

Carlos Eduardo Valério Raymundo

Ontogênese e histoquímica das glândulas
foliares em espécies de *Passiflora* L.
pertencentes aos subgêneros *Decaloba* (DC.)
Rchb e *Passiflora*

Ontogeny and histochemical analysis of leaves
glands in *Passiflora* L. subgenus *Decaloba*
(DC.) Rchb e *Passiflora*

São Paulo

2018

Carlos Eduardo Valério Raymundo

Ontogênese e histoquímica das glândulas
foliares em espécies de *Passiflora* L.
pertencentes aos subgêneros *Decaloba* (DC.)
Rchb e *Passiflora*

Ontogeny and histochemical analysis of leaves
glands in *Passiflora* L. subgenus *Decaloba*
(DC.) Rchb e *Passiflora*

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

Orientadora: Prof. Dra. Gladys Flávia
de Albuquerque Melo de Pinna.

São Paulo

2018

Ficha Catalográfica

Valério Raymundo, Carlos Eduardo

Ontogênese e histoquímica das glândulas foliares em espécies de *Passiflora* L. pertencentes aos subgêneros e *Decaloba* (DC.) Rchb e *Passiflora*. São Paulo, 2018.

51 páginas.

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

1. Nectários extraflorais; 2. Desenvolvimento; 3. Anatomia Vegetal. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a). Gladys Flávia de Albuquerque Melo de Pinna.

Dedicatória

Aos meus pais, Antônio Raymundo Netto
e Penha Maria Valério Raymundo.

Epígrafe

“O CAMINHO DO BEM”

Tim Maia

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Gladys Flávia Melo-de-Pinna, primeiramente, por ter aceitado orientar o meu trabalho de mestrado. Durante o estágio realizado no “Botânica no Inverno” 2015, conheci seus trabalhos e fiquei bastante curioso e apaixonado pelo desenvolvimento foliar. Por isso, enchi sua caixa de entrada com vários e-mails e, por sorte minha, ela os viu e consegui entrar em contato comigo. Obrigado por ter me ensinado todos os dias um pouco desse imenso mundo conhecido como Botânica.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Biociências pela infraestrutura, bem como à todos os funcionários pela presteza e disposição em ajudar. Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento Científico e Tecnológico de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de fomento que me permitiu realizar esses dois anos de mestrado.

Aos novos e velhos colegas da Equipe Melo-de-Pinna: **Aline Ogura, Bruno Edson, Cláudia Chen, Cristina Zampieri, Fátima Pires, Fernanda Cordeiro, Gabriela Naomi, Karina Urbano, Karla Menezes, Leyde Nayane, Juliana Brasileiro, Ligia Keiko, Mariana Rapozo, Rafael Cruz, Renata Lemos, Rivardo Vita, Thaíla Vieira, Vinicius Gabia e Yasmin Hirao.**

Obrigado pelo convívio e experiências com os demais docentes do Laboratório de Anatomia Vegetal: **Dr. Diego Demarco, Dr. Gregorio Ceccantini, Dra. Nanuza de Menezes e Dra. Verônica Angyalossy.**

Aos novos amigos da FFLCH: **Otávio Balaguer, Gabriel Orlando, Pâmela e Larissa de Carvalho Nascimento.** Nossa viagem para Ubatuba foi incrível, obrigado pelos bons momentos compartilhados em São Paulo. Um agradecimento em especial a **Roberta Estimado**, minha namorada, que nesses últimos meses em São Paulo me mostrou um pouquinho dessa cidade que ainda não havia conhecido. Muito obrigado por ter entrado na minha vida.

Aos meus amigos de Alegre, à **Lucimara Ribeiro** por sempre me apoiar e nunca desistir dos meus objetivos, em especial aos irmãos Torres (**Felipe Torres e Cristiane Torres**), por terem me apresentado ao Botânica no inverno e me incentivado a fazê-lo. Falando em botânica no inverno, muito obrigado à todos os alunos e docentes envolvidos. Obrigado pela experiência e pela oportunidade de conhecer o Instituto de Biociências,

sem vocês eu não teria feito o mestrado nessa instituição. Espero que a cada ano novos alunos de diferentes regiões desse país tenham a mesma oportunidade que eu tive.

Aos amigos da fitoquímica e da taxonomia, e ao mesmo tempo do nosso grupo carinhosamente conhecido como “HOGWARTS” – **Andressa Cabral, Gislaine das Neves** “a modelo do Instituto de biociências”, **Leyde Nayne, Paulo Zampieri, Pamela Tavares, Priscila Bittencourt e Tamara Machado.**

Aos colegas da Fisiologia Vegetal, desde o início do mestrado compartilhando momentos de alegrias e jogos super divertidos – **Aline Coelho, Alejandra Matiz, Aline Bertinatto, Ana Zangirólame, Antônio Azeredo, Gobara, Perdigão, Mito, Professor Luciano, Fred, Grillo, Filipe Christian, Renata Callegari,** ao irreverente **Willian.**

Agradeço imensamente às técnicas do nosso laboratório de Anatomia Vegetal- **Gisele Costa e Tássia Cristina dos Santos,** sempre auxiliando e tirando dúvidas em todos os protocolos. Ao **Irwandro Pires** pelas análises de microscopia de varredura. E aos demais colegas do laboratório de anatomia vegetal: **André Lima, Cain Gerolamo, Carolina Bastos, Erica Moniz, Israel Lopes, Luiza Teixeira, Maria Camila, Natalie Capelli.**

Agradeço à todos os funcionários do Instituto de Biociências, em especial, a **Verônica:** foram vários os dias de conversas e trocas de conhecimentos. Não podia esquecer do secretário **Norberto,** que desde o primeiro dia da concessão da bolsa me ajudou em todos os entraves. Além disso, durante os intervalos pelo corredor, inúmeras conversas descontraídas sobre o mundo, a economia, política, educação e também de futebol.

Obrigado ao **José Hernandez (Zé)** e a **Rena Lemos e Rafael Cruz** por tudo. Li muito os seus artigos e as teses que me ajudaram bastante na escrita do meu trabalho. Muito obrigado **Renata** por me auxiliar nos testes histoquímicos. E, quem sabe, Zé seja meu futuro coorientador, dando continuidade aos estudos com as belíssimas Passifloras.

Muito obrigado, à **Leyde Nayane e Priscila Bittencourt** e ao **Dênis:** foram 2 anos de convívio com muita alegria, companheirismo e discussões de trabalhos. Só tenho a agradecer ter passado esses 24 meses com vocês, sentirei muita a falta, e desculpa pelo meu jeito seco de ser.

Agradeço à minha família. Aos meus avós **Carmozino Valério e Maria Antonieta.** À Juliana, que me emprestou o seu notebook durante o meu mestrado. À minha irmã Camilla, que desde a graduação sempre me ajuda: muito obrigado irmã. À

minha mãe **Penha Maria Valério Raymundo**, pelo apoio imensurável desde sempre na minha pequena carreira acadêmica, sempre incentivando a estudar. E ao meu pai, **Antônio Raymundo Netto**: onde o senhor estiver tenho certeza que sempre estará de olho em mim em todos esses momentos.

Obrigado a todos envolvidos em minha dissertação.

Índice

Resumo	10
Abstract	12
Introdução Geral	14
Capítulo 1. Nectários extraflorais em <i>Passiflora</i> L. são estruturas primariamente homólogas? Uma abordagem ontogenética	21
Resumo	21
Introdução	22
Material e Métodos	23
Resultados	24
Discussão	30
Referências Bibliográficas	35
Figuras	39
Conclusões Gerais	52

