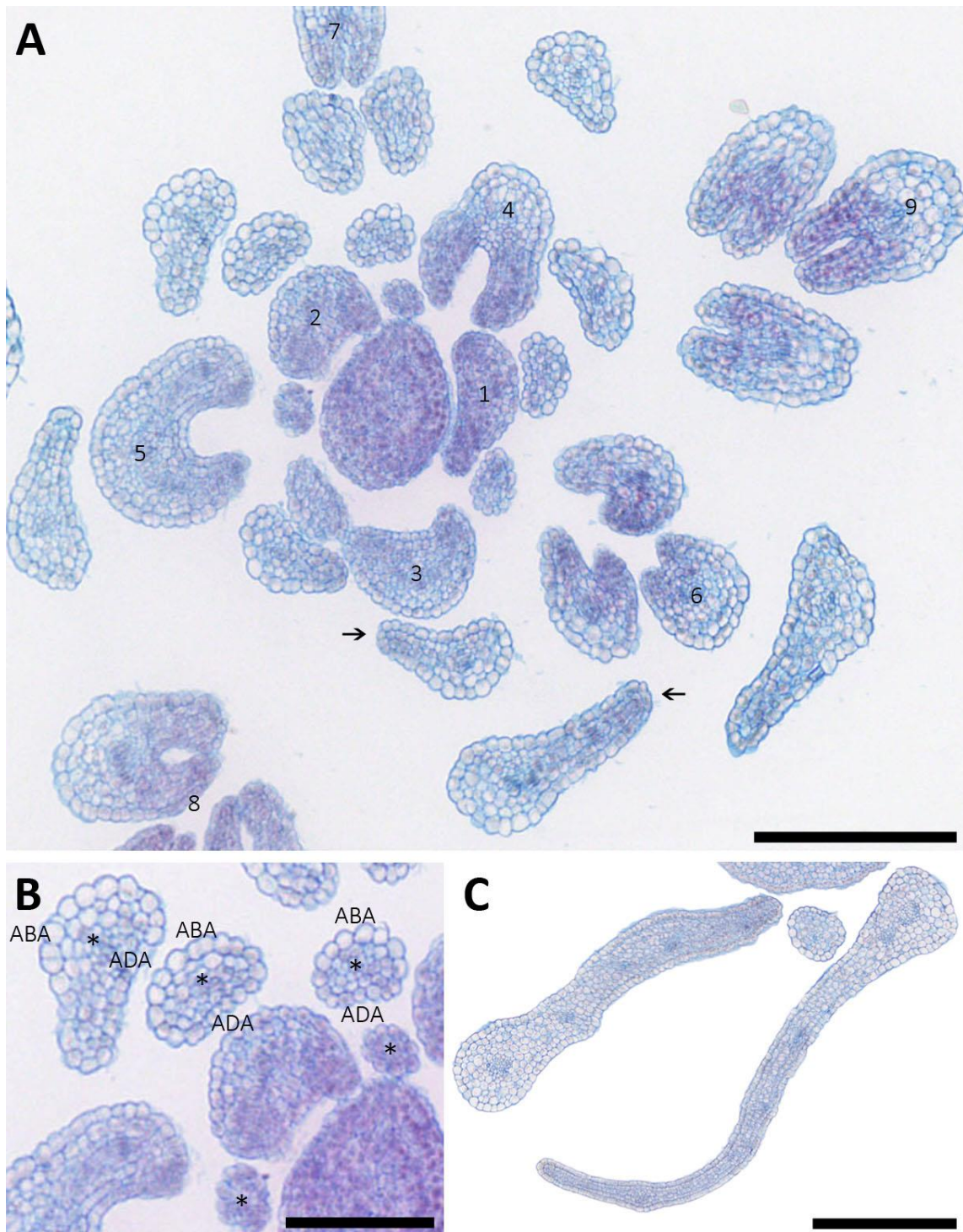
Em *P. eichleriana*, após o quinto plastocrono, enquanto uma porção laminar continua seu desenvolvimento de forma mais intensa, a outra porção tem um retardo. A partir daí ambas as porções laminares têm um crescimento contínuo, porém assincrônico, até a total expansão da estípula (Figura 13F).

Nas secções transversais do primórdio dessas estípulas (*P. caerulea*, *P. eichleriana* e *P. kermesina*), observamos uma intensa atividade do meristema em placa na lâmina em formação (Figura 14). Ao mesmo tempo, notamos células em intensa atividade mitótica na face adaxial e células em expansão na face abaxial da estípula (Figura 14B). Aparentemente, a atividade do meristema marginal é encerrada com o aparecimento das glândulas marginais, nas espécies que as possuem, a partir do oitavo ao décimo plastocrono (Figura 13A). A partir deste estágio, o crescimento da estípula é, em grande parte, devido a expansão celular.

#### 4.3.4. Não foliáceas com expansão unilateral (*Passiflora platyloba*)

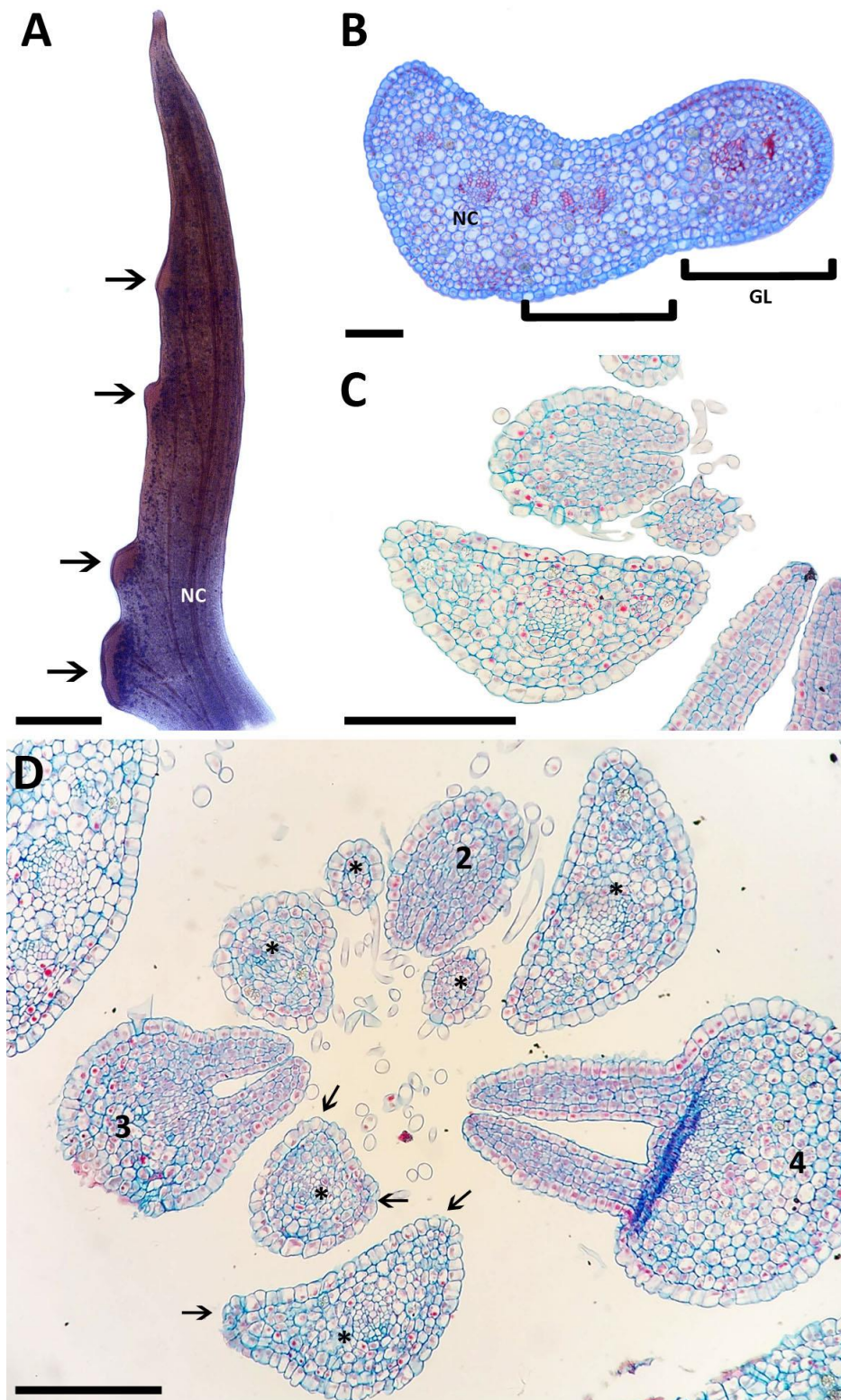
Apesar de não foliácea, a estípula apresenta na maturidade uma arquitetura dorsiventral, com uma discreta expansão unilateral (Figuras 15A e 15B).

A formação da lâmina no primórdio de estípula tem início com a atividade do meristema marginal que é equivalente em ambos os flancos, facilmente observado no quarto plastocrono (Figuras 15C e 15D). Contudo, essa atividade é efêmera em um dos flancos e é contínua no outro, resultando na expansão de apenas uma porção da lâmina.



**Figura 14.** Secções transversais do ápice caulinar vegetativo de *Passiflora kermesina*. **A.** Imagem evidenciando a organização do ápice caulinar, primórdios foliares enumerados em ordem crescente (1-9) de acordo com o plastocrono correspondente. Em destaque (seta) a região da estípula em que o meristema marginal está em atividade e dará origem a lâmina da estípula (Barra = 200 $\mu$ m); **B.** Destaque para as células da face adaxial (ADA) com vacúolos amplos, e células da face abaxial (ABA) ainda meristemáticas, nas estípulas (\*) do quarto, quinto e sétimo plastocronos (Barra = 100 $\mu$ m); **C.** Estípula com a lâmina em formação, atividade do meristema em placa (Barra = 200 $\mu$ m).

Neste lado em que há crescimento da lâmina, há também a formação das glândulas marginais após o desenvolvimento da lâmina (Figuras 15A e 15B).



**Figura 15.** Morfologia e anatomia da estípula não foliácea com expansão unilateral de *Passiflora platyloba* (subgênero *Passiflora*). **A.** Diafanização da estípula madura de *P. platyloba*, com breve expansão unilateral da lâmina e glândulas na margem (seta). A nervura central está representada pelas iniciais NC (Barra = 500 $\mu$ m); **B.** Secção

transversal da estípula madura, evidenciando a breve expansão da lâmina e a glândula marginal (GL), feixe vascular da nervura central representado por NC (Barra = 100 $\mu$ m); **C.** Secção transversal da estípula jovem (quarto plastocrono), apresentando simetria entre as margens laterais (Barra = 100 $\mu$ m); **D.** Secção transversal do ápice caulinar vegetativo, plastocronos enumerados em ordem crescente (2-4), primórdios foliares e folhas jovens acompanhadas de um par de primórdios de estípulas e estípulas jovens (\*). Região de crescimento marginal proporcional em ambos os flancos do primórdio de estípula no terceiro e no quarto plastocrono (seta) (Barra = 100 $\mu$ m).

#### 4.3.5. Não foliáceas com expansão bilateral (*Passiflora suberosa*)

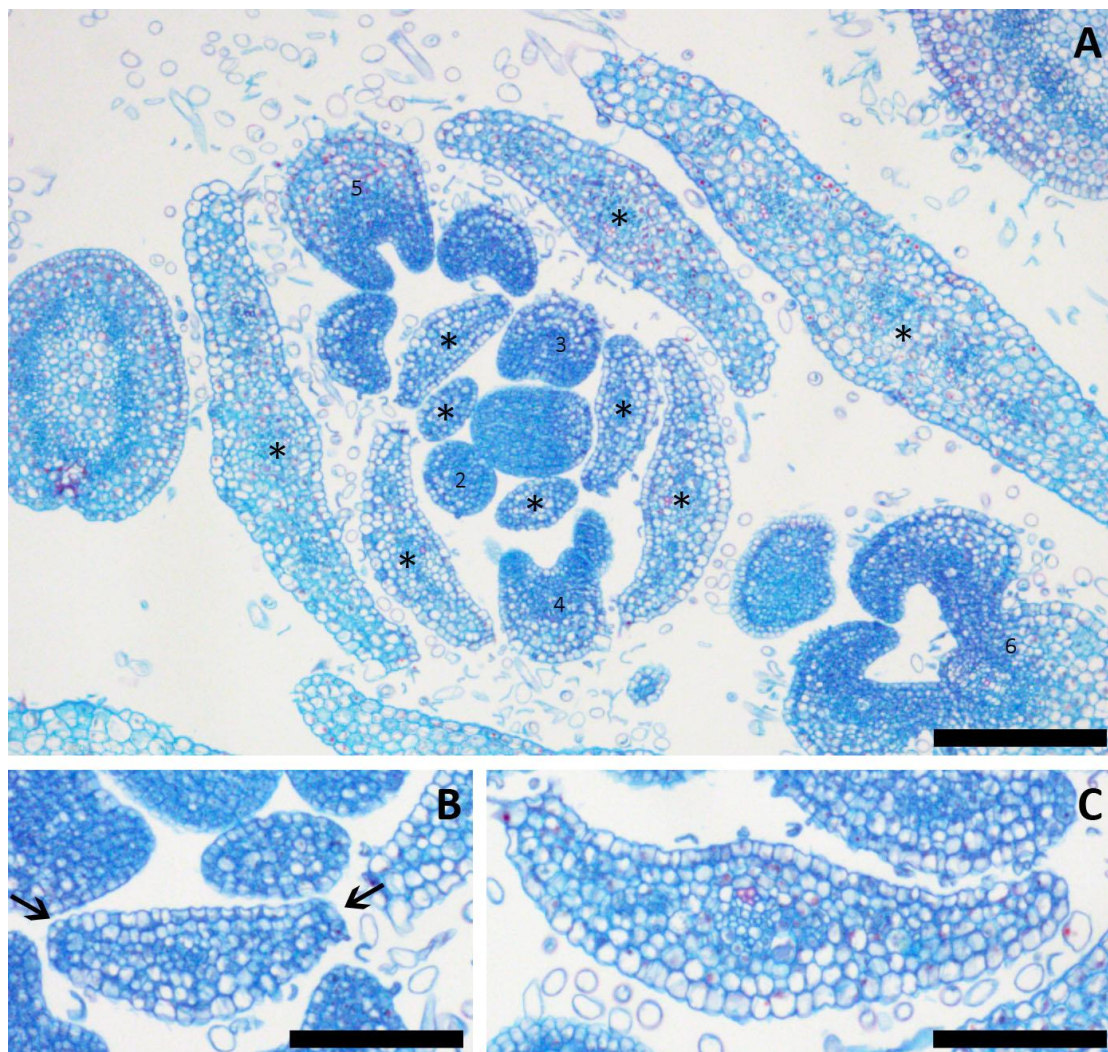
Em secção transversal do ápice caulinar vegetativo de *P. suberosa*, é possível observar uma região de crescimento nos dois flancos laterais ao primórdio de estípula no terceiro plastocrono (Figuras 16A e 16B). Esse tecido meristemático tem uma atividade breve e, a partir do quarto plastocrono, o crescimento da lâmina se dá pela atividade do meristema em placa e pela expansão celular, que já se torna bem evidente (Figura 16C).