Resumo

A família Passifloraceae apresenta uma grande diversidade de estruturas glandulares: glândulas de resinas, coléteres, tricomas glandulares e nectários extraflorais (NEF's). Dentre estas, os NEF's são bastante relevantes, notadamente para fins taxonômicos e filogenéticos. Em virtude disso, numerosas pesquisas vêm abordando estudos envolvendo a descrição e a funcionalidade dessas glândulas, entretanto, foram poucos os que abordaram sua descrição em um contexto ontogenético. Portanto, o presente estudo tem por objetivo analisar a natureza e a distribuição dessas glândulas, bem como descrever os principais aspectos do seu desenvolvimento, visando a ocorrência de homologias primárias a partir dos padrões ontogenéticos. Para esse fim, analisamos as glândulas foliares maduras e ápices caulinares em representantes de *Passiflora* L., pertencentes aos dois subgêneros mais diversificados (*Passiflora* e *Decaloba*), a partir de técnicas usuais em anatomia vegetal, incluindo microscopia óptica e eletrônica de varredura. Realizamos também testes histoquímicos convencionais para caracterizar os exsudatos das glândulas, além do uso de Glicofitas. Constatamos que todas as glândulas são NEF's, devido à presença de carboidratos e outras substâncias hidrofílicas (mucilagem ácida e proteínas), além da reação positiva com a glicofita. Com efeito, os nectários extraflorais estão presentes em diferentes regiões da folha: pecíolo, lâmina foliar (dorso-laminar e marginais) e estipulas. Observamos ainda que eles apresentam uma relevante diversidade morfológica, porém, compartilham uma mesma característica anatômica: uma epiderme secretora e um parênquima nectarífero e subnectarífero. Independente da região de origem, os NEF's em *Passiflora* compartilham características estruturais comuns nos estágios iniciais do desenvolvimento: estabelecimento de uma epiderme em paliçada com divisões exclusivamente anticlinais e uma região subepidérmica caracterizada por diferentes padrões de divisões. Contudo, apesar dessa similaridade, os nectários possuem particularidades específicas em cada região de origem: os nectários dorso-laminares surgem a partir do plastocrono 5 (p5), e tornam-se totalmente diferenciados antes da distinção do mesofilo. Os peciulares, por sua vez, desenvolvem-se basipetalmente ou acropetalmente, além de possuírem origens diferentes em relação aos domínios adaxial do primórdio foliar. Por fim, os nectários estipulares desenvolvem-se e amadurecem desde os primeiros plastocronos (p4). Com base nos resultados adquiridos,

trouxemos novas evidências nos processos de diferenciação dessas glândulas, que podem ser potencialmente informativos nas relações filogenéticas do grupo.

Abstract

Passifloraceae family presents a great diversity of glandular structures: resins glands, coléteres, glandular trichomes and extrafloral nectaries (NEF's). Among these, the NEF's are quite relevant, notably for taxonomic and phylogenetic purposes. Because of this, numerous studies have been addressing studies involving the description and functionality of these glands, however, few have addressed its description in an ontogenetic context. Therefore, the present study aims to analyze the nature and distribution of these glands, as well as describe the main aspects of their development, aiming at the occurrence of primary homologies from ontogenetic patterns. Therefore, the present study aims to analyze the nature and distribution of these glands, as well as describe the main aspects of their development, aiming at the occurrence of primary homologies from ontogenetic patterns. For this purpose, we analyzed the mature leaf glands and shoots of *Passiflora* L., belonging to the two most diversified subgenres (*Passiflora* and *Decaloba*), using techniques usual in plant anatomy, including optical microscopy and scanning electron microscopy. We also performed conventional histochemical tests to characterize exudates of the glands, in addition to the use ribbons of glucose. We found that all glands are NEF's, due to the presence of carbohydrates and other hydrophilic substances (acid mucilage and proteins), in addition to the positive reaction with ribbons of glucose. In fact, NEF's are present in different regions of the leaf: petiole, leaf blade (dorso-laminar and marginal) and stipulate. We also observed that they present a significant morphological diversity, but they share the same anatomical characteristic: a secretory epidermis and a nectariferous and subnectariferous parenchyma. Regardless of the region of origin, the NEF's in *Passiflora* share common structural features in the early stages of development: establishment of a palisade epidermis with exclusively anticline divisions and a subepidermal region characterized by different patterns of divisions. However, in spite of this similarity, the specific peculiarities in each region of origin: dorso-laminar nectaries arise from the plastochronous 5 (p5), and become fully differentiated before the mesophyll distinction. The peciolar, in turn, develop basipetally or acropetally, besides having different origins in relation to the ada-abaxial domains of the leaf primordia. Finally, estípules nectaries develop and mature from the first p4. Based on the results, we have brought new evidence

into the processes of differentiation of these glands, which may be potentially informative in the phylogenetic relationships of the group.

Introdução Geral

Passifloraceae Juss. Ex Roussel é um grupo monofilético, que pertence à ordem Malpighiales, sustentada tanto por caracteres moleculares quanto morfológicos (Judd *et al.*, 2009; APG III). A família possui uma distribuição pantropical, sendo possível encontrar algumas espécies na região da América do Norte e do Sul, na Oceania (Austrália e Nova Zelândia) e sul da China. Ademais, ela abarca cerca de 16-25 gêneros e aproximadamente 700 espécies, divididos em duas tribos: Paropsiae e Passifloreae (Feuillet & MacDougal, 2003).

A tribo Passifloreae é um grupo monofilético, o qual apresenta como sinapomorfias morfológicas o hábito lianescente, as gavinhas axilares e as flores especializadas (Ulmer & Macdougal, 2004; Judd *et al.*, 2009). Está representada atualmente por 11 gêneros, com distribuição por todo o neotrópico, principalmente na América do Sul (Feuillet & MacDougal, 2003). Na flora brasileira são reconhecidos quatro gêneros: *Ancistrothyrsus* Harms, *Mitostemma* Mast., *Dilkea* Mast. e *Passiflora* L. (Bernacci *et al.*, 2016).

O gênero *Passiflora* L. também é monofilético, cujas principais características são flores grandes, coloridas, com tubo floral geralmente conspicuo, cinco estames e órgãos sexuais elevados em uma coluna, o androginóforo (Cervi, 1997). Também se caracteriza por possuir uma grande variedade de formas foliares, e diversos tipos de nectários extraflorais (NEFs), que geralmente são encontrados no caule, nas brácteas ou no pecíolo (Krosnick & Freudenstein, 2009). *Passiflora* L. foi dividido recentemente em quatro subgêneros: *Astrophea* (DC.) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb., e *Passiflora* (Feuillet & MacDougal 2003). E Krosnick *et al.* (2009), reconheceu *Tetrapathea* (DC.) P. S. Green, aumento para cinco subgêneros.

Passiflora L. é representativamente e economicamente o mais importante da família, com cerca de 560 espécies, distribuídas principalmente nas regiões neotropicais (Ulmer & MacDougal, 2004; Krosnick *et al.*, 2013). O Brasil é um dos países com a maior riqueza, apresentando atualmente 145 espécies, ocorrendo em todas as federações (Bernacci *et al.*, 2016). Com aproximadamente 250 espécies no subgênero *Passiflora* e 230 no subgênero *Decaloba* estes dois são os mais representativos e diversificados de

Passiflora L. (Porter-Utley, 2014). Os representantes do subgênero *Passiflora* vão de trepadeiras herbáceas às lianas, com flores grandes e coloridas. Eles possuem entre 2-6 nectários peciolares e, quando presentes na lâmina foliar, estão restritos às margens (Feuillet & MacDougal, 2003; Ulmer & MacDougal, 2004). Já o subgênero *Decaloba* inclui pequenas trepadeiras ou arbustos, com flores e frutos pequenos, apresentando nectários nos pecíolos e na lâmina foliar (Feuillet & MacDougal, 2003; Ulmer & MacDougal, 2004).

Nectários extraflorais em *Passiflora* L.

Os nectários extraflorais são referidos como estruturas glandulares que secretam néctar em órgãos não reprodutivos (Fahn, 1979; Schmid, 1988). *Passiflora* L. é o gênero de angiospermas com o maior número de espécies que possuem NEF's, descritos em cerca 320 espécies (Weber & Keller, 2013). Em virtude disso, ao longo das últimas décadas, diferentes pesquisas vêm abordando a presença dessas glândulas em *Passiflora*, seja destacando a sua morfoanatomia (Jáuregui & Garcia, 2002; Lemos *et al.*, 2017), a sua ultraestrutura (Durke *et al.*, 1982; Durke, 1983; Lemos, 2017) ou as suas interações ecológicas (Cardoso-Gustavson *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2016).

Diversos trabalhos têm utilizado a presença dos NEF's como um importante caráter taxonômico para o grupo (Killip 1938; López-Meruvia *et al.*, 1993; Cervi 2006; Vanderplank 2000; Ulmer & MacDougal 2004; Krosnick *et al.*, 2009; Souza & Lorenzi 2012; Krosnick *et al.*, 2012; Mezzonato-Pires *et al.*, 2013). Segundo Nunes & Queiroz (2006), a depender da topografia, da densidade e da variação estrutural destas glândulas, elas podem ser úteis na delimitação de espécies.

Os NEF's possuem uma distribuição heterogênea ao longo do corpo da planta, e segundo Feuillet & Macdougall (2003) e Ulmer & Macdougall (2004), podem estar presentes nas folhas, sendo encontradas na lâmina, no pecíolo e nas estípulas, bem como nas brácteas. Eles são amplamente registrados em diferentes níveis taxonômicos em *Passiflora*, encontrando-se em espécies pertencentes aos cinco subgêneros e em 16 superseções (Cervi, 1997; Ulmer & MacDougal, 2004).