#### 4.3.6. Não foliáceas com expansão lateral ausente (subgênero *Deidamioides*: e *Passiflora deidamioides*; subgênero *Decaloba*: *P. capsularis* e subgênero *Passiflora*: *P. coccinea* e *P. incarnata*)

Em *P. deidamioides*, os primórdios de estípulas tem sua morfogênese primária bastante breve se comparada com as demais. No terceiro plastocrono, logo após o estabelecimento da polaridade adaxial-abaxial, as células da face abaxial já se encontram em estágio de expansão e intensa divisão anticlinal aumentando o primórdio em volume (Figura 17B).

Aparentemente, não há atividade do meristema marginal, e por volta do sexto plastocrono a estípula atinge quase que sua total expansão (Figura 17B).

As estípulas de *P. capsularis* (subgênero *Decaloba*) são semelhantes as anteriores, mas possuem um comprimento maior no sentido próximo-distal (Figura 17C).



**Figura 16.** Desenvolvimento da estípula não foliácea com expansão bilateral de *Passiflora suberosa* (subgênero *Decaloba*). **A.** Secção transversal do ápice caulinar vegetativo, plastocronos enumerados em ordem crescente (2-6), primórdios foliares/folhas jovens acompanhadas de um par de primórdios de estípulas/estípulas jovens (\*) (Barra = 200 $\mu$ m); **B.** Secção transversal da estípula do terceiro plastocrono em detalhe, com atividade do meristema marginal (seta) e atividade meristemática em placa na região central do mesofilo (Barra = 100 $\mu$ m); **C.** Secção transversal da estípula do quarto plastocrono, atividade do meristema em placa na região central do mesofilo (Barra = 100 $\mu$ m).

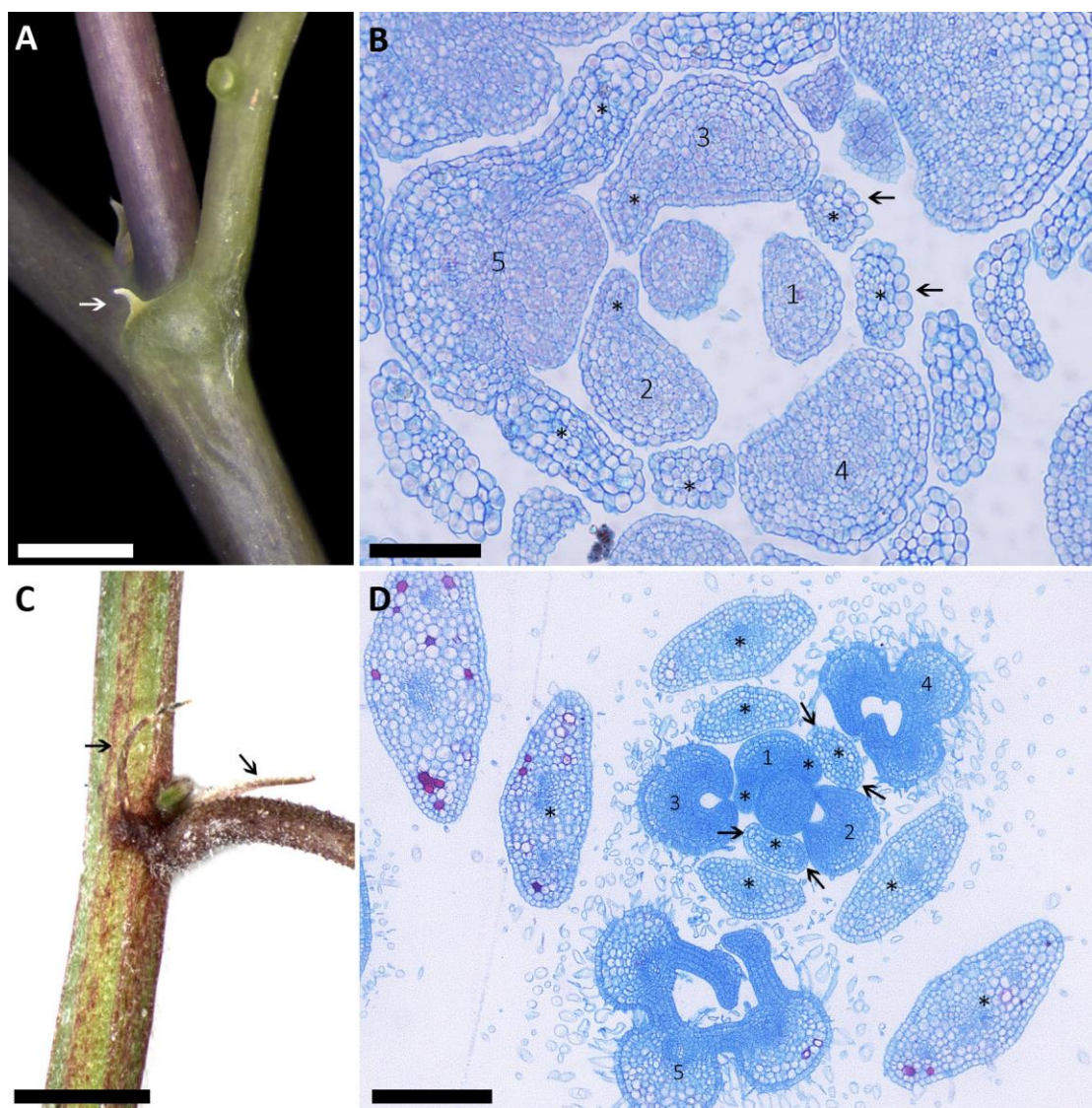
O estágio de iniciação da estípula de *P. capsularis* ocorre no primeiro plastocrono. No plastocrono seguinte, há uma região de crescimento marginal muito efêmera, visível em secção transversal, enquanto que as células da face abaxial estão em expansão dando volume ao primórdio (Figura 17D).

No subgênero *Passiflora*, as espécies *P. coccinea* e *P. incarnata*, ambas com morfologia setácea, apresentam um discreto desenvolvimento lateral. Ao analisarmos as secções seriadas do ápice caulinar de *P. coccinea*, foi registrado, após o padrão inicial de formação, uma breve região de crescimento marginal que é interrompida com o desenvolvimento das glândulas na margem da estípula, dando a este órgão um formato aproximadamente setáceo (Figura 18).

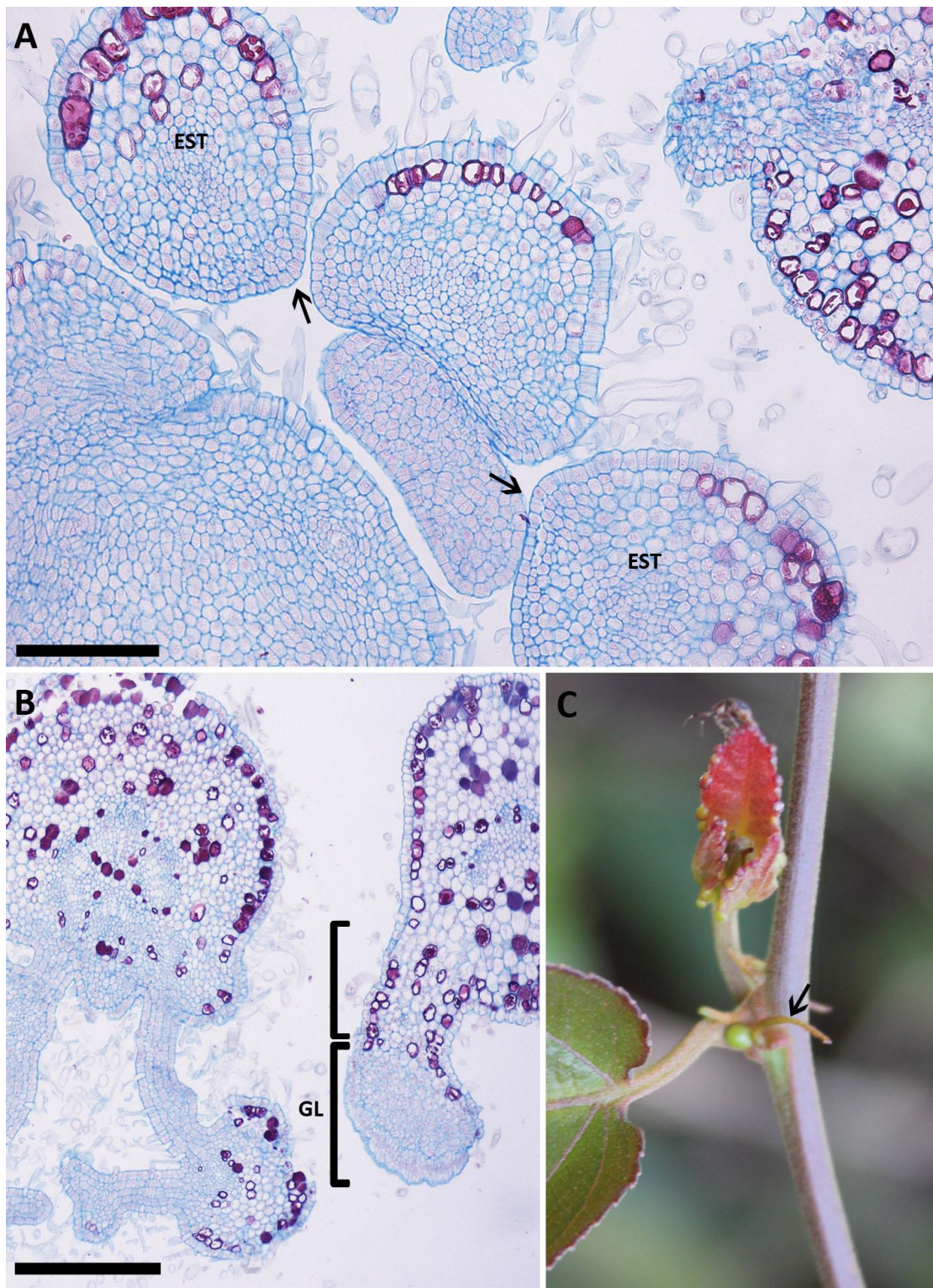
Nas secções transversais do ápice caulinar de *P. incarnata* (Figura 19), verificamos na porção proximal da estípula no quinto plastocrono, o estabelecimento da identidade adaxial-abaxial e o desenvolvimento das glândulas marginais, assim como em *P. coccinea* (Figura 19A).

No terço distal da mesma estípula, em secção transversal, observamos uma região meristemática central circundada por células parenquimáticas em estágio de expansão celular, e sobrejacentes à esta se encontra o tecido epidérmico (Figura 19B). Essa porção da estípula possui um contorno arredondado, e na maturidade apresenta um feixe central concêntrico anfivasal, um padrão diferente do que foi observado na porção proximal (Figura 8), semelhante a anatomia de uma lâmina foliar abaxializada que segundo Yamaguchi *et al.* (2010), lâmina foliar abaxializada é o resultado da ausência de uma blastozona marginal e intensa atividade da região de crescimento abaxial. Processo esse semelhante ao observado nas secções transversais do primórdio de estípula de *P. incarnata*, com a ausência da região de crescimento marginal na porção apical, sugerindo um possível processo de abaxialização durante a ontogênese da lâmina foliar, embora sua base da estípula mantenha a condição dorsiventral de uma estrutura polarizada.