Dentro do gênero *Passiflora* L., os NEF's apresentam diferentes padrões de distribuição. No subgênero *Deidamioides*, os nectários ocorrem no pecíolo e na lâmina foliar, sendo restrito à sua margem. Em *Astrophea* estão presentes nos pecíolos, porém

ausentes na lâmina foliar. Os nectários em *Tetrapathea* são encontrados tanto no pecíolo quanto na lâmina foliar. *Passiflora*, com nectários no pecíolo e lâmina foliar, restrito nas margens. Em *Decaloba*, os nectários estão presentes tanto no pecíolo quanto na lâmina foliar (Feuillet & Macdougall 2003; Ulmer & Macdougall 2004; Krosnick *et al.*, 2013). Killip (1938), estudando espécies em Passifloraceae, descreveu a presença de diferentes formatos das glândulas, caracterizando-as como: globosas, em forma de clava; pateliformes; sésseis; estipadas; orbiculares e liguliformes.

Atualmente, a descrição mais completa da morfologia e anatomia de glândulas foliares em *Passiflora* foi proposta por Lemos *et al.* (2017). Neste trabalho as autoras estudaram a presença de glândulas em 34 espécies do gênero *Passiflora*, pertencentes aos subgêneros *Astrophea*, *Deidamioides*, *Decaloba* e *Passiflora*. As autoras propuseram duas categorias de glândulas no grupo: glândulas tipo I definidas como nectários, podendo apresentar nectários com padrões elevados e planos; e glândulas tipo II, representadas pelas glândulas de resina, com padrões apenas elevados.

Trabalhos recentes, estudaram glândulas foliares em *Passiflora amethysta* (Rocha *et al.*, 2009) e em *P. edulis*, *P. alata* (Cardozo-Gustavson *et al.*, 2013). Em ambos os trabalhos, os autores verificaram a presença de açúcares nas glândulas por meio de análise de glicofita ou testes histoquímicos, confirmando a natureza dessas glândulas como nectários extraflorais. Além de analisarem a anatomia dos nectários extraflorais, os autores focaram no processo de desenvolvimento dessas glândulas, com resultados similares no processo de desenvolvimento dos nectários, envolvendo a atividade dos três tecidos meristemáticos primários: protoderme, meristema fundamental e procâmbio.

Ademais das análises estruturais, Silva *et al.* (2016) ampliaram os estudos dos nectários extraflorais em *Passiflora* com dados ecológicos. Como resultado, observaram que borboletas e principalmente formigas pertencentes às ordens Ectatomma, Crematogaster e Camponotus coletam o néctar. Com efeito, as formigas atuam patrulhando a superfície das folhas. Em virtude disso, os autores concluíram a importância dessas glândulas na interação ecológica com seus visitantes. Os estudos têm demonstrado que os NEF's compartilham uma estrutura anatômica similar em *Passiflora* (Durkee, 1982, 1983; Rocha *et al.*, 2009; Cardoso-Gustavson *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2016; Lemos *et al.*, 2017).

Anatomicamente os nectários apresentam três regiões distintas: 1) a epiderme secretora, que geralmente é multisseriada, apresentando células cuboidais à colunares,

com a parede periclinal externa da célula da epiderme revestida por uma cutícula, onde o néctar pode se acumular, formando um espaço subcuticular; 2) o parênquima nectarífero, composto por várias camadas de células isodiamétricas, com vacúolos maiores e o citoplasma mais denso, em que se encontram inúmeros cristais de oxalato de cálcio; 3) o parênquima subnectarífero, zona formada por células maiores e mais justapostas, em que ocorre a conexão dos feixes vasculares, compostos por células do xilema e floema, ou apenas floema — em alguns casos, as terminações das células do floema podem ultrapassar a região do parênquima subnectarífero atingindo até as camadas do parênquima secretor (Rocha *et al.*, 2009).

Os exsudatos dos nectários são constituídos majoritariamente por carboidratos, principalmente glicose, frutose e sacarose (Fahn, 1979). Em *Passiflora* alguns estudos demonstraram que a concentração desses açúcares varia entre as espécies e entre os diferentes nectários de uma mesma espécie (Durkee, 1982; Rocha *et al.*, 2009; Cardoso-Gustavson *et al.*, 2013). Além dos carboidratos, outras substâncias foram detectadas nos exsudatos em *Passiflora*. Nos estudos realizados por Cardoso-Gustavson e colaboradores (2013) em *Passiflora edulis* e *P. alata*, os pesquisadores identificaram a presença de flavonoides e alcaloides. Geralmente os exsudatos são detectados na epiderme e na região do parênquima nectarífero e, algumas vezes, no espaço subcuticular (Rocha *et al.*, 2009; Cardoso-Gustavson *et al.*, 2013; Lemos 2017).

Organização da dissertação

Esta dissertação teve como principal objetivo investigar os padrões de desenvolvimento das glândulas foliares em *Passiflora*, em seis espécies pertencentes aos dois subgêneros mais diversificados (*Passiflora* e *Decaloba*), buscando estabelecer homologias primárias a partir de dados da distribuição, morfoanatomia, ontogenia e composição química dos exsudatos. Com base nos resultados obtidos, optamos por escrever esta dissertação em apenas um capítulo, uma vez que todas as informações adquiridas se complementam e dão robustez à sua futura publicação.

Referências Bibliográficas

- Angiosperm Phylogeny Group (APG). 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society** **161**: 105 - 121.
- 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: 02 Jun. 2016.
- CARDOSO-GUSTAVSON P., ANDREAZZA N. L., SAWAYA A. C. H. F., CASTRO M. M. 2013. Only attract ants? The versatility of petiolar extrafloral nectaries in *Passiflora*. **American Journal of Plant Sciences** 4: 460±469.
- CERVI, A. C. 2006. **O gênero *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950**. Madri.
- CERVI, A. C. 1997. *Passifloraceae* do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. *Fontqueria* 45: 1-92.
- DURKEE, L. T. 1982. The floral and extra-floral nectaries of *Passiflora*. II. The extra-floral Nectary. **American Journal of Botany** **69(9)**. 1420-1428.
- 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.
- FEUILLET, C. P., & MACDOUGAL, J. M. 2003. A new infrageneric classification of *Passiflora*. **Passiflora** 13: 34-38.
- FAHN, A. 1979. **Secretory tissues in plants**. Academic Press Inc, London.
- JÁUREGUI, D., GARCÍA, M., & PÉREZ, D. 2002. Morfoanatomía de las glándulas en cuatro especies de *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) de Venezuela. **Caldasia**24(1), 33–40.
- JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOG, E. A., STEVENS, P. F., DONOGHUE, M. J. 2009. **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, n. 3, p. 692-713.
- LEMOS, R. C. C., SILVA, D. C., & MELO-DE, G. F. A. 2017. A structural review of foliar glands in *Passiflora* L. (Passifloraceae). **PloS ONE** 12, 11, e0187905.
- LEMOS, R. C. C. D. 2017. **Anatomia, ultraestrutura e química das glândulas foliares de *Passiflora* L. (Passifloraceae)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- LÓPEZ-MERUVIA, M. Y., PALACIOS, V., CERVI, A. C. 1993. Anatomia foliar de *Passiflora capsularis* L. (Passifloraceae). **Acta Biológica Paranaense** 22: 34±44.
- MEZZONATO-PIRES, A. C., SALIMENA, F. R. G., & BERNACCI, L. C. 2013. Passifloraceae na Serra Negra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguesia** 64: 123±136.
- NUNES, T. S., QUEIROZ, L. P. 2006. Flora da Bahia: Passifloraceae. *Sitientibus* 6, 194–226.
- PORTER-UTLEY, K. 2014. A revision of *Passiflora* L. subgenus *Decaloba* (DC.) Rchb. supersection *Cieca* (Medik.) J. M. MacDougal & Feuillet (Passifloraceae). **PhytoKeys** 43, 1.
- ROCHA, D. I., DA SILVA, L. C., VALENTE, V. M. M., FRANCINO, D. M. T., MEIRA, R. M. S. A. 2009. Morphoanatomy and development of leaf secretory structures in *Passiflora amethystina* Mikan (Passifloraceae). **Australian Journal of Botany** 57(7), 619-626.
- SILVA, E. O., FEIO, A. C., CARDOSO-GUSTAVSON, P., MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A., DOS SANTOS, J. U. M., DIAS, A. C. A. D. A. 2017. Extrafloral nectaries and plant–insect interactions in *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Brazilian Journal of Botany** 40, 331-340.
- SCHMID, R. 1988. Reproductive versus extra-reproductive nectaries—historical perspective and terminological recommendations. **The Botanical Review**, v. 54, n. 2, p. 179-227.
- SOUZA, V. C., LORENZI, H. 2012. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III*. Ed. 3. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- ULMER, T., & MACDOUGAL, M. J. 2004. ***Passiflora: Passionflowers of the world***. Portland Oregon: Timber Press. 430p.

VANDERPLANK, J. A revision of *Passiflora* section *Dysosmia* Passifloraceae. 2013; Curtis's Botanical Magazine 30(4): 318±387.

WEBER, M. G., & KEELER, K. H. 2013. The phylogenetic distribution of extrafloral nectaries in plants, **Annals of botany** 111, 6, 1251-1261.

Capítulo 1. Nectários extraflorais em *Passiflora* L. são estruturas primariamente homólogas? Uma abordagem ontogenética

Carlos Eduardo Valério Raymundo & Gladys Flavia de A. Melo-de-Pinna

Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277, 05508-090 São Paulo, SP, Brasil

Resumo: Glândulas em *Passiflora* foram estudadas para elucidar as suas possíveis homologias estruturais, com base na ontogenia. Para entender melhor os mecanismos responsáveis pela sua formação, glândulas foliares maduras foram identificadas por testes histoquímicos convencionais e analisadas por meio de microscopia óptica e de varredura. Nossos dados confirmaram que todas as glândulas são nectários extraflorais (NEF's) e apresentam uma grande diversidade morfológica, com diferentes posições na lâmina foliar (dorso-laminar e marginais), no pecíolo e nas estípulas, porém, compartilham a mesma característica anatômica: epiderme secretora, parênquima nectarífero e subnectarífero. Em todas as regiões da folha, os NEF's compartilham características estruturais comuns nos estágios iniciais do desenvolvimento: estabelecimento de uma epiderme em paliçada com divisões anticlinais e uma zona subepidérmica com diferentes planos divisões. Demonstramos que os nectários peciolares não são primariamente homólogos nas espécies estudadas. Ademais, eles apresentam diferentes padrões de desenvolvimento ao longo do eixo longitudinal, bem como os nectários estipulares; podendo ser basípeta ou acrópeta, contudo, sem relação aparente com a zona meristemática do primórdio foliar. Com efeito, essas novas evidências estruturais do desenvolvimento dos nectários extraflorais em *Passiflora* podem ser potencialmente informativas nas relações filogenéticas do grupo.

Palavra-chave: anatomia, desenvolvimento, glândulas foliares.

Introdução

Passifloraceae é a família que apresenta a segunda maior diversidade de nectários extraflorais, registrados em cerca de 450 espécies (Weber & Keller, 2013; Marazzi *et al.*, 2013). Com aproximadamente 560 espécies, *Passiflora* L. é o maior gênero de Passifloraceae, sendo o gênero de angiospermas com o maior número de espécies possuindo NEF's, descritos em cerca 320 espécies (Weber & Keller, 2013).

De acordo com Ulmer & MacDougal (2004), NEF's são registradas em espécies dos quatro subgêneros de *Passiflora* e em 16 superseções. A sua presença é citada por alguns autores como um dos caracteres diagnósticos para o gênero (Cervi, 1997; Ulmer & MacDougal, 2004) e, dependendo da topografia, da densidade e da variação estrutural destas glândulas, podem ser úteis na delimitação de espécies (Nunes & Queiroz, 2006).

Tradicionalmente, os NEF's são referidos como estruturas glandulares que secretam néctar em órgãos não reprodutivos (Fahn, 1979; Schmid, 1988). Os NEF's foram considerados importantes na compreensão das relações taxonômicas e filogenéticas, permitindo, ao longo do tempo, a condução de um melhor sucesso adaptativo em vários grupos de plantas (Weber & Keller, 2013). Com efeito, eles desempenham inúmeras funções, relacionando-se à defesa indireta das plantas, constituindo, desse modo, um importante papel ecológico ao atrair formigas e outros artrópodes, que em seguida protegem as plantas contra insetos herbívoros e predadores de sementes (Fahn, 1979; Weber & Keller, 2013)

Morfologicamente, os NEF's são diversos e incluem estruturas glandulares que diferem consideravelmente em sua localização, tamanho e forma, ocorrendo em uma ampla variedade de táxons (Weber & Keller, 2013). De acordo com Weber & Keeler, (2013) e Marazzi *et al.*, (2013), essas glândulas evoluíram inúmeras vezes e de forma independente, registradas em diversos grupos de plantas, sendo mais frequentes nas angiospermas, em que são descritas em 33 das 65 ordens, em cerca de 110 famílias (Weber *et al.*, 2015)

Apesar da grande diversidade de nectários extraflorais em um amplo grupo de plantas, Weber & Keller (2013) mencionam que muitas dessas glândulas são descritas apenas com dados morfológicos, dessa maneira tais análises impressionantes podem resultar em dados falsos positivos, uma vez que para legitimar estas glândulas como NEF's são

necessários estudos que envolvam, além dos dados morfológicos, caracteres anatômicos, desenvolvimento e identificação dos exsudatos por elas produzidas (Fahn, 1979).

Roth (1968), estudando a morfologia de glândulas em *Passiflora foetida*, concluiu que as mesmas são nectários. Contudo, utilizando técnicas mais acuradas como cromatografia e testes histoquímico (Reação PAS), Durkee *et al.* (1984) confirmaram que as mesmas glândulas cunhadas por Roth (1968) como nectários são, na verdade, glândulas lipofílicas, visto que os exsudatos dessas glândulas secretam compostos lipídicos. Portanto, Durkee *et al.* (*loc.cit*) demonstram que a função de uma glândula não está relacionada à morfologia como proposto por Ulmer & MacDougal (2004), e também que em Passifloraceae são necessários estudos que envolvam a identificação dos exsudatos para a legitimação dessas glândulas como nectários extraflorais.

Em virtude da constante presença dos NEF's em *Passiflora*, diferentes pesquisas levaram a uma série de estudos destas estruturas, destacando a sua morfoanatomia (Jáuregui *et al.*, 2002; Lemos *et al.*, 2017), a sua ultraestrutura (Durke *et al.*, 1981; Durke, 1982; Lemos 2017) e as suas interações ecológicas (Cardoso-Gustavson *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2016). Estudos clássicos em *Passiflora*, como o de Durkee (1982), e mais recente os de Rocha *et al.* (2009) e Cardoso-Gustavson *et al.* (2013) descrevem a atividade dos três tecidos meristemáticos primários (protoderme, meristema fundamental e procâmbio) durante a formação dos NEF's em *P. amethysta*, *P. alata* e *P. edulis*.

Entretanto, diante da grande diversidade das glândulas foliares em *Passiflora*, podemos considerar que os trabalhos em um contexto ontogenético são raros no grupo. Desta forma, no presente estudo descrevemos novas evidências estruturais do desenvolvimento das glândulas em seis espécies de *Passiflora*, buscando estabelecer homologias primárias, seguindo conceito de Pinna (1991), sob a perspectiva ontogenética.

Material e métodos

Foram coletadas glândulas foliares e ápices caulinares de representantes dos subgêneros *Passiflora* (*P. umbilicata* (Griseb.) Harms., *P. serratifolia* L. e *P. seemannii* Griseb.) e *Decaloba* (*P. coriacea* Juss., *P. herbertiana* Ker Gawl. e *P. organensis* Gardner). As amostras foram obtidas de plantas cultivadas na casa de vegetação no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP).

A partir do material coletado, foram analisados aspectos relativos à distribuição, aos padrões morfoanatômicos e histoquímicos, além do desenvolvimento das glândulas foliares. As terminologias adotadas foram baseadas nos estudos de Radford *et al.* (1974) e complementadas com Lemos *et al.* (2017).

Para caracterização morfológica, as glândulas foram fixadas em FAA 50 por 24 horas (Johansen, 1940) e desidratadas em série etanólica crescente, submetidas ao ponto crítico com gás carbônico e metalizadas com ouro (Silveira, 1989). Por fim, os resultados foram analisados e documentados usando microscópio eletrônico de varredura DSM (Zeiss, Oberkochen, Germany) no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IBUSP).

Os ápices caulinares e algumas glândulas maduras foram fixadas em FAA 50 por 24 horas (Johansen 1940), desidratados em série butílica terciária (50-100%) e submetidos à técnica de inclusão em paraplast (Ruzin, 1999). Secções transversais do ápice e longitudinais das glândulas (7-10 μm) foram realizadas em micrótomo rotativo (Reihert-jung Auto Cut 2040), coradas com azul de Astra e safranina, e montadas em lâminas permanentes com bálsamo do Canadá (Gerlach, 1984).