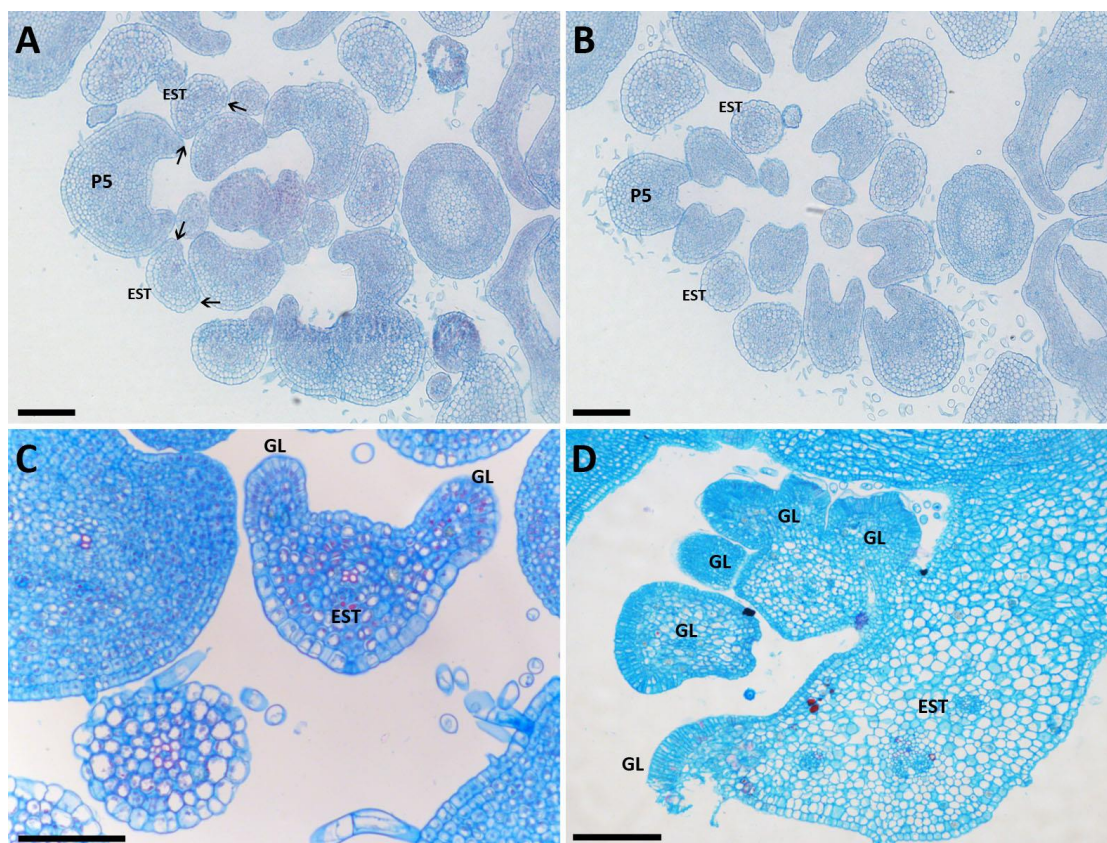




**Figura 17.** Estípulas não foliáceas de Passifloraceae com expansão lateral ausente. **A.** Estípula madura (seta) de *Passiflora deidamioides* (subgênero *Deidamioides*) (Barra = 1mm); **B.** Secções transversais do ápice caulinar vegetativo de *P. deidamioides* com os plastocronos enumerados em ordem crescente (1-5), primórdios foliares e folhas jovens acompanhadas de um par de primórdios de estípulas e estípulas jovens (\*). Nos primórdios de estípulas e estípulas jovens, nota-se a ausência da região de crescimento marginal. Nas estípulas do terceiro e quarto plastocronos as células da face abaxial estão em estágio de expansão (seta) (Barra = 100 $\mu$ m); **C.** Estípula madura (seta) de *P. capsularis* (subgênero *Decaloba*) (Barra = 2mm); **D.** Secções transversais do ápice caulinar vegetativo de *P. capsularis* com os plastocronos enumerados em ordem crescente (1-5), primórdios foliares e folhas jovens acompanhadas de um par de primórdios de estípulas e estípulas jovens (\*). Estágio de iniciação da estípula verificada no primeiro plastocrono e atividade efêmera do meristema marginal no segundo plastocrono (seta) (Barra = 200 $\mu$ m).



**Figura 18.** Estípula não foliácea de *Passiflora coccinea* (subgênero *Passiflora*); **A.** Secção transversal do ápice caulinar vegetativo, com ênfase no par de estímulas jovens (EST), região de crescimento marginal em apenas um flanco (seta) (Barra = 100 $\mu$ m); **B.** Porção da estípula na qual se desenvolve a glândula (GL), evidenciando uma discreta expansão lateral da estípula (Barra = 200 $\mu$ m); **C.** Estípula madura (seta), morfologia setácea.



**Figura 19.** Anatomia e desenvolvimento da estípula não foliácea de *Passiflora incarnata* (subgênero *Passiflora*). **A.** Secção transversal do ápice caulinar vegetativo, com ênfase nas estípulas (EST) do quinto plastocrono (P5), neste nível foi seccionada a base da estípula onde pode ser observada a região de crescimento marginal em ambos os flancos (seta) (Barra = 100 $\mu$ m); **B.** Secção transversal do ápice caulinar vegetativo com destaque para a secção do ápice da estípula (EST) no quinto plastocrono (P5) com atividade meristemática restrita a região central, e as células da periferia em expansão (Barra = 100 $\mu$ m); **C.** Secção transversal da estípula jovem (EST) com glândulas marginais (GL) (Barra = 100 $\mu$ m); **D.** Secção transversal da base da estípula (EST) com glândulas localizadas na margem e na base (GL) (Barra = 200 $\mu$ m).

O desenvolvimento das 11 estípulas de Passifloraceae aqui analisadas tem em comum o processo de iniciação, ocorrendo no segundo plastocrono, exceto em *Passiflora deidamioides* e, aparentemente, em *P.capsularis*, que ocorre no primeiro plastocrono. O processo de iniciação é muito semelhante ao verificado em folhas, como já mencionado por Esau (1960), Fahn (1989), Dengler & Tsukaya (2001) e Beck (2005), que consiste em uma protuberância produzida por divisões celulares com o envolvimento do meristema apical que é responsável pelo crescimento próximo distal.

Após a iniciação, com exceção de *P. deidamiodes*, as estípulas apresentam atividade do meristema marginal, seja prolongada ou breve. Segundo Esau (1960), a variação dessa região de crescimento nas folhas leva a formação de uma lâmina ampla, quando há atividade mais prolongada, ou pode formar uma folha terete, quando há atividade curta ou ausente.

Nas estípulas foliáceas, a atividade do meristema marginal parece mais prolongada, se comparada as não foliáceas, e é seguida da atividade do meristema em placa, dando continuidade ao crescimento da lâmina. Esses eventos são semelhantes ao processo de morfogênese primária já visto para as folhas (Esau 1960, Fahn 1989, Dengler & Tsukaya 2001, Beck 2005). As cinco espécies com estípula foliácea apresentaram padrões diferentes destas regiões de crescimento.

Em *P. racemosa*, a atividade do meristema marginal e do meristema em placa é muito semelhante em ambos os flancos, resultando em uma estípula foliácea simétrica. Diferentemente, em *P. eichleriana* (foliácea assimétrica) a atividade do meristema marginal parece ser mais breve em um dos flancos, e a atividade do meristema em placa nos dois flancos dá continuidade ao desenvolvimento de uma lâmina assimétrica, morfologia pré-estabelecida pelo meristema marginal.

O desenvolvimento das estípulas de *P. kermesina* e *P. eichleriana* são muito semelhantes, nelas a região de crescimento marginal parece ser silenciado por um longo período em um dos flancos, e contínuo no outro. Neste último, a lâmina é formada com o auxílio do meristema em placa. A formação da outra porção da lâmina, parte menor, inicia-se após a quase total expansão da primeira. Provavelmente, o meristema marginal retoma sua atividade, e deve ser seguida do meristema em placa.

Por fim, *P. morifolia* (foliácea assimétrica) parece apresentar uma interrupção da atividade do meristema marginal em um dos flancos, resultando no desenvolvimento de apenas uma porção da lâmina.

A simetria dorsiventral das estípulas não foliáceas é determinada por regiões de crescimento semelhantes às estípulas foliáceas. Na maior parte, existe a atividade do meristema marginal, mesmo que por um breve período de tempo, mas a atividade do meristema em placa pode estar muitas vezes ausente. Em *P. capsularis*, por exemplo, o meristema em placa está ausente, dessa forma após cessar a região de crescimento marginal a estípula cresce através de divisão e alongamento celular.

Em *P. platyloba*, a atividade do meristema marginal se encerra primeiramente em apenas um flanco, semelhante ao que acontece na estípula foliácea de *P. morifolia*, e permanece no flanco oposto. O desenvolvimento deve ser seguido de uma breve atividade do meristema em placa.

*Passiflora suberosa* é muito semelhante a estípula foliácea de *P. racemosa*, que, após a atividade do meristema marginal, equivalente nos dois flancos, há claramente a atividade do meristema em placa envolvido no desenvolvimento da estípula. Apesar da diferença na classificação (não foliácea e foliácea, respectivamente), elas possuem o processo de desenvolvimento muito semelhante.

#### **4.4. Reconstrução dos caracteres ancestrais**

##### **4.4.1. Caracteres morfológicos**

As árvores filogenéticas reproduzidas com o auxílio dos programas Mr. Bayes v. 3.2.6 e RAXMLgui, com as análises Bayesiana e de Máxima Verossimilhança (ML) estão disponíveis para apreciação na seção Anexos (Anexos III - VI). Os Subgêneros *Decaloba* e *Passiflora* configuram grupos irmãos, e ambos em conjunto são grupo irmão do subgênero *Deidamioides*, grupo externo que está representando por apenas uma espécie.

O monofiletismo dos subgêneros *Decaloba* e *Passiflora* foram confirmados por diversos estudos moleculares (Muschner *et al.* 2003, Hansen *et al.* 2006, Yotoko *et al.* 2011, Muschner *et al.* 2012, Krosnick 2013).

No atual estudo, foram descritos um total de dezessete caracteres morfoanatômicos das estípulas do conjunto de 20 espécies, em maior número espécies dos subgêneros *Decaloba* e *Passiflora* (Anexo I). Destes apenas sete caracteres são morfológicos e também foram aplicados para o conjunto de 46 espécies. Nas análises do caráter “forma da estípula” foram considerados nove estados de caráter retirados da literatura e da observação do material coletado quando possível (Anexo II).

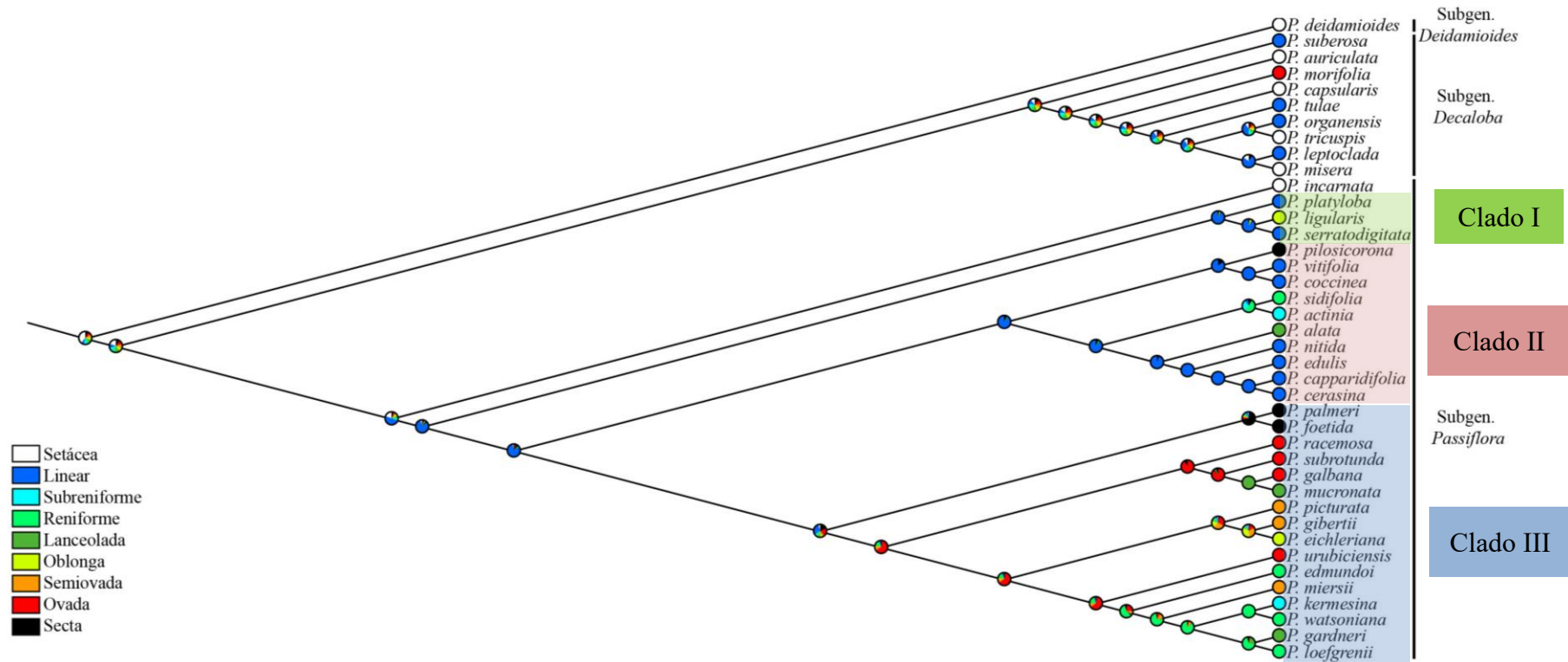
As análises indicam que o ancestral comum mais recente dos subgêneros *Deidamioides*, *Decaloba* e *Passiflora*, possuiu uma morfologia com menor complexidade, ou seja, não foliáceas, possivelmente sem expansão lateral, variando entre as formas setácea e linear (Figura 20).

Observamos que o ancestral comum mais recente dos subgêneros *Decaloba* e *Passiflora*, apresentou aproximadamente a mesma probabilidade de possuir os sete estados de caráter. Contudo, ao analisarmos o caráter foliáceo e não foliáceo, notamos que este ancestral, provavelmente, possuía uma estípula não foliácea, que inclui os tipos morfológicos setáceo, linear e sectado (Figura 21).

As espécies dos subgêneros *Astrophea* e *Deidamioides* (seção *Tryphostemmatoides*), que formam o grupo mais basal no gênero *Passiflora* (Krosnick *et al.* 2013), apresentam, frequentemente, morfologia não foliácea (Ulmer & MacDougal 2004), assim como espécies do gênero *Adenia* (Brasileiro 2014, Metcalfe & Chalk 1979), corroborando a provável plesiomorfia desse caráter.