Para verificar a composição das secreções das glândulas foram realizadas análises histoquímicas para os seguintes testes: Reação de PAS (Periodic-Acid-Schiff's (McManus, 1948) para detecção de carboidratos; Vermelho de rutênio para mucilagem ácida (Gregory & Bass, 1989); Lugol para amido (Johansen, 1940); Sudan black B e Sudan IV para lipídios (Pearse, 1985); Azul do nilo para lipídios ácidos e neutros (Cain, 1947); Aniline blue black (Fischer, 1968) para proteínas; Acetato de cobre e ácido rubeânico para ácidos graxos (Ganter & Jollés, 1969); e formalina cloreto férrico para compostos fenólicos (Johansen, 1940). Todos os controles foram realizados para os respectivos testes. Além disso, utilizamos Glicofita Plus para verificar a ocorrência de glicose nos exsudatos das glândulas.

Todas as análises e descrições das lâminas foram realizadas utilizando microscópio Leica DMLB e as imagens foram registradas usando software da Leica IM50.

Resultados

Distribuição e morfoanatomia das glândulas - As glândulas ocorrem em diferentes regiões da folha, como na lâmina, no pecíolo e nas estípulas (Tabela 1). No caso de

glândulas na lâmina foliar, sua distribuição pode ser na face abaxial (denominada dorso-laminares) como em *Passiflora herbertiana*, *P. coriacea* e *P. organensis*, ou como em *P. umblicata*, *P. seemannii* e *P. serratifolia* nas margens (denominada marginais) (Tabela 1). Dentre as espécies que apresentam no pecíolo, *Passiflora serratifolia*, *P. seemannii* têm glândulas ao longo de todo o pecíolo, já em *P. herbertiana* e *P. coriacea* elas ocorrem apenas no ápice do pecíolo, denominados acropéciolares. Nas estípulas, as glândulas estão presentes em *Passiflora serratifolia*, *P. seemannii* e *P. umblicata*, todas ocorrendo apenas nas margens.

As glândulas dorso-laminares encontradas em *P. herbertiana*, *P. coriacea* e *P. organensis* apresentam distribuição por toda a superfície abaxial da lâmina foliar. As glândulas marginais, por sua vez, apresentam diferentes padrões de distribuição: próximo das terminações das nervuras na base da lâmina foliar como em *P. serratifolia* e *P. umblicata*, ou nas margens dos lobos das folhas trilobadas em *P. umblicata* e *P. seemannii* (Tabela 1).

As glândulas dorso-laminares, em vista frontal de *P. organensis* e *P. coriacea* apresentam formato ocelar e encontram-se associadas às nervuras principais, apresentando contornos circulares em *P. organensis* (Figura 1A) e elípticos em *P. coriacea*. Ambas as glândulas são planas, e exibem uma discreta depressão em relação à lâmina foliar, caracterizando-as pelo padrão glandular côncavo ocelar (Tabela 1). Por outro lado, as glândulas dorso-laminares em *P. herbertiana* (Figuras 1B e C) são elevadas, apresentando uma grande saliência, caracterizadas pelo padrão convexo ocelar (Tabela 1), tendo sua superfície revestida por tricomas não secretores (Figura 1B).

P. umblicata (Figura 1D) e *P. serratifolia* (Figuras 1E) apresentam glândulas marginais elevadas, sésseis e circulares com região secretora convexa, caracterizadas pelo padrão lenticular (Tabela 1). Em *P. umblicata* a superfície da glândula é glabra (Figura 1D), enquanto que em *P. serratifolia* a superfície é revestida por tricomas não secretores (Figura 1E). Um segundo padrão é encontrado nas glândulas marginais: em *P. seemannii* essas glândulas são sésseis do tipo elíptico-lenticular à semi-esferóide, sendo circulares e convexas, com superfície glabra (Figura 1F).

Todas as glândulas peciolares são elevadas, em *Passiflora serratifolia* apresentam um pedúnculo alongado e uma superfície secretora com padrão obcônica (Figura 2A) (Tabela 1). *P. coriacea* e *P. seemannii*, apresentam glândulas com padrão cotiliforme (Figuras 2B, D) contudo, em *P. coriacea*, as glândulas apresentam um pedúnculo menor

em relação ao de *P. seemannii*, que é mais alongado (Figura 2D). Nesse formato, as glândulas possuem uma região central profunda, onde o exsudato pode se acumular na fase secretora. Em *P. herbertiana* as glândulas peciolares têm um padrão elipítico-pateliforme caracterizado por apresentar uma depressão na região central da superfície secretora (Figura 2C). Em relação à superfície, essas glândulas são glabras em *P. coriacea* e *P. seemannii* (Figuras 2B, D), em contrapartida, *P. serratifolia* e *P. herbertiana* são pilosas, com tricomas não secretores revestindo toda a superfície (Figuras 2A, C).

Nas estípulas, as glândulas estão presentes apenas em *P. umblicata*, *P. seemannii* e *P. serratifolia*, em que são encontradas exclusivamente na margem da lâmina, as quais estão dispostas ao longo de toda a margem em *P. serratifolia*, enquanto que em *P. seemannii* e *P. umblicata*, ocorrem na região mediana e na base (Tabela 1). Em relação à forma, as glândulas estipulares das três espécies são elevadas, variando apenas quanto ao tipo: em *P. umblicata* são lenticulares, e em *P. seemannii* e *P. serratifolia* são elipítico-lenticular e elíptico-lenticular à semi-esferóide (Figura 1G-I), respectivamente.

Anatomicamente, as glândulas dorso-laminares, marginais, peciolares e estipulares são semelhantes em todas as espécies analisadas. Todas apresentam uma epiderme secretora revestida por uma fina camada de cutícula (Figuras 3A, D, F). A epiderme secretora se organiza em paliçádica, composta por camadas de células parenquimáticas bisseriadas (Figuras 3D, E, G) à multisseriadas (Figuras 3B, C, F, H). Em secção longitudinal das glândulas, essas células são isodiamétricas (Figuras 3A, B), ou alongadas (Figuras 3I e J), sendo justapostas com paredes finas e citoplasma denso.

Interno à epiderme secretora, a região subepidérmica compreende uma porção de parênquima secretor e não-secretor, consecutivamente. Na maioria das espécies a delimitação entre o parênquima secretor e não-secretor não está bem estabelecida, à exceção das glândulas peciolares e marginais em *P. seemannii* (Figuras 3F, I). O tecido subepidérmico secretor é constituído por células poligonais planas e volumosas, densamente coradas e com paredes mais espessas. O parênquima não-secretor é formado por células isodiamétricas e feixes vasculares colaterais (Figuras 3E-G). A partir de regiões mais internas do tecido subepidérmico secretor, ocorrem idioblastos contendo drusas (Figuras 3B, F, G, J).

Tabela 1. Principais caracteres estudados nas glândulas foliares de *Passiflora* L. – Caráter não observado.

Táxon	Espécies	Estruturas secretoras					
		Distribuição		Formato das glândulas maduras		Desenvolvimento	
		Ocorrência	Posição	Tipo glandular	Padrão glandular	Origem	Diferenciação
<i>Subgênero Passiflora</i>	<i>P. umblicata</i>	Lâmina	Marginal	Elevado	Lenticular	Margem próximo base da lâmina e entre os lobos	—
		Estípula	Marginal	Elevado	Lenticular	Borda (sentido distal)	Acrópeta
	<i>P. serratifolia</i>	Pecíolo	Ao longo do pecíolo	Elevado	Obcônica	Interseção ada/abaxial	Acrópeta
		Lâmina	Marginal	Elevado	Lenticular	Ao longo da margem	Acrópeta
		Estípula	Marginal	Elevado	Elíptico-lenticular	Ambas as bordas	Basípeta
	<i>P. seemannii</i>	Pecíolo	Ao longo do pecíolo	Elevado	Cotiliforme	Interseção ada/abaxial	Basípeta
		Lâmina	Marginal	Plano	Elíptico-lenticular à semi-esferóide	Margem entre os lobos	—
		Estípula	Marginal	Elevado	Elíptico-lenticular à semi-esferóide	Margem (sentido proximal)	Acrópeta
	<i>Subgênero Decaloba</i>	<i>P. coriacea</i>	Pecíolo	Acropeciolar	Elevado	Cotiliforme	Interseção ada/abaxial
Lâmina			Dorso-laminar	Plano	Côncavo ocelar	Nervuras secundárias	—
<i>P. herbertiana</i>		Pecíolo	Acropeciolar	Elevado	Elipítico-Pateliforme	Identidade Abaxial	—
	Lâmina	Dorso-laminar	Elevado	Covexo ocelar	Nervuras secundárias	—	
<i>P. organensis</i>	Lâmina	Dorso-laminar	Plano	Côncavo ocelar	Nervuras primárias	—	

Análises das secreções - Os exsudatos produzidos pelas glândulas acumulam-se sobre a própria glândula bem como na parte côncava da estrutura, apresentando uma secreção translúcida (Figuras 4A, B). Com o uso da Glicofita, foi detectada a presença de glicose nos exsudatos das glândulas em todas as plantas analisadas (Figura 4C).