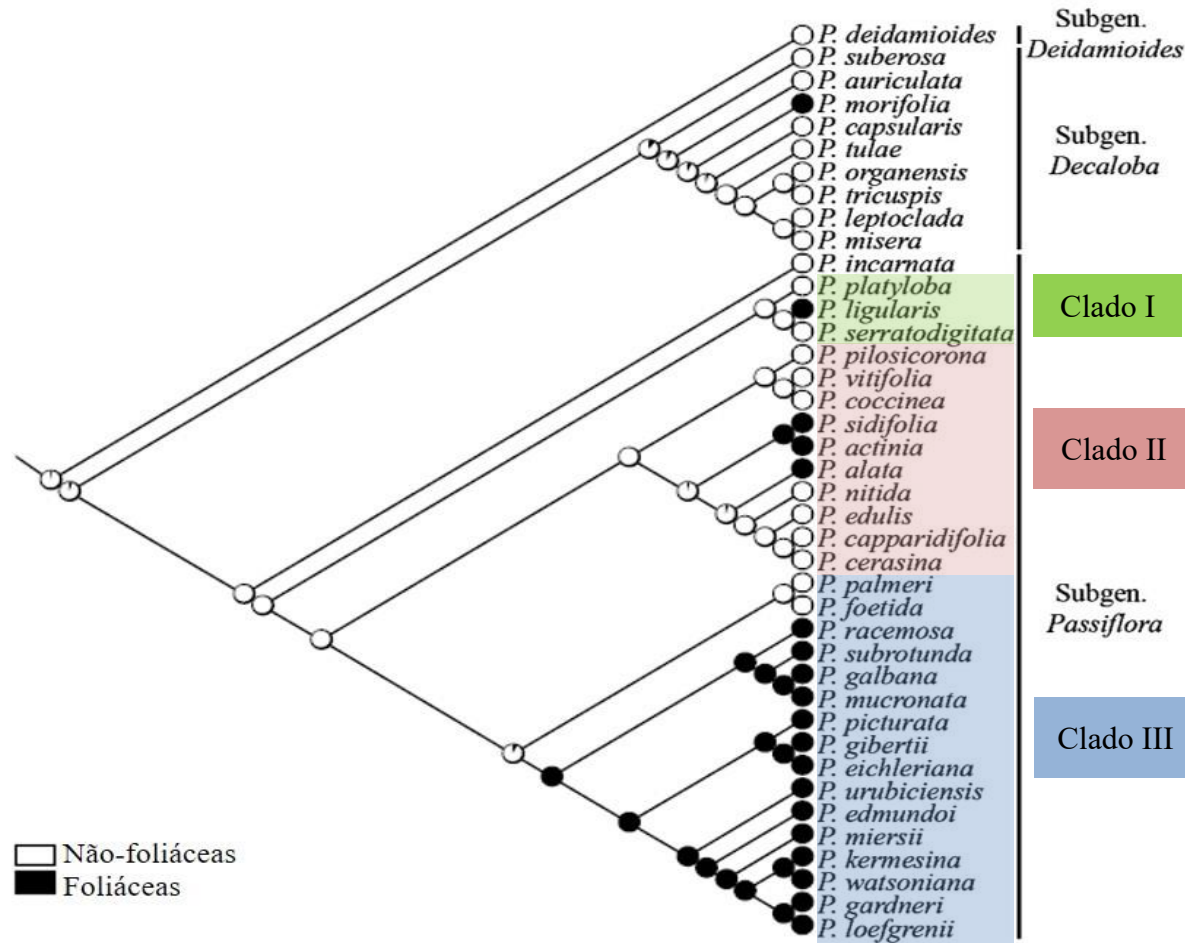
Quando analisamos apenas o subgênero *Passiflora* podemos observar três clados. Esses clados são facilmente distintos pela prevalência do tipo morfológico linear nos

Clados I e II, nos quais o ancestral comum mais recente provavelmente possuíram uma estípula com morfologia linear.



**Figura 20.** Análise de reconstrução de caracteres ancestrais a partir de dados morfológicos da estípula no gênero *Passiflora* realizada pelo método de Máxima Verossimilhança. Os discos nos nós indicam a probabilidade do estado de caráter do ancestral de cada clado. Cada estado do caráter “forma da estípula” está indicado em diferentes cores e representado na legenda. Em destaque os Clados I, II e II, ambos pertencentes ao subgênero *Passiflora*. Os Clados I e II com morfologia das espécies predominantemente linear, tendo cada clado ancestral comum mais recente com morfologia provavelmente linear. No Clado III, as espécies *Passiflora palmeri* e *P. foetida* tem provável ancestral comum mais recente com morfologia incerta.





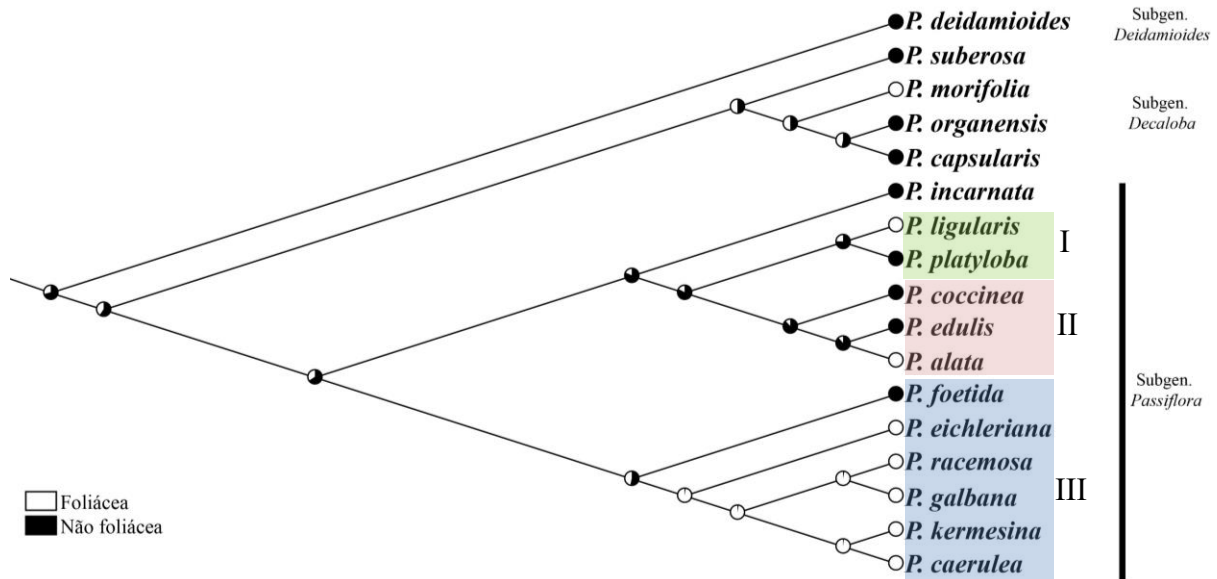
**Figura 21.** Análise de reconstrução de caracteres ancestrais a partir de dados morfológicos da estípula no gênero *Passiflora* realizada pelo método de Máxima Verossimilhança. Os discos nos nós indicam a probabilidade do estado de caráter do ancestral de cada clado. O estado de caráter “forma foliácea” está indicado em branco, e o preto indica o estado de caráter não foliáceo. Em destaque os Clados I, II e II, ambos pertencentes ao subgênero *Passiflora*. Clados I e II com morfologia das espécies predominantemente não foliácea, ancestral comum mais recente com morfologia provavelmente não foliácea. Já no Clado III, com morfologia das espécies predominantemente foliácea, provável ancestral comum mais recente com morfologia foliácea.

No Clado III, há uma grande diversidade morfológica, incluindo as formas subreniforme, reniforme, lanceolada, oblonga, semiovada e ovada. Porém, ao ponderarmos o caráter “foliáceo ou não foliáceo”, o ancestral comum mais recente possuiu uma morfologia foliácea, se considerarmos apenas o clado que exclui *P. foetida* e *P. palmeri* (Figura 21), e morfologia provavelmente ovada (Figura 20). Contudo, se considerarmos o clado formado por *P. kermesina*, *P. watsoniana*, *P. gardneri* e *P. loefgrenii*, observamos que trata-se de estípulas estritamente foliáceas, podendo ser considerado uma sinapomorfia para este grupo de espécies, e que o ancestral comum mais recente possuiu uma estípula foliácea, provavelmente, reniforme.

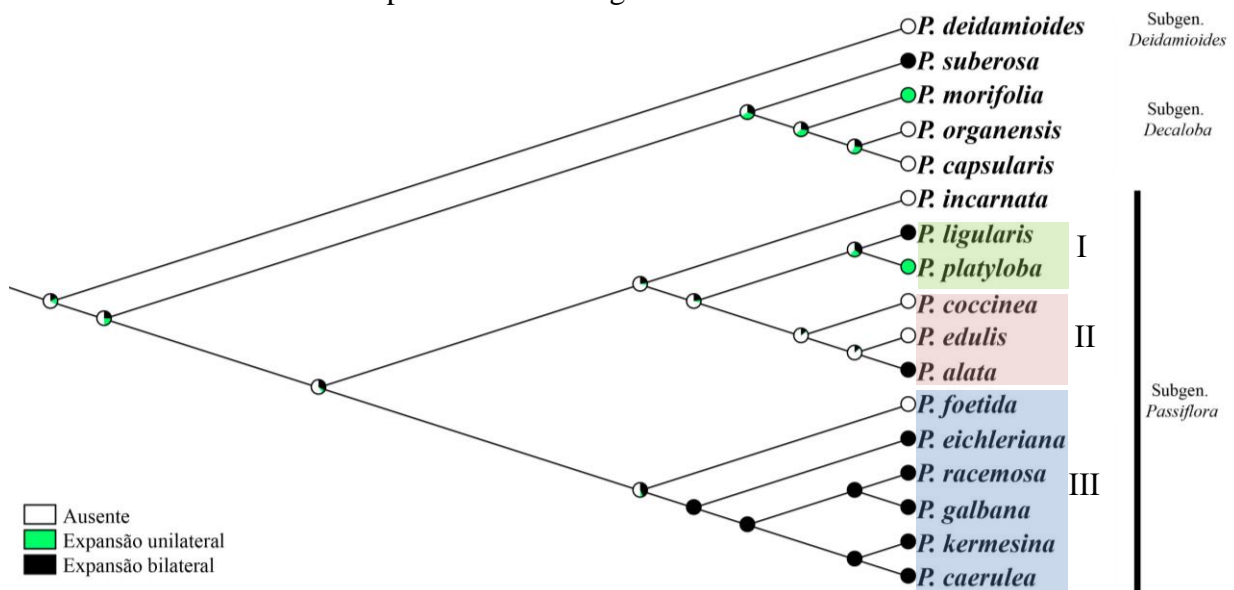
O estado de caráter foliáceo, quando analisado na árvore filogenética que contém apenas as dezessete espécies, parece ser homoplástico, surgindo quatro vezes nesse grupo (Figura 22). As espécies do Clado III, que inclui *P. eichleriana*, *P. racemosa*, *P. galbana*, *P. kermesina* e *P. caerulea*, apresentam o estado de caráter foliáceo, representando uma provável sinapomorfia.

Analisando o estado de caráter “expansão lateral da lâmina da estípula” (Figura 23), observamos que as espécies do Clado III apresentam expansão da lâmina da estípula bilateralmente, sendo provavelmente uma sinapomorfia para este grupo.

A “expansão unilateral” emergiu duas vezes dentro do subgênero *Passiflora*, além do clado III e, emergiu mais uma vez dentro do subgênero *Decaloba*, sendo possivelmente um caráter homoplástico.



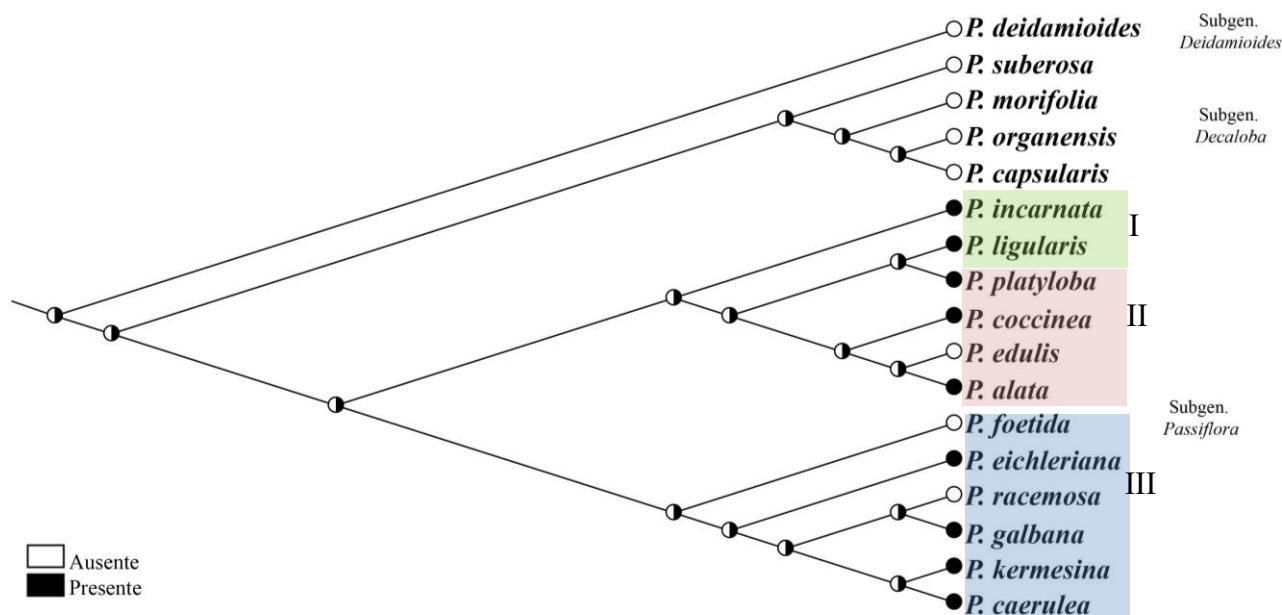
**Figura 22.** Análise de reconstrução de caracteres ancestrais a partir de dados morfológicos da estípula no gênero *Passiflora* realizada pelo método de Máxima Verossimilhança. Os discos nos nós indicam a probabilidade do estado de caráter do ancestral de cada clado. Em branco está representado o estado de caráter estípula foliácea. Em preto está representado o estado de caráter estípula não foliácea. Em destaque os três Clados I, II e III, pertencentes ao subgênero *Passiflora*. No Clado II com estípulas predominantemente não foliáceas, ancestral comum mais recente provavelmente não foliácea. No Clado III, espécies com estípulas predominantemente foliáceas, ancestral comum mais recente com provável morfologia foliácea.