Os testes histoquímicos realizados mostram resultados positivos para a presença de compostos hidrofílicos nas células da epiderme secretora, como carboidratos, mucilagem ácidas e proteínas, evidenciados pelo teste de PAS (Figuras 4D-F), aniline blue black (Figura 4G), e Vermelho de rutênio (Figura 4H), respectivamente. Em todas as espécies, os resultados foram negativos para substâncias hidrofóbicas (Figura 4I).

Ontogênese das glândulas - Sob microscopia eletrônica de varredura, observamos que as glândulas se desenvolvem assincronicamente (Figura 5). O sentido da diferenciação das glândulas varia dentre as regiões da folha: as glândulas peciolares e marginais em *P. serratifolia* apresentam desenvolvimento acrópeto, isto é, da base para o ápice (Figuras 5A-B, Tabela 1), enquanto nas glândulas estipulares o sentido é inverso, ou seja, basípeto (Figuras 5C-D, Tabela 1). Já as glândulas estipulares de *P. umblicata* e *P. seemannii* apresentam desenvolvimento acrópeto (Figuras 5E-F).

O desenvolvimento das glândulas dorso-laminares surge a partir do quinto plastocrono -p5. Nesse estágio os primórdios foliares já estão no processo de expansão e crescimento marginal (Figura 6A). A primeira evidência estrutural é a diferenciação das células epidérmicas com aspecto paliçada. Esta fase é marcada por diferentes padrões de divisões das células na região subepidérmica, as quais apresentam citoplasma denso (Figura 6B).

As glândulas surgem na face abaxial entre as nervuras centrais e secundárias (Figuras 6C e D), formando uma protuberância. Conforme a atividade do meristema em placa no processo de expansão e aumento da espessura do mesofilo, a diferença entre a região da glândula se reduz, equiparando-se à das demais células epidérmicas da lâmina foliar, formando as glândulas planas em *P. coriacea* e *P. organensis* (ver glândula madura nas figuras 3A e B). Já nas glândulas dorso-laminares elevadas em *P. herbetiana* a região subepidérmica apresenta um maior crescimento, tornando a superfície da glândula mais elevada em relação à epiderme da lâmina foliar (glândula do tipo elevado, ver figura 3C).

A partir do p8 as glândulas dorso-laminares estão estruturalmente diferenciadas. Conforme a lâmina do primórdio foliar se expande, novas glândulas surgem entre as nervuras (Figuras 6C e D). Em *P. organensis* elas surgem logo no início da expansão centro-lateral da lâmina foliar, na base entre as nervuras principais (Figura 6A). Em contrapartida, em *P. hebertiana* e *P. coriacea*, as glândulas surgem em estágios posteriores da expansão da lâmina, entre as nervuras secundárias (Figuras 6D e E). Desde os primeiros estágios da ontogênese das glândulas dorso-laminares já é possível observar a presença de cristais na região subepidérmica, mesmo antes da completa diferenciação do mesofilo (Figura 6E). Em relação às glândulas marginais, não observamos a sua diferenciação histológica em nenhum dos primórdios foliares.

As glândulas peciolares iniciam sua formação a partir do p6. Os estágios iniciais de desenvolvimento são caracterizados pela proliferação celular na região lateral do pecíolo e por sucessivas divisões e alongamentos celulares, de modo que essa região se expande, formando uma protuberância (Figuras 7A; 8A). Em fases posteriores são observadas células epidérmicas em forma paliçada e, internamente, um conjunto de células da região subepidérmica com conteúdo densamente corado, apresentando diferentes padrões de divisões celulares (Figuras 7B; 8A), semelhante às glândulas dorso-laminares (Figura 6). A partir do p11 as glândulas estão totalmente diferenciadas (Figuras 7C-E; 8B, D, E), apresentando histologicamente uma epiderme bisseriada com cutícula distendida, células mais justapostas na camada interna na região subepidérmica, além de feixes vasculares (Figuras 7C; 8B). O resultado final é um par de glândulas opostas no ápice do pecíolo, no caso de *P. coriacea* e *P. hebertiana* (Figuras 7C e 8B, D), e ao longo do pecíolo em *P. serratifolia* e *P. seemannii* (Tabela 1). Apesar de apresentarem um padrão similar de desenvolvimento, as glândulas em *P. coriacea*, *P. seemannii* e *P. serratifolia* surgem na interseção adaxial/abaxial do pecíolo (Figura 7B) enquanto em *P. hebertiana* a glândula se desenvolve no domínio abaxial (Figuras 8B e C).

As glândulas estipulares se formam rapidamente, desde os primeiros plastocronos (Figura 9A). O crescimento marginal tem um curto período de atividade mitótica nas estipulas de *P. serratifolia* (Figura 9) e *P. seemannii*. Esse crescimento marginal é uniforme em ambos os flancos, cessando sua atividade na formação das glândulas. Em *P. serratifolia* as glândulas surgem no p2, onde observamos a formação de uma protuberância nas margens das estipulas (Figura 9B). A partir do p3 as glândulas já começam a se diferenciar e tornam-se totalmente maduras no p4 (Figuras 9C-F). Nessa

fase as glândulas estão totalmente desenvolvidas, apresentando uma epiderme em paliçada, com uma cutícula distendida e uma região de parênquima subepidérmico (Figura 9F), característico de uma glândula madura. Por outro lado, em *P. umblicata*, o crescimento marginal tem um longo período de atividade: as glândulas surgem a partir do p8 e completam a diferenciação no p10 (Figuras 10A-D).

Discussão

Diversidade, morfoanatomia e o seu significado taxonômico das glândulas

A revisão mais compreensível da morfologia e da anatomia de glândulas extraflorais em *Passiflora* foi proposta por Lemos *et al.* (2017). Neste trabalho, as autoras propõem duas categorias de glândulas no grupo: glândulas tipo I definidas como nectários, podendo apresentar dois padrões: elevados e planos; e glândulas tipo II, representadas pelas glândulas de resina, unicamente com padrão elevado.

No presente trabalho, com base nos dados obtidos pela morfoanatomia, histoquímica e desenvolvimento, todas as glândulas descritas para as espécies estudadas são consideradas como nectários extraflorais (NEF's). Os testes histoquímicos evidenciaram a presença de carboidratos, além de outras substâncias hidrofílicas, entre elas a presença de mucilagens ácidas e proteínas. Semelhante ao observado por Lemos (2017) em outras espécies de *Passiflora*, essas secreções foram localizadas tanto na epiderme quanto no parênquima secretor, e no espaço subcuticular, por onde o exsudato se acumula.

O subgênero *Passiflora* é a linhagem mais diversificada em relação aos nectários dentro da família Passifloraceae (Krosnick *et al.*, 2013), cujas glândulas são encontradas na lâmina foliar, pecíolo, estípulas, brácteas e/ou sépalas. De acordo com os autores, as espécies do subgênero *Decaloba* as apresentam apenas no pecíolo e na lâmina foliar. No presente estudo os três representantes do subgênero *Decaloba* ocorrem nectários na lâmina e no pecíolo, enquanto que as espécies do subgênero *Passiflora* apresentam nectários também nas estípulas, além das duas regiões citadas acima. Os nectários foram observados em diversas localidades nas folhas, variando desde ao longo do pecíolo, ou apenas no seu ápice, nas margens da base da lâmina foliar ou entre os lobos, dispersos na lâmina foliar e também nas margens das estípulas.

De acordo com a classificação proposta por Lemos *et al.* (2017), os nectários peciolares nas espécies estudadas neste presente trabalho são todos agrupados dentro dos elevados, sendo do tipo elíptico-pateliforme, cotiliforme ou obcônica. Por outro lado, os nectários laminares podem ser do tipo plano, côncavo-ocelar, ou elevado convexo ocelar.