**Figura 23.** Análise de reconstrução de caracteres ancestrais a partir de dados morfológicos da estípula no gênero *Passiflora* realizada pelo método de Máxima Verossimilhança. Os discos nos nós indicam a probabilidade do estado de caráter do ancestral de cada clado. Em branco está representado o estado de caráter expansão da lâmina da estípula ausente. Em verde está representado o estado de caráter expansão da estípula unilateralmente. Em preto está representado o estado de caráter expansão da estípula bilateralmente.

O ancestral comum mais recente do subgênero *Passiflora* provavelmente possuiu uma estípula não foliácea, como demonstrado em ambas reconstruções realizadas com esse caráter. Nos clados I e II estado de caráter foliáceo emergiu algumas vezes, porém o ancestral comum mais recente de cada um desses grupos, provavelmente possuiu uma estípula não foliácea. Dentro desses grupos de espécies, as estípulas foliáceas emergiram duas vezes, porém a morfologia destas estípulas (*P. alata*, lanceolada e *P. ligularis*, ovada) são muito semelhantes, com expansão lateral simétrica, venação palmada e glândulas marginais.

O caráter “ausência ou presença de glândulas nectaríferas extraflorais” só puderam ser analisadas no conjunto de dezessete espécies, e foi verificado que estão presentes apenas em espécies do subgênero *Passiflora*, representando uma possível sinapomorfia (Figura 24). De acordo com a análise, o ancestral comum dos três subgêneros, possui chances iguais de ter ou não nectários extraflorais nas estípulas, assim como o ancestral comum mais recente dos subgêneros.



**Figura 24.** Análise de reconstrução de caracteres ancestrais a partir de dados morfológicos da estípula no gênero *Passiflora* realizada pelo método de Máxima Verossimilhança. Os discos nos nós indicam a probabilidade do estado de caráter do ancestral de cada clado (I, II e III). Em branco está representado a ausência de nectários

extraflorais nas estípulas e em preto está representado a presença dos nectários extraflorais nas estípulas.

O caráter “glândula marginal foliar” dentro do gênero *Passiflora* é, de acordo com Cusset (1970), uma condição ancestral, e, possivelmente, homologa à denteações glandulares da folha, pois assumem a mesma topologia. Ulmer & MacDougal (2004) admitem que essa homologia é clara nas folhas, e que as glândulas do pecíolo são também, provavelmente, modificadas e derivadas dessa mesma denteação. Dessa forma, entende-se que as glândulas marginais das estípulas devem apresentar essa mesma origem.

Porém, diferente do que Cusset (1970) disse para as folhas, o estado de caráter “glândula marginal” nas estípulas parece ser uma condição mais derivada, enquanto a ausência apresenta-se como uma condição ancestral, pois está ausente nos subgêneros *Decaloba* e *Deidamioides*.

O clado com as espécies *P. foetida* e *P. palmeri*, se mostraram sempre distintos das demais espécies do clado III. Essas espécies pertencem a seção *Dysosmia* (subgênero *Passiflora*) (Ulmer & MacDougal 2004), grupo caracterizado por apresentar estípulas fendidas (sectadas) e glandulares; brácteas glandulares pinatsectadas; e folhas com epiderme glandular ou tricomas glândulas na superfície abaxial (Svoboda & Ballard Jr. 2018).

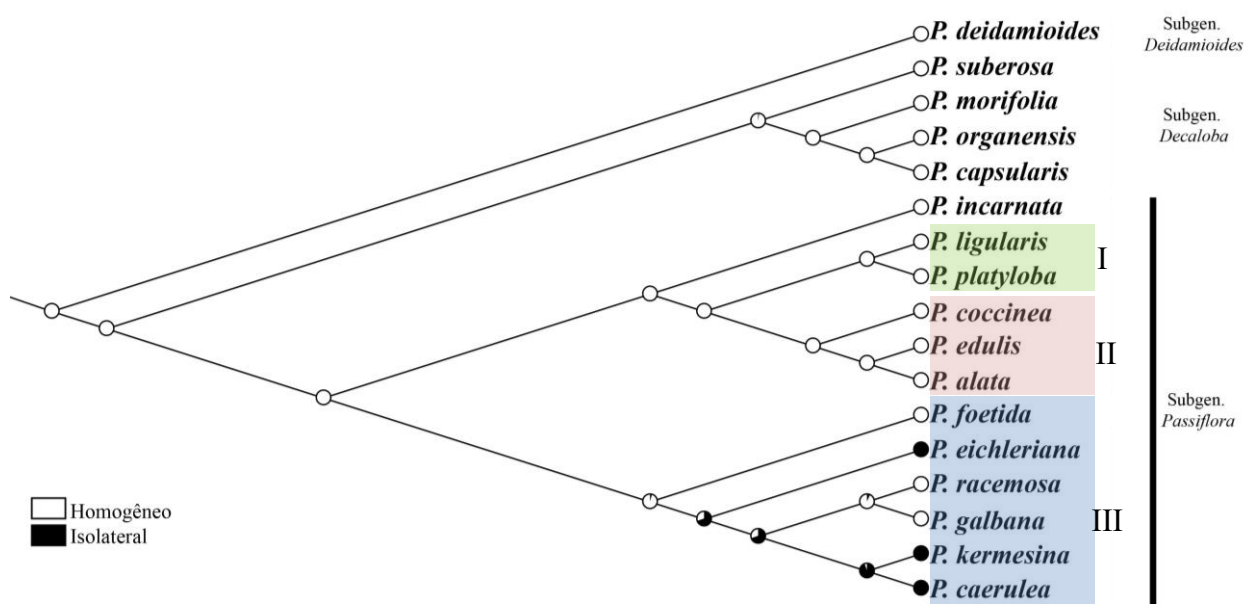
#### 4.4.2. Caracteres anatômicos

Dois caracteres apresentaram uma maior variação de estado entre as espécies do gênero: a “organização do mesofilo”, para o caso das foliáceas; e o “padrão de venação das estípulas”, para todo o grupo. O mesofilo dorsiventral demanda uma organização mais complexa, se comparado ao mesofilo homogêneo, e está presente apenas em espécies do subgênero *Passiflora*, em alguns terminais do Clado III, sendo possivelmente uma sinapomorfia, com reversão no clado formado por *Passiflora racemosa* e *P. galbana*

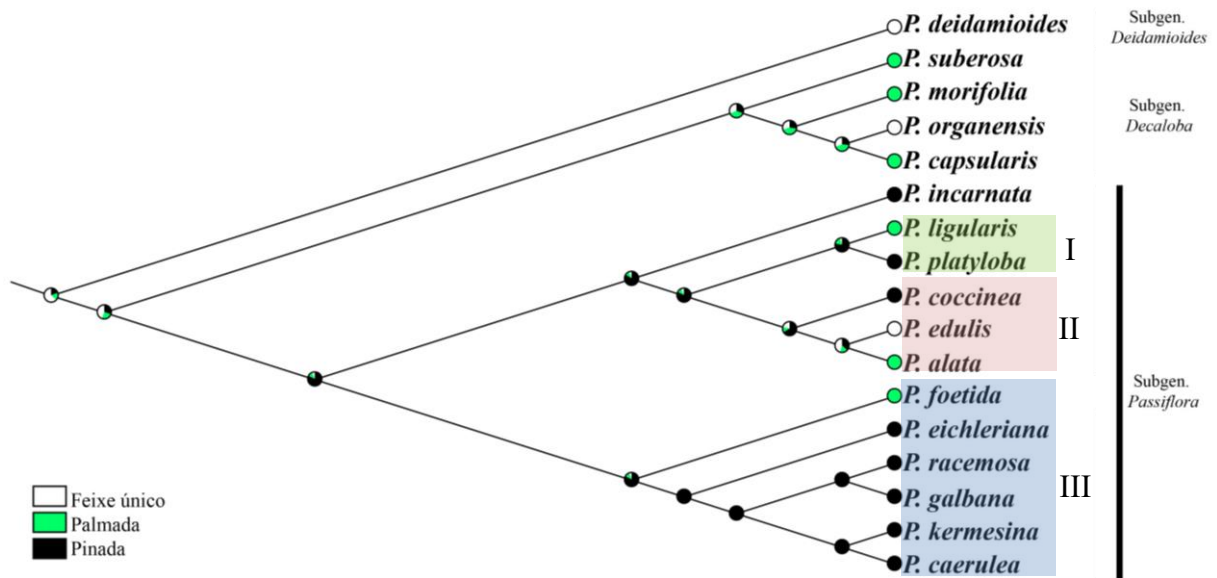
(Figura 25). O ancestral comum mais recente do clado que contém *P. eichleriana*, *P. racemosa*, *P. galbana*, *P. kermesina* e *P. caerulea*, provavelmente possuiu o mesofilo dorsiventral.

Nas estípulas o padrão de venação foi classificado em feixe único, pinado e palmado. O padrão pinado só foi verificado em espécies do subgênero *Passiflora*, presente em um grande número de espécies do Clado III, e, possivelmente, foi a condição presente no ancestral comum mais recente (Figura 26), com algumas reversões em *P. foetida*, *P. alata*, *P. edulis* e *P. ligularis*. Porém, o ancestral comum mais recente do subgênero *Passiflora* apresenta maior probabilidade de possuir estípulas pinadas.

O ancestral comum mais recente do clado que inclui os três subgêneros, provavelmente, possuiu uma estípula com uma organização vascular mais simples, em feixe único.



**Figura 25.** Análise de reconstrução de caracteres ancestrais a partir de dados anatômicos da estípula no gênero *Passiflora* realizada pelo método de Máxima Verossimilhança. Os discos nos nós indicam a probabilidade do estado de caráter do ancestral de cada clado (I, II e III). Em branco está representado o tipo de mesofilo homogêneo e em preto está representado o mesofilo do tipo dorsiventral.



**Figura 26.** Análise de reconstrução de caracteres ancestrais a partir de dados anatômicos da estípula no gênero *Passiflora* realizada pelo método de Máxima Verossimilhança. Os discos nos nós indicam a probabilidade do estado de caráter do ancestral de cada clado (I, II e III). Em branco está representado o padrão de venação em feixe único, em verde o padrão de palmada e em preto o padrão de venação pinado para as estípulas.

## V. Conclusões

---

1. Os caracteres morfológicos das estípulas em espécies de *Passiflora* têm um grande valor taxonômico, principalmente a nível subgenérico. Caracteres, como o tipo foliáceo, a presença de nectários extraflorais e a expansão bilateral da lâmina da estípula nas espécies do subgênero *Passiflora*, distingui-o dos subgêneros *Astrophea*, *Decaloba* e *Deidamioides*, que possuem estípulas não foliáceas e ausência de nectários extraflorais;
2. Os nectários extraflorais estipulares, que são muito frequentes no subgênero *Passiflora*, são pouco mencionados em trabalhos taxonômicos. A perda dessa informação é prejudicial do ponto de vista sistemático e taxonômico, e, provavelmente, se deve ao processo de preparo do material vegetal. Esse processo, conhecido como herborização, consiste na secagem das amostras, que impossibilita, muitas vezes, a visualização dessas estruturas. Por tanto, sugerimos que as estípulas sejam analisadas *in vivo* e/ou estocadas em fixador apropriado para uma melhor análise em laboratório;
3. As análises da anatomia das estípulas nos levaram a concluir que muitas das características encontradas são comuns na lâmina foliar de eudicotiledôneas mesófitas, como: a) uma epiderme com camada única de células, composta frequentemente por tricomas tectores e distribuição de estômatos em ambas ou apenas uma face; b) mesofilo homogêneo ou heterogêneo, no caso de muitas estípulas foliáceas; e c) feixes vasculares frequentemente colaterais, organizados em um padrão de venação algumas vezes pinada, outras vezes palmada;
4. *Passiflora incarnata*, possui uma estípula com morfologia setácea, mas com características particulares. Nestas, a porção distal é diferente da porção proximal.



Na porção distal, a estípula tem um contorno cilíndrico, na epiderme não há estômatos, o mesofilo possui pequenos espaços intercelulares e o sistema vascular está organizado em uma nervura única concêntrica do tipo anfivasal, sugerindo provável processo de abaxialização durante a formação da estípula. Na porção proximal, há nectários extraflorais na margem e na base da estípula, estômatos apenas na face abaxial, numa posição acima das demais células da epiderme, amplos espaços intercelulares no mesofilo, e os feixes vasculares são colaterais. O que nos leva a concluir que análises anatômicas ao longo do eixo próximo-distal das estípulas são de grande importância e podem revelar novos casos de feixes anfivais na região apical, além de possibilitar investigações sobre o provável processo de abaxialização durante o desenvolvimento molecular das estípulas.

5. Nas análises da ontogenia das estípulas, observamos que os processos são semelhantes aos que ocorrem no desenvolvimento de folhas. De um modo geral, a iniciação ocorre no segundo plastocrono devido a atividade do meristema apical, que é responsável pelo crescimento próximo distal. A formação da lâmina nas estípulas se dá pela atividade de uma região de crescimento marginal, seja prolongada ou breve, que é seguida, muitas vezes do meristema em placa, e a variação da atividade desses meristemas resulta nas diferentes formas estípulares. Em *Passiflora deidamioides*, não há atividade da região de crescimento marginal. A atividade meristemática nas estípulas resultou em seis distintos padrões morfológicos: a) estípulas foliáceas simétricas; b) estípulas foliáceas assimétricas com expansão unilateral; c) estípulas foliáceas assimétricas com expansão bilateral; d) estípulas não foliáceas com expansão da lâmina unilateralmente; e) estípulas não foliáceas com expansão da lâmina bilateralmente; e f) estípulas não foliáceas com expansão laminar ausente.