Todos os NEF's laminares observados nas seis espécies estudadas ocorrem na superfície abaxial e, de acordo Paiva & Machado (2006), este padrão de distribuição das glândulas laminares contribui para a redução de néctar pela evaporação, aumentando concomitantemente a disponibilidade para os agentes protetores, como, por exemplo, as formigas. Semelhante aos nectários dorso-laminares, os nectários marginais estão classificados como elevados, apresentando forma lenticular; e planos, como elíptico-lenticular para semi-esferoide. Em relação aos nectários estipulares, são todos elevados, com formato lenticular e elíptico-lenticular à semi-esferoide.

Apesar da diversidade morfológica, anatomicamente os nectários apresentam as mesmas características. Todos são estruturais, segundo a definição de Fahn (1979), isto é, apresentam uma diferenciação em epiderme paliçádica e um parênquima nectarífero e subnectarífero. Estes caracteres anatômicos descritos no presente estudo têm sido registrados em outras espécies dentro do gênero *Passiflora* (Durkee, 1981; Jáuregui *et al.*, 2002; Rocha, *et al.*, 2009; Cardoso-Gustavson *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2016; Lemos *et al.*, 2017). Ademais, ocorrem também em diversas famílias como Salicaceae (Thadeo *et al.*, 2008); Fabaceae (Melo *et al.*, 2010) e Euphorbiaceae (Vitarelli *et al.*, 2015). Tais indícios mostram que a anatomia dos nectários extraflorais é um caráter bastante conservado em diferentes grupos. Segundo Weber & Keeler (2013), esse padrão anatômico similar pode ser em resposta à pressão seletiva comum, visto que essas glândulas evoluíram de forma convergente.

Desenvolvimento das glândulas: Basípeta x Acrópeta

O desenvolvimento dos nectários, tanto peciolares quanto estipulares, em *Passiflora serratifolia*, diferencia-se assincronicamente do eixo próximo-distal dos pecíolos e das estípulas e, segundo Cardoso-Gustavson (2010), esta disposição observada em *P. alata* e *P. edulis*, disponibiliza néctar por um longo período de tempo. Portanto, essa assincronia no desenvolvimento das glândulas em diferentes regiões da folha tem sido um mecanismo conservado entre as espécies de *Passiflora*.

Observações dos padrões de desenvolvimento dos nectários estipulares em *P. umblicata*, *P. seemannii* e *P. serratifolia*, demonstram que as glândulas apresentam dois processos distintos ao longo do eixo próximo-distal: em *P. umblicata* e *P. seemannii*, os nectários tem um desenvolvimento acrópeto, isto é, os mais desenvolvidos ocorrem na base da lâmina foliar da estípula. Observações semelhantes são descritas em *Passiflora alata* por Cardoso-Gustavson (2010). No entanto, em *P. serratifolia* o desenvolvimento dos nectários ocorre do ápice para a base (basípeto). Os padrões de desenvolvimento também divergem no pecíolo, entre as espécies analisadas, sendo acrópeto em *P. serratifolia* e basípeto em *P. seemannii*.

Divergências no padrão de desenvolvimento são relatados por Tsukaya (2014) em folhas compostas, as quais podem ter folíolos com desenvolvimento basípeto ou acrópeto. De acordo com o autor, os mecanismos envolvidos nesta mudança de polaridade do crescimento em folhas compostas ainda não são bem esclarecidos. Considerando que em *Arabidopsis* a zona meristemática do primórdio foliar está localizada na junção entre a lâmina foliar e o pecíolo (Ichihashi *et al.*, 2011), espera-se que o desenvolvimento das glândulas no eixo longitudinal do pecíolo seja acrópeto, o que seria corroborado em *P. serratifolia*. No entanto, esta inversão de polaridade em *P. seemannii* pode estar envolvida em uma alteração do mecanismo regulador da zona meristemática do primórdio foliar.

Em nosso trabalho constatamos que os nectários peciolares apresentam o mesmo padrão de desenvolvimento em todas as espécies, entretanto, com base nas regiões de crescimento eles apresentam origens diferentes, em relação a polaridade adaxial-abaxial do primórdio foliar. Em *P. seemannii*, *P. serratifolia* e *P. coriacea* os nectários peciolares se desenvolvem na interface entre os dois domínios adaxial e abaxial. Importante salientar que nesta região o primórdio foliar inicia o seu processo de expansão da lâmina em resposta à atividade do crescimento marginal (Dengler & Tsukaya, 2001). Outro padrão foi encontrado nos nectários peciolares em *P. hebertiana*, onde nesta espécie os nectários se desenvolvem no domínio abaxial do pecíolo. A partir deste estudo, concluímos que os nectários peciolares diferem quanto a sua origem ontogenética, sendo marginais em *P. seemannii*, *P. serratifolia* e *P. coriacea*, enquanto que em *P. hebertiana* eles têm identidade abaxial.

Já em relação às estípulas, onde o desenvolvimento dos nectários é marginal e está envolvido na atividade do crescimento marginal da lâmina, não se pode inferir uma

relação entre a polaridade longitudinal da folha e o desenvolvimento dos nectários, uma vez que o crescimento marginal é, de modo geral, uniforme ao longo do plano centro-lateral do primórdio foliar. No caso das espécies estudadas ainda não é possível estabelecer qualquer relação com o crescimento marginal, pois *P. serratifolia* apresenta uma curta atividade marginal e diferenciação dos nectários basípeta; *P. seemannii* também apresenta curta atividade marginal, mas com diferenciação acrópeta, semelhante ao observado em *P. umblicata*, que tem uma atividade meristemática marginal mais duradora que as duas espécies citadas.

Padrões ontogenéticos e diferenciação das glândulas

Independente da região onde os nectários extraflorais originam-se, neste trabalho, descrevemos dois caracteres estruturais sinalizando o local do seu desenvolvimento: estabelecimento de uma epiderme em paliçada oriunda de divisões principalmente anticlinais da protoderme e uma região subepidérmica caracterizada por diferentes padrões de divisão celular.

Tal origem e organização estrutural dessa região nos remete a teoria túnica-corpo do meristema apical caulinar (MAC). A túnica é composta por uma ou mais camadas de células periféricas, que se dividem em planos perpendiculares à superfície do MAC (divisões anticlinais); e por um corpo, formado por várias camadas de células que se dividem em vários planos (Esau, 1965). Contudo, não estamos fazendo uma analogia do desenvolvimento dos nectários com o MAC, pois o MAC tem crescimento indeterminado, já as células meristemáticas formadoras dos nectários apresentam um curto período de atividade mitótica. De todo modo, há uma similaridade entre os padrões de divisões da camada externa do nectário (epiderme nectarífera) e a região subepidérmica com a camada da túnica e do corpo presentes no MAC.

Alguns autores denominaram as camadas formadoras dos nectários como “Meristema nectarífero” (Dave & Patel, 1975; Subramaniam & Inamdar, 1985). Dave & Patel (1975) foram um dos primeiros a adotarem este termo com base no desenvolvimento de nectários em *Pedilanthus tithymaloides* (Euphorbiaceae), visto que essas células possuem núcleos grandes e citoplasma densamente corados, ou seja, apresentam características meristemáticas. Subramaniam & Inambar, (1985), além de compartilharem este termo, observaram que um grupo de células derivadas, tanto da

epiderme quanto de camadas subepidérmicas, atuam como “iniciais nectaríferas” em *Kigelia pinnata* (Bignoniaceae). Ademais, os autores constataram que, primeiramente, as iniciais epidérmicas se dividem apenas anticlinalmente e, em estágios posteriores, periclinalmente; já as iniciais subepidérmicas se dividem em diferentes planos. Tal descrição se assemelha ao observado em todas as glândulas analisadas neste presente estudo.

Apesar destes trabalhos utilizarem o termo “Meristema nectarífero” na formação dos nectários, em nosso estudo observamos que o desenvolvimento dessas glândulas é um produto do processo de expansão do primórdio foliar em virtude das diferentes regiões de crescimento formadoras das folhas. Os nectários dorso-laminares nas espécies de *Passiflora* estudadas originam-se durante a expansão da lâmina foliar, período este que compreende a terceira fase da morfogênese foliar. De acordo com Dengler & Tsukaya (2001), neste estágio ocorre o aumento da área superficial e volume do primórdio foliar. Outro aspecto relevante na ontogênese dos nectários dorso-laminares são que estes iniciam o seu processo de desenvolvimento e se tornam totalmente diferenciados antes da expansão foliar e da diferenciação do mesófilo em parênquima paliçádico e lacunoso. Arbor (1972) e Subramanian & Inamdar (1985) registraram resultados similares a partir de seus estudos com nectários laminares em *Byttneria filipes* (Sterculiaceae) e *Kigelia pinnata* (Bignoniaceae), respectivamente. Esses autores verificaram que a formação dos nectários é extremamente precoce nas folhas e que eles estão funcionalmente maduros antes da expansão foliar. O mesmo foi observado em *Passiflora amethystina*, Rocha *et al.* (2009), e *P. edulis* e *P. alata* por Cardoso-Gustavson (2010): tais autores verificaram uma situação similar, em que os nectários peciolares e laminares iniciam sua atividade secretora antes mesmo da total expansão da lâmina foliar.