6. Na proposta filogenética de Yotoko *et al.* (2011), identificamos quatro grandes clados que são distintos morfoanatomicamente. Um clado composto pelas espécies do subgênero *Decaloba*, e três outros clados compostos por espécies do subgênero *Passiflora*. Sinapomorfias morfoanatômicas foram diagnósticas em alguns dos clados.
7. O Clado III apresentou um conjunto de caracteres morfoanatômicos compartilhados (sinapomorfias) quando analisados os estados de caráter: “forma foliácea”, “a expansão da lâmina da estípula bilateralmente”, “a presença de nectários extraflorais”, “a organização dorsiventral do mesofilo” e “a venação pinada”.

## VI. Resumo

---

As estípulas da família Passifloraceae são estruturas exuberantes que apresentam uma rica diversidade morfológica e, por tanto, um grande valor taxonômico. Dentro da família, essa diversidade é notável nos táxons pertencentes ao gênero *Passiflora* L. Neste gênero, as estípulas foliáceas são amplamente descritas entre as espécies do subgênero *Passiflora* e apresentam uma infinidade de morfologias. Nos subgêneros *Astrophea*, *Decaloba*, *Deidamioides* e *Tetrapathea* são muito comuns as estípulas inconspícuas, descritas de um modo geral como: diminutas, no caso do subgênero *Deidamioides*; triangulares ou setáceas nas espécies dos subgêneros *Astrophea* e *Tetrapathea*; e, frequentemente, setáceas ou lineares, no subgênero *Decaloba*. Em folhas, a diversidade morfológica é resultado da atividade de diferentes regiões de crescimento. Com isso, foi realizado um levantamento dos caracteres morfoanatômicos, identificando padrões morfológicos de espécies de três subgêneros de *Passiflora*. Seguido do estudo ontogenético das estípulas de cada um dos padrões, e posterior mapeamento dos caracteres morfológicos das estípulas a partir de uma filogenia atual. Inicialmente, foi realizado o tratamento anatômico convencional de vinte espécies do gênero *Passiflora*: seis do subgênero *Decaloba*, duas do subgênero *Deidamioides*, e doze espécies do subgênero *Passiflora*. As análises da anatomia das estípulas demonstram que sua estrutura é semelhante à lâmina foliar de eudicotiledôneas mesófitas, apresentando uma epiderme com camada única de células, composta frequentemente por tricomas tectores e distribuição de estômatos em ambas ou apenas uma face; mesofilo homogêneo ou heterogêneo; e feixes vasculares frequentemente colaterais, organizados em um padrão de venação pinada ou palmada. *Passiflora incarnata* L. apresenta a anatomia da estípula distinta das demais espécies em sua porção distal, na epiderme não há estômatos, o mesofilo possui pequenos espaços

intercelulares e o sistema vascular está organizado em uma nervura única concêntrica do tipo anfigasal, um provável processo de abaxialização. Nas análises morfológicas foram identificados dois grupos de estípulas: foliáceas e não foliáceas. A partir disso foram selecionadas onze espécies do total de 20, para o estudo ontogenético, e identificado seis padrões morfológicos: estípulas foliáceas simétricas, estípulas foliáceas assimétricas com expansão unilateral, estípulas foliáceas assimétricas com expansão bilateral, estípulas não foliáceas com expansão da lâmina unilateralmente, estípulas não foliáceas com expansão da lâmina bilateralmente, e estípulas não foliáceas com expansão laminar ausente. Na formação da lâmina das estípulas foliáceas foi identificada a atividade do meristema marginal e, frequentemente, do meristema em placa. No caso das estípulas foliáceas assimétricas, o meristema marginal é silenciado em um dos flancos, retomando sua atividade após o desenvolvimento da lâmina oposta, como em *P. caerulea* e *P. kermesina*; ou tem a atividade do meristema marginal deprimida em um dos flancos e contínuo no outro, como em *P. eichleriana*; ou tem a atividade encerrada em um dos flancos, como em *P. morifolia*. O meristema marginal está frequentemente envolvido na formação da lâmina, e é visível logo após o estabelecimento da polaridade adaxial-abaxial. Nas estípulas não foliáceas, o meristema marginal tem uma atividade efêmera, e em *P. deidamioides* Harms é ausente. Assim como as estípulas foliáceas, as não foliáceas apresentam a atividade do meristema marginal, frequentemente efêmera. A partir dos caracteres morfológicos, foram estabelecidas sinapomorfias no subgênero *Passiflora*, clado com as espécies *P. eichleriana*, *P. racemosa*, *P. galbana*, *P. kermesina* e *P. caerulea*; como estípulas foliáceas, expansão da lâmina da estípula bilateralmente, nectários extraflorais presentes, organização isolateral do mesofilo e venação pinada.

## VII. *Abstract*

---

The stipules of the Passifloraceae family are exuberant structures that present a rich morphological diversity and, therefore, a great taxonomic value. Within the family, this diversity is notable in the taxa belonging to the genus *Passiflora* L. In this genus, foliaceous stipules are widely described among the species of the subgenus *Passiflora* and present a largenumber of morphologies. In the subgenera *Astrophea*, *Decaloba*, *Deidamioides* and *Tetrapathea*, inconspicuous stipules are very common, described in general as: diminute, in the case of the subgenus *Deidamioides*; triangular or setaceous in the species of the subgenera *Astrophea* and *Tetrapathea*; and, frequently, setaceous or linear, in the subgenus *Decaloba*. In leaves, the morphological diversity is the result of the activity of different growth regions. With this, a survey of the morphoanatomical characters was carried out, identifying morphological patterns of species of three subgenera of *Passiflora*., followed by the ontogenetic study of the stipules of each of the patterns, and subsequent mapping of the morphological characters of the stipules from a current phylogeny. Initially, the conventional anatomical treatment of twenty species of the genus *Passiflora* was carried out: six of the subgenus *Decaloba*, two of the subgenus *Deidamioides*, and twelve species of the subgenus *Passiflora*. The analysis of the anatomy of the stipules led us to conclude that its structure is similar to the leaf blade of mesophyte eudicotyledons, presenting an epidermis with a single layer of cells, often composed of trichomes and distribution of stomata on both or just one face; homogeneous or heterogeneous mesophyll; and collateral vascular bundles, arranged in a pinned or palmately venation pattern. *Passiflora incarnata* L. presents the anatomy of the stipule distinct from the other species in its distal portion, in the epidermis there are no stomata, the mesophyll has small intercellular spaces and the vascular system is organized in a

single concentric rib of the amphivasal type, a probable process of abaxialization. In the morphological analyzes, two groups of stipules were identified: foliaceous and non-foliaceous. From this, eleven species from 20 were selected for the ontogenetic study and six morphological patterns were identified: symmetric foliaceous stipules, asymmetric foliaceous stipules with unilateral expansion, asymmetric foliaceous stipules with bilateral expansion, non-foliaceous stipules with blade expansion unilaterally, stipules non-foliaceous with bilateral blade expansion; and non-foliaceous stipules with absent laminar expansion. In the formation of the blade of the foliaceous stipules, the activity of the marginal meristem and, frequently, of the meristem in plate was identified. In the case of asymmetric foliaceous stipules, the marginal meristem is silenced on one of the flanks, retaking its activity after the development of the opposite blade, as in *P. caerulea* and *P. kermesina*; or it has the marginal meristem activity depressed on one flank and continuous on the other, as in *P. eichleriana*; or it has its activity terminated on one of its flanks, as in *P. morifolia*. The marginal meristem is often involved in the formation of the lamina, and it is visible soon after the establishment of adaxial-abaxial polarity. In the non-foliaceous stipules, the marginal meristem has an ephemeral activity, and in *Passiflora deidamioides* Harms it is absent. Like the leafy stipules, the non-foliaceous stipules present the activity of the marginal meristem, often ephemeral. From the morphological characters, synapomorphies to the subgenus *Passiflora*, clade with the species *P. eichleriana*, *P. racemosa*, *P. galbana*, *P. kermesina* and *P. caerulea*; as foliaceous shape, bilateral stipulation blade expansion, extrafloral nectaries present, isolation of the mesophyll and pinned venation.

## Referências Bibliográficas

---

- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society** 161: 105-121.
- APG IV. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV, **Botanical Journal of the Linnean Society**. 181 (1): 1–20.
- ARAÚJO, D. A. de. 2009. Passifloraceae. In: RODAL, M. J. N. **Flora de Mirandiba**. Recife – PE: Associação Plantas do Nordeste.
- BECK, C.B. 2005. **An Introduction to Plant Structure and Development**. Cambridge University Press, p. 431.
- BELL, A. D. 1991. **Na Illustrated Guide to Flowering Plant Morphology**. Oxford University Press.
- BERALDO, J.; KATO, E. T. M. 2010. Morfoanatomia de folhas e caules de *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 20 (2): 233-239.
- BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; NUNES, T.S.; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. 2015. *Passifloraceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB182>> acesso em 24/02/2020.
- BLEIN, T.; HASSON, A.; LAUFS, P. 2010. Leaf development: What it needs to be complex. **Current Opinion in Plant Biology** 13: 75-82.
- BRASILEIRO, 2014. **Morfologia e anatomia foliar comparada de espécies do gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae)**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo.
- CAPELLI, N. V.; RODIGUES, B. A.; DEMARCO, D. 2017. Stipules in Apocynaceae: an ontogenetic perspective. **AoB Plants** 9: plw083; doi:10.1093/aobpla/plw08.
- CARDOSO, 2010. **Estruturas secretoras em órgãos vegetativos aéreos de *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims (Passifloraceae) com ênfase na localização *in situ* de compostos bioativos**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas.
- CERVI, A. C. 2006. **O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950**. Madri.
- CERVI, A. C. 1997. **O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950**. Fontqueria XLV. Madri.
- COSTA, E. C. S.; NUNES, T. S.; MELO, J. I. M. 2015. Flora da Paraíba, Brasil: Passifloraceae *sensu stricto*. **Rodriguésia** 66(1): 271-284.

- CUSSET, M.G. 1965. Les nectries extra-louraxe t la valeur de la feuille des Passifloracees. *Revue Générale Botanique* 72:145-219.
- DENGLER, N. G.; TSUKAYAT, H. 2001. Leaf morphogenesis in dicotyledons: current issues. **International Journal of Plant Sciences** 162 (3): 459-464.
- DE WILDE, W. J. J. O. 1971. A monograph of the genus *Adenia* Forsk. (Passifloraceae). **Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen** 71: 1– 281.
- DURKEE, L.T.; BAIRD, C.W.; COHEN, P.F. 1984. Light and electron microscopy of the resin glands of *Passiflora foetida* (Passifloraceae). **American Journal of Botany** 71:596-602.
- DURKEE, L. T. 1983. **The ultrastructure of floral and extrafloral nectaries**. In: BENTLEY, B.; ELIAS, T. (ed). The biology of nectaries. Columbia University Press, New York.
- DURKEE, L. T.; GAAL, D. J.; REISENER, W. T. 1981. The floral and extrafloral nectarines of *Passiflora*. I. The floral nectar. **American Journal of Botany** 68: 453-462.
- EDGAR, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], 32 (5): 1792-1797, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
- ELIAS, T. S. 1983. **Extrafloral nectaries: their structure and distribution**. In: BENTLEY, B.; ELIAS, T. (ed). The biology of nectaries. Columbia University Press, New York.
- ELLIS, B.; DALY, D. C.; HICKEY, L. J.; JOHNSON, K. R.; MITCHELL, J. D.; WILF, P. & WING, S. L. 2009. **Manual of Leaf Architecture**. Published in Association with the New York Botanical Garden.
- ESAU, K. 1967. **Plant anatomy**. 2 ed. John Wiley & Sons, Inc.
- FAHN, A. 1979. **Secretory tissues in plants**. Academic Press Inc, London.
- FAHN, A. 1989. **Plant anatomy**. 3 ed. Pergamon Press.
- FARIAS, V.; MARANHO, L. T.; MUSCHNER, V. C; SOFFIATTI, P. 2016. Anatomia foliar de *Passiflora* subgênero *Decaloba* (Passifloraceae): implicações taxonômicas. *Rodriguesia*, 67(1): 29-44.
- FEUILLET, C. P.; MACDOUGAL, J. M. 2003. **A new infrageneric classification of *Passiflora***. *Passiflora* 13: 34-38.
- FEUILLET, C. P.; MACDOUGAL, J. M. 2007. Passifloraceae. In Kubitzki, K. 2007. **The families and Genera of vascular Plants**. Springer Berlin Heidelberg v9 p 270-281.
- FLEMING, A. J. 2002. The mechanism of leaf morphogenesis. **Planta** 216: 17-22.



- FLORA DO BRASIL. 2020<sup>a</sup>. **Turneraceae in Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB240>>. Acesso em: 24 Fev. 2020
- FLORA DO BRASIL. 2020<sup>b</sup>. **Passifloraceae in Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB182>>. Acesso em: 24 Fev. 2020
- FOSTER, A. S. 1936. Leaf differentiation in angiosperms. **The Botanical Review** 2 (7): 349-372.
- GERLACH, G. 1969. **Botanische Mikrotechnik.** Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- GONÇALVES, E. G.; LORENZI, H. 2007. **Morfologia vegetal: organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares.** São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.
- HANSEN, A. K.; GILBERT, L. E.; SIMPSON, B. B.; DOWNIE, S. R.; CERVI, A. C.; JANSEN, R.K. 2006. Phylogenetic Relationships and Chromosome Number Evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany** 31(1): p. 138-150.
- HERNANDES-LOPES, J.; MELO-DE-PINNA, G. F. A.; OLIVEIRA-NETO, M. A. 2016. Different ways to build succulent leaves in Portulacineae (Caryophyllales). **International Journal of Plant Sciences**, 177 (2): 198-208.
- JÁUREGUI, D.; GARCÍA, M.; PEREZ, D. 2002. Morfoanatomia de las glândulas em cuatro especies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) de Venezuela. **Caldasia** 24:33-40.
- JENSEN, W. A. 1962. **Botanical histochemistry: principles and practice.** W.H. Freeman e Co., San Francisco.
- JOHANSEN, D. A. 1940. **Plant Mycrotechnique.** New York: McGraw-Hill Book.
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOG, E.A., STEVENS, P.F. & DONOGHUE, M.J. 2008. **Plant Systematics - A phylogenetic approach.** Ed. 3. Sinauer Associates, Sunderland.
- KILLIP, E. P. 1938. The American species of Passifloraceae. Publications of the Field Museum of Natural History 19: 1-613.
- KROSNICK, S. E.; FORD, A. J.; FREUDENSTEIN, J. V. 2009. Taxonomic revision of *Passiflora* subgenus *Tetrapathea* including the monotypic genera *Hollrungia* and *Tetrapathea* (Passifloraceae), and a new species of *Passiflora*. **Systematic Botany**, 34(2): 375–385.
- KROSNICK, S. E.; PORTER-UTLEY, K. E.; MACDOUGAL, J. M.; JORGENSEN, P. M.; MCDADE, L. A. 2013. New insights into the evolution of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae): phylogenetic relationships and morphological synapomorphies. **Systematic Botany** 38 (3): 692-713.

- KURTZ, M. T. F., SANTOS, C. A. M.; DUARTE, M. R.; SATO, M. E. O. 2003. Morfo-anatomia de folhas de maracujá: *Passiflora actinia* Hooker, Passifloraceae. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 22(2): 105-112.
- LEMOS, R. C. C.; SILVA, D. C.; MELO-DE-PINNA, G. F. A. 2017. A structural review of foliar glands in *Passiflora* L. (Passifloraceae). **PLoS One**. 12(11): e0187905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187905>
- LILLIE, R. D. 1965. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. 3rd. Ed. New York: McGraw Hill.
- LUBBOCK J. 1899. **On buds and stipules**. The International Scientific Series. London: K. Paul, Trench, Trubner & Co., ltd.
- MAAS, P. J. M.; BAAS, P.; CHRISTENHUSZ, M. J. M.; CLARKSON, J. J.; KOEK-NOORMAN, J.; MENNEGA, A. M. W.; TOKUOKA, T.; VAN DER BANK, M.; VAN DER HAM, R. W. J. M.; VAN MARLE, E. J.; WESTRA, L. Y. T. H.; CHASE M. W. 2019. 'Unknown yellow': *Pibiria*, a new genus of Passifloraceae with a mixture of features found in Passifloroideae and Turneroideae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 189 (4): 397–407.
- MADDISON, W. P.; MADDISON, D. R. 2015. Mesquite: a Modular System for Evolutionary Analysis. Version 3.04. <https://mequiteproject.org>.
- MCCONNELL, J. R.; BARTON, M. K. 1998. Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. **Development** 125: 2935–2942.
- MELO-DE-PINNA, G. F. A.; HERNANDES-LOPES, J.; OGURA, A. S.; SANTOS, L. K.; SILVA, D. C.; 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, G. F. A.; CRUZ, R. S. 2020. Leaf Development in Vascular Plants. In: DEMARCO, D. (Org.). *Plant Ontogeny: studies, analyses and evolutionary implications* 1ed. New York: Nova Science, p. 83-105.
- LÓPEZ-MERUVIA, M. Y.; PALACIOS, V.; CERVI, A. C. 1993a. Anatomia foliar de *Passiflora capsularis* L. (Passifloraceae). **Acta Biológica Paranaense** 22: 34-44.
- LÓPEZ-MERUVIA, M. Y.; BONA, C.; CERVI, A. C. 1993b. Anatomia foliar de *Passiflora campanulata* Masters (Passifloraceae). **Acta Biológica Paranaense** 22: 45-62.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. 1950. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press. v.2.
- METCALFE, C. R. & CHALK, L. 1979. Passifloraceae. In: **Anatomy of the dicotyledons**. V2. 2 ed. Clarendon Press, Oxford.
- MUSCHNER, V. C.; LORENZ, A. P.; CERVI, A. C.; BONATTO, S. L.; SOUZA-CHIES, T. T.; SALZANO, F. M.; FREITAS, L. B. 2003. A first molecular

- phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany** 90 (8): 1229-1238.
- MUSCHNER, V. C.; ZAMBERLAN, P. M.; BONATO, S. L; FREITAS, L. B. 2012. Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology**, 35 (4): 1036-1043.
- PEARSE, A. G. E. 1985. **Histochemistry: theoretical and applied**. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- PIZZOLATO, T. D. e LILLIE, R. D. 1973. Mayer's tannic acid – ferric chloride stain for mucins. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 21: 56-64.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DERMARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Syst. Biol.** 61: 539–542.
- RUZIN, S. E. 1999. **Plant Microtechnique and Microscopy**. Oxford University Press, New York.
- SHORT, P. S. 2011. Passifloraceae. *In*: SHORT, P.S. & COWIE, I. D. (eds). **Flora of the Darwin Region**. Northern Territory Herbarium, Department of Natural Resources, Environment, the Arts and Sport. v1, pp. 1-5.
- SILVEIRA, M. 1989. **Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura**. *In*: SOUZA, W. (ed). Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica. v.1. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, Rio de Janeiro.
- SILVESTRO, D.; MICHALAK, I. 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. **Organisms Diversity & Evolution**, 12: 335-337.
- SIMPSON, M. G. 2010. **Plant Systematics**. 2ª ed. Editora Elsevier.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. 2008. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Ed. 2. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- STEVENS, P. F. 2001. **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 14, July 2017 [and more or less continuously updated since].
- STEVENS, P. F. (2001 onwards). **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 14, July 2017 [and more or less continuously updated since].
- STRITTMATER, C.G.D. 1973. Nueva técnica de diafanización. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botanica, Buenos Aires** 15(1): 126-129.
- SVOBODA, H. T. & BALLARD JR, H. E. 2018. Phenetic and cladistic studies help clarify species assemblages in *Passiflora* section *Dysosmia* (Passifloraceae). **Brittonia** 70(1): 15-24.

- TSUKAYA, H. 2010. Leaf development and evolution. **Journal of Plant Research**, 123 (1): 3-6.
- ULMER, T.; MACDOUGAL, M. J. 2004. ***Passiflora: Passionflowers of the world***. Timber Press, Inc., Portland.
- YOTOKO, K. S. C.; DORNELAS, M. C.; TOGNI, P. D.; FONSECA, T. C.; SALZANO, F. M.; BONATTO, S. L.; FREITAS, L. B. 2011. Does variation in genome sizes reflect adaptive or neutral processes? New clues from *Passiflora*. **PLoS One** 6(3): 1-8.
- ZAMBERLAN, P. M. 2007. Filogenia de *Passiflora* L. (Passifloraceae): questões infra-subgenéricas. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 105p.
- WEBERLING, F. 2006. Las estípulas como caracteres sistemáticos confiables. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, 41: 127-150.

## Anexos

**Anexo I.** Matriz com caracteres morfológicos e anatômicos das estípulas de 20 espécies do gênero *Passiflora*, selecionados inicialmente. Seguido da lista de caracteres. Todas estas espécies tiveram suas estípulas maduras tratadas e analisadas em laboratório de anatomia vegetal. (-) Caráter não se aplica. (?) Caráter não observado.

Espécies	Caracteres																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>Passiflora capsularis</i> L.	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	2	0	0	1	0	1
<i>P. coriacea</i> Juss.	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	2	0	1	3	1	1
<i>P. micropetala</i> Mart. ex Mast.	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	2	0	1	3	0	1
<i>P. morifolia</i> Mast.	1	0	1	0	2	2	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	2
<i>P. organensis</i> Gardn.	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	2	0	0
<i>Passiflora suberosa</i> L.	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2	0	1	2	0	1
<i>P. contracta</i> Vitta	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	-	0	0	3	0	0
<i>P. deidamioides</i> Harms	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	-	0	0	1	-	0
<i>P. alata</i> Curtis	1	1	0	1	3	1	1	0	1	1	1	1	0	0	2	0	1
<i>P. caerulea</i> L.	1	0	1	1	5	2	1	0	1	1	1	2	1	1	0	0	2
<i>P. coccinea</i> Aubl.	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	2	0	0	3	0	2
<i>P. edulis</i> Sims	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	2	0	0
<i>P. eichleriana</i> Mast.	1	0	1	1	5	1	0	0	1	0	1	2	1	1	2	0	2
<i>P. foetida</i> L.	0	1	0	0	7	-	-	1	0	0	1	2	0	0	3	0	1
<i>P. galbana</i> Mast.	1	1	0	1	4	0	0	0	1	1	1	2	0	1	2	0	2
<i>P. incarnata</i> L.	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	2
<i>P. kermesina</i> Link & Otto	1	0	1	1	6	2	1	0	1	0	1	1	1	1	2	0	2
<i>P. ligularis</i> A. Juss.	1	1	0	1	4	1	1	0	1	0	1	2	0	1	2	1	1
<i>P. platyloba</i> Killip	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	2	0	2
<i>P. racemosa</i> Brot.	1	1	0	0	4	1	0	0	1	0	1	?	0	0	0	1	2

**Lista de caracteres:****Morfológicos**

1. Estípula não foliácea (0), foliácea (1);
2. Estípula simétrica ausente (0), presente (1)
3. Estípula assimétrica ausente (0), presente (1);
4. Nectários extraflorais, ausentes (0), presentes (1);
5. Morfologia, setácea (0), linear (1), falciforme (2), lanceolada (3), ovada (4), subreniforme (5), reniforme (6), sectada (7);
6. Ápice da estípula, agudo (0), acuminado (1), caudado (2);
7. Margem da estípula, inteira (0), denteada (1);

**Anatômicos**

8. Tricomas tomentosos, ausentes (0), presentes (1);
9. Altura das células epidérmicas: células da face adaxial > que as células da face abaxial (0), células das faces adaxial e abaxial com a mesma altura (1);
10. Espessamento da parede periclinal externa das células epidérmicas, ausente (0), presente (1)
11. Estômatos, ausentes (0), presentes (1);
12. Estômatos distribuídos apenas na face adaxial (0), apenas na face abaxial (1), em ambas as faces (2);
13. Parênquima fundamental homogêneo (0), dorsiventral (1);
14. Colênquima, ausente (0), presente (1);
15. Idioblastos, ausentes (0), contendo compostos fenólicos (1), contendo drusas (2), contendo compostos fenólicos e drusas (3);
16. Fibras pericíclicas, ausentes (0), presentes (1);
17. Padrão de venação das estípulas, feixe único (0), palmado (1), pinado (2).

**Anexo II.** Matriz com caracteres morfológicos das estípulas de 46 espécies do gênero *Passiflora*, analisadas a partir de dados bibliográficos e algumas vezes de material coletado, seguido da lista de caracteres. (?) Caráter não observado.

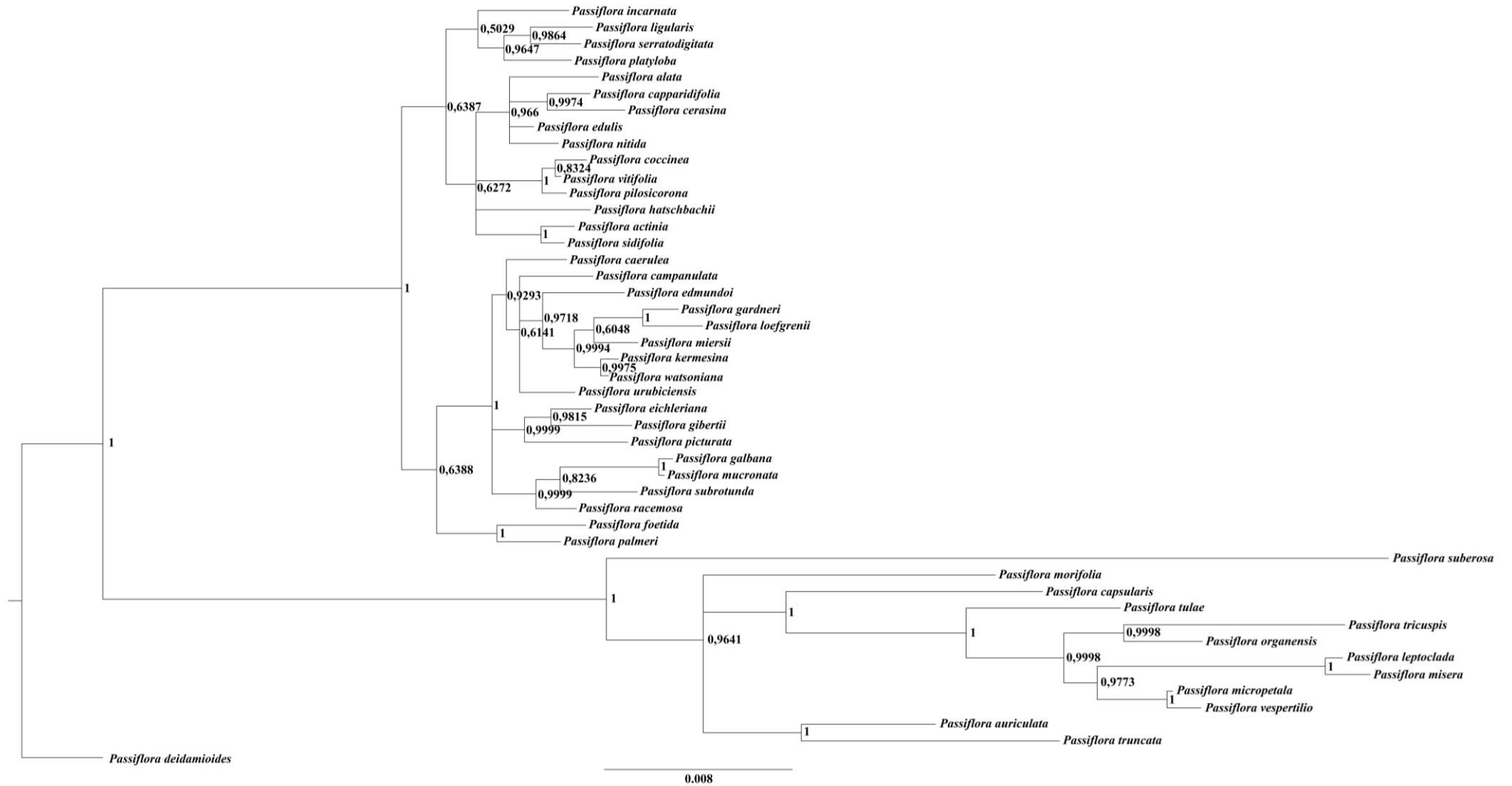
Espécies	Caracteres						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Passiflora auriculata</i> Kunth	0	0	0	0	?	?	0
<i>Passiflora capsularis</i> L.	0	1	0	0	0	0	0
<i>Passiflora leptoclada</i> Harms	0	0	0	0	?	?	1
<i>Passiflora misera</i> Kunth	0	0	0	0	0	0	0
<i>Passiflora morifolia</i> Mast.	1	0	1	0	0	0	7
<i>Passiflora organensis</i> Gardn.	0	1	0	0	0	0	1
<i>Passiflora suberosa</i> L.	0	1	0	0	0	0	1
<i>Passiflora tricuspis</i> Mast. in Mart.	0	0	0	0	0	0	0
<i>Passiflora tulae</i> Urban	0	0	0	0	?	?	1
<i>Passiflora deidamioides</i> Harms	0	0	0	0	0	0	0
<i>Passiflora actinia</i> Hook.	1	0	1	0	0	0	2
<i>Passiflora alata</i> Curtis	1	1	0	0	1	0	4
<i>Passiflora capparidifolia</i> Killip	0	0	0	0	?	?	1
<i>Passiflora cerasina</i> Annonay & Feuillet	0	0	0	0	?	?	1
<i>Passiflora coccinea</i> Aubl.	0	0	0	0	1	0	1
<i>Passiflora edmundoi</i> Sacco	1	0	1	0	1	0	3
<i>Passiflora edulis</i> Sims	0	0	0	0	1	0	1
<i>Passiflora eichleriana</i> Mast.	1	0	1	0	1	0	5
<i>Passiflora foetida</i> L.	0	0	0	1	0	1	8
<i>Passiflora galbana</i> Mast.	1	1	0	0	1	0	7
<i>Passiflora gardneri</i> Mast.	1	0	1	0	1	0	4
<i>Passiflora gibertii</i> N. E. Brown.	1	0	1	0	?	?	6
<i>Passiflora incarnata</i> L.	0	1	0	0	1	0	0
<i>Passiflora kermesina</i> Link & Otto	1	0	1	0	1	0	2
<i>Passiflora ligularis</i> A. Juss.	1	1	0	0	1	0	5
<i>Passiflora loefgrenii</i> Vitta	1	0	1	0	1	0	3
<i>Passiflora miersii</i> Mast.	1	0	1	0	1	0	6
<i>Passiflora mucronata</i> Lam.	1	0	1	0	0	0	4
<i>Passiflora nitida</i> Kunth	0	0	0	0	?	?	1
<i>Passiflora palmeri</i> Rose	0	0	0	1	0	1	8
<i>Passiflora picturata</i> Ker Gawl.	1	0	1	0	?	?	6
<i>Passiflora pilosicorona</i> Sacco	0	0	0	1	?	?	8
<i>Passiflora platyloba</i> Killip	0	0	0	0	1	0	1
<i>Passiflora racemosa</i> Brot.	1	1	0	0	0	0	7
<i>Passiflora serratodigitata</i> L.	0	0	0	0	1	0	1
<i>Passiflora sidifolia</i> M. Roem.	1	0	1	0	0	0	3
<i>Passiflora subrotunda</i> Mast.	1	0	1	0	0	0	7
<i>Passiflora urubiciensis</i> Cervi	1	0	1	0	1	0	7
<i>Passiflora vitifolia</i> Kunth	0	0	0	0	1	0	1
<i>Passiflora watsoniana</i> Mast.	1	0	1	0	?	?	3

**Lista de caracteres morfológicos:**

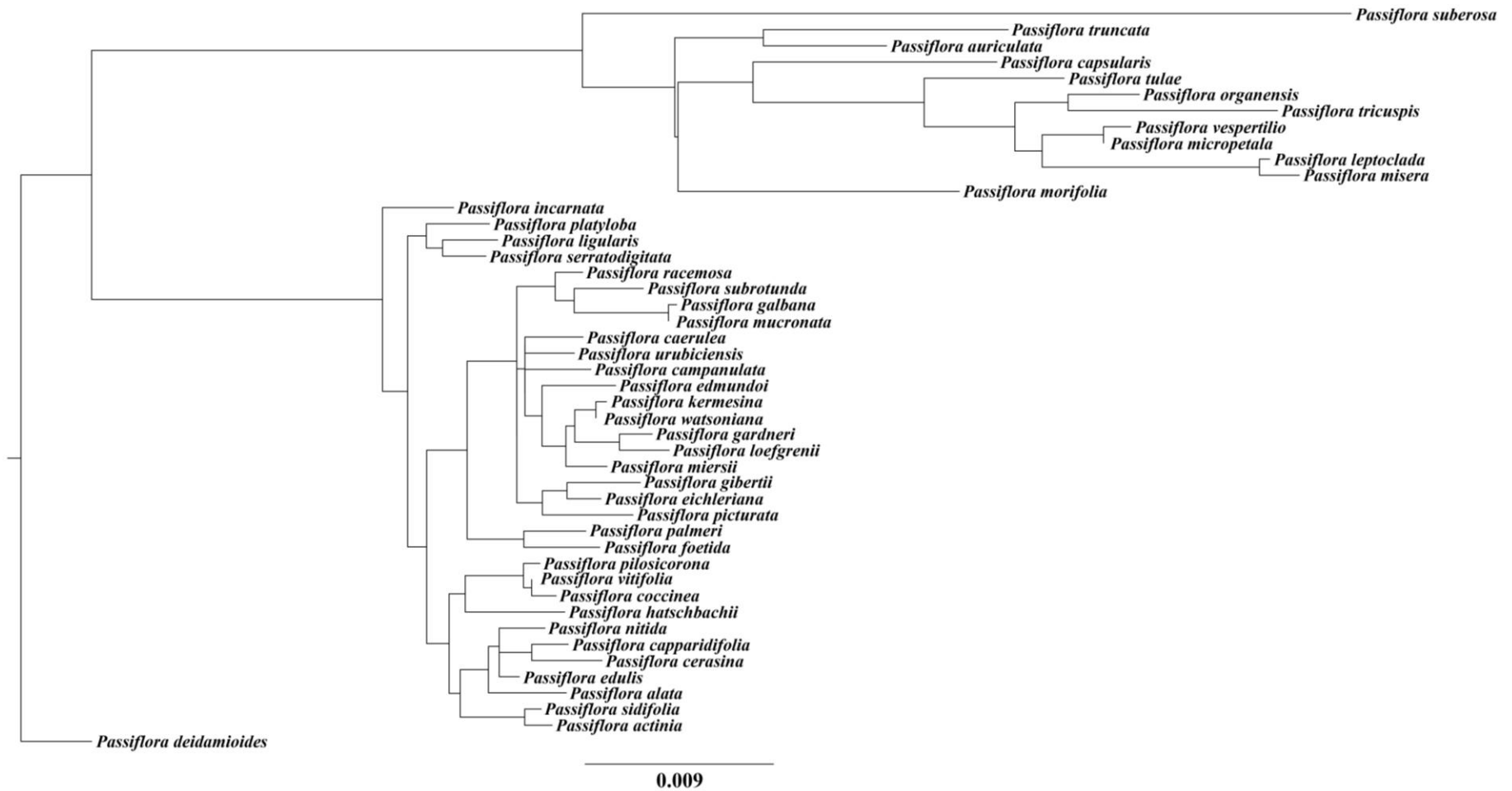
1. Estípula não foliácea (0), foliácea (1);
2. Estípulas simétricas, ausentes (0), presentes (1);
3. Estípulas assimétricas, ausentes (0), presentes (1);
4. Estípula sectada, ausente (0), presente (1);
5. Nectários extraflorais, ausente (0), presente (1);
6. Glândulas de resina, ausente (0), presente (1);
7. Forma da estípula, setácea (0), linear (1), subreniforme (2), reniforme (3), lanceolada (4), oblonga (5), semiovada (6), ovada (7), sectada (8).



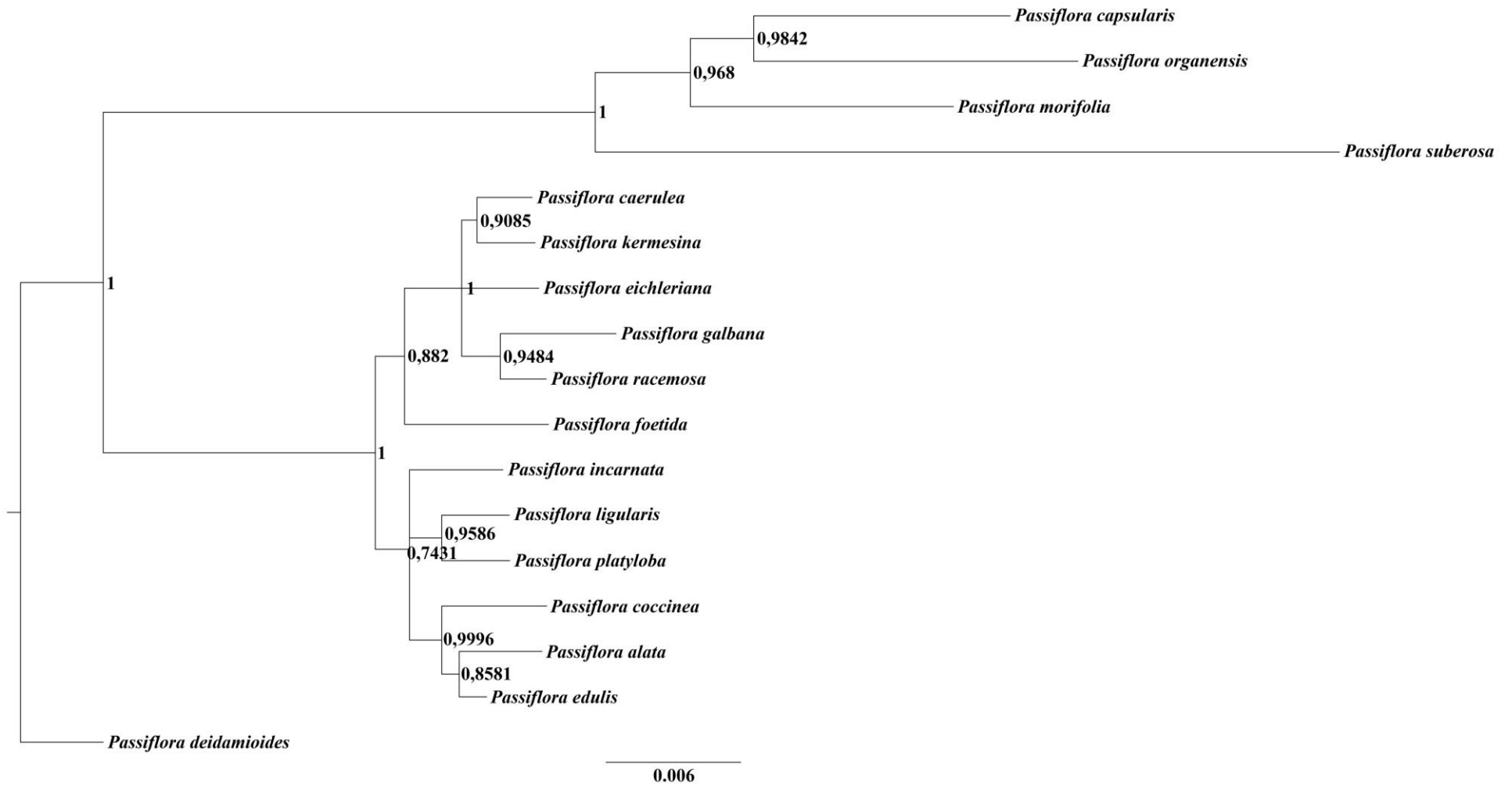
**Anexo III.** Árvore filogenética com 46 espécies do gênero *Passiflora*, subgêneros *Decaloba*, *Deidamioides* e *Passiflora*, obtida a partir de análise Bayesiana no programa Mr Bayes.



**Anexo IV.** Árvore filogenética com 46 espécies do gênero *Passiflora*, subgêneros *Decaloba*, *Deidamioides* e *Passiflora*, obtida a partir da análise de Máxima Verossimilhança (ML), utilizando o programa RAXMLgui. Árvore selecionada para a reconstrução de caracteres ancestrais.



**Anexo V.** Árvore filogenética com 17 espécies do gênero *Passiflora*, subgêneros *Decaloba*, *Deidamioides* e *Passiflora*, obtida a partir de análise Bayesiana no programa Mr Bayes.



**Anexo VI.** Árvore filogenética com 17 espécies do gênero *Passiflora*, subgêneros *Decaloba*, *Deidamioides* e *Passiflora*, obtida a partir da análise de Máxima Verossimilhança (ML), utilizando o programa RAXMLgui. Árvore selecionada para a reconstrução de caracteres ancestrais.