Em resumo, nosso estudo trouxe novas evidências estruturais no desenvolvimento dessas glândulas, a partir das quais sugerimos que, sob o aspecto ontogenético, os nectários peciolares de *P. herbertiana* não são primariamente homólogos aos nectários peciolares de *P. coriacea*, *P. seemannii* e *P. serratifolia*, pois, na primeira, os nectários surgem no domínio abaxial, enquanto que nas outras três espécies, o desenvolvimento ocorre na interseção adaxial/abaxial. Adicionalmente, os nectários apresentam diferentes padrões de diferenciação no eixo longitudinal, podendo ser basípeta ou acrópeta, sem relação aparente com a zona meristemática do primórdio foliar. Embora tais caracteres sinalizem uma potencial informação, a evolução no grupo e as suas implicações

filogenéticas só poderão ser compreendidas com mais estudos semelhantes ao do presente trabalho.

Referências Bibliográficas

- ARBO, M. M. 1972. Estructura y ontogenia de los nectarios foliares del género *Byttneria* (Sterculiaceae). **Darwiniana**, p. 104-158, 1972.
- BERNACCI, L. C., CERVI, A. C., MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A., NUNES, T. S., IMIG, D. C., MEZZONATO, A. C. 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: 02 Jun. 2016.
- CAIN, A. J. 1947. The use of Nile blue in the examination of lipids. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 88: 383-392.
- CARDOSO-GUSTAVSON, 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.
- CARDOSO-GUSTAVSON, P., ANDREAZZA N. L., SAWAYA, A. C. H. F., CASTRO, M. M. 2013. Only attract ants? The versatility of petiolar extrafloral nectaries in *Passiflora*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, n. 02, p. 460.
- CERVI, A. C. 1997. *Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero Passiflora L., subgênero Passiflora*. **Cyanus**.
- COUTINHO, Í. A. C., VALENTE, V. M. M., & MEIRA, R. M. S. A. 2010. Ontogenetic, anatomical and histochemical study of the extrafloral nectaries of *Sapium biglandulosum* (Euphorbiaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 58, n. 3, p. 224-232.
- DAVE, Y. S., & PATEL, N. D. 1975. A development study of extrafloral nectaries in Slipper Spurge (*Pedilanthus tithymaloides*, Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, 808-812.
- DENGLER, N. G. & TSUKAYA, H. 2001. Leaf morphogenesis in dicotyledons: current issues. **International Journal of Plant Sciences**, v. 162, n. 3, p. 459-464.
- DURKEE, L. T. 1982. The Floral and Extra-Floral Nectaries of *Passiflora*. II. The Extra-Floral Nectary. **American Journal of Botany**, 1420-1428.
- 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., BAIRD, C. W. & COHEN, P. F. 1984. Light and electron microscopy of the resin glands of *Passiflora foetida* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**, 596-602.
- ESAU, K. 1965. **Plant anatomy**. Ed.2. 762p.
- FAHN, A. 1979. **Secretory tissues in plants**. Academic Press Inc, London.
- FISHER, D. B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* 16:92-96.
- GANTER, P. & JOLLÉS, G. 1969. *Histochimie normale et pathologique*, vol1. Gauthier-Villars, Paris.
- GERLACH, D. 1984. *Botanische Mikrotechnik: eine Einführung*. Thieme, Stuttgart.
- GREGORY, M., & BAAS, P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. **Israel Journal of Botany** 38: 125-174.
- ICHIHASHI, Y., KAWADE, K., USAMI, T., HORIGUCHI, G., TAKAHASHI, T., TSUKAYA, H. 2011. Key proliferative activity in the junction between the leaf blade and the leaf petiole of *Arabidopsis thaliana*. **Plant physiology**, v. 157, n. 3, p. 1151-1162.
- JÁUREGUI, D., GARCÍA, M. & PÉREZ, D. 2002. Morfoanatomía de las glándulas en cuatro especies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) de Venezuela. **Caldasia**, 33-40.
- JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book.
- 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, n. 3, p. 692-713.
- LEMOS, R. C. C., DA COSTA SILVA, D., & DE ALBUQUERQUE MELO-DE, G. F. 2017. A structural review of foliar glands in *Passiflora* L. (Passifloraceae). **PLoS one**, v. 12, n. 11, p. e0187905.
- LEMOS, R. C. C. D. 2017. **Anatomia, ultraestrutura e química das glândulas foliares de *Passiflora* L. (Passifloraceae)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- McMANUS, J. F. A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* 23:99-108
- MARAZZI, B., BRONSTEIN, J. L., & KOPTUR, S. 2013. The diversity, ecology and evolution of extrafloral nectaries: current perspectives and future challenges. **Annals of Botany**, v. 111, n. 6, p. 1243-1250.

- MELO, Y., MACHADO, S. R., & ALVES, M. 2010. Anatomy of extrafloral nectaries in Fabaceae from dry-seasonal forest in Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 163, n. 1, p. 87-98.
- NUNES, T. S., & QUEIROZ, L. P. 2006. Flora da Bahia: Passifloraceae. *Sitentibus* 6, 194–226.
- PAIVA, E. A. S., & MACHADO, S. R. 2006. Ontogênese, anatomia e ultra-estrutura dos nectários extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Acta Botanica Brasilica**, 471-482.
- PEARSE, A. G. E. 1985. Histochemistry theoretical and applies. Vol. 2. C. Livingstone, Edinburg. 624
- PORTER-UTLEY, K. 2014. A revision of *Passiflora* L. subgenus *Decaloba* (DC.) Rchb. supersection *Cieca* (Medik.) J. M. MacDougal & Feuillet (Passifloraceae). **PhytoKeys**, n. 43, p. 1. <http://doi.org/10.3897/phytokeys.43.7804>.
- PINNA, M. C. 1991. Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. **Cladistics**, v. 7, n. 4, p. 367-394, 1991.
- RADFORD, A. E., DICKISON, W. C., MASSEY, J. R., BELL, C. R. 1974. Vascular Plant Systematics. Harper & Row Publishers, New York.
- ROCHA, D. I., DA SILVA, L. C., VALENTE, V. M. M., FRANCINO, D. M. T., MEIRA, R. M. S. A. 2010. Morphoanatomy and development of leaf secretory structures in *Passiflora amethystina* Mikan (Passifloraceae). **Australian Journal of Botany**, v. 57, n. 7, p. 619-626.
- ROTH, I. 1968. Desarrollo de los nectarios extraflorales en *Passiflora foetida* L. **Acta Biologica Venezuelica**, v. 6, n. 3-4, p. 44-9, 1968.
- RUZIN, S. E. 1999. **Plant Microtechnique and Microscopy**. Oxford University Press, New York.
- SILVA, E. O., FEIO, A. C., CARDOSO-GUSTAVSON, P., MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A., DOS SANTOS, J. U. M., DIAS, A. C. A. D. A. 2017. Extrafloral nectaries and plant–insect interactions in *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 40, n. 1, p. 331-340.
- SILVEIRA, M. 1989. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: Souza W. (editor). Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica. v.1. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, Rio de Janeiro.
- SCHMID, R. 1988. Reproductive versus extra-reproductive nectaries—historical perspective and terminological recommendations. **The Botanical Review**, v. 54, n. 2, p. 179-227.

- SUBRAMANIAN, R. B., & INAMDAR, J. A. 1985. Occurrence, structure, ontogeny and biology of nectaries in *Kigelia pinnata* DC. **The botanical magazine Shokubutsu-gaku-zasshi**, v. 98, n. 1, p. 67-73.
- THADEO, M., CASSINO, M. F., VITARELLI, N. C., AZEVEDO, A. A., ARAÚJO, J. M., VALENTE, V. M., MEIRA, R. M. 2008. Anatomical and histochemical characterization of extrafloral nectaries of *Prockia crucis* (Salicaceae). **American Journal of Botany**, v. 95, n. 12, p. 1515-1522.
- TSUKAYA, H. 2014. Comparative leaf development in angiosperms. **Current opinion in plant biology**, v. 17, p. 103-109, 2014.
- ULMER, T., & MACDOUGAL, M. J. 2004. **Passiflora: Passionflowers of the world**. Timber Press, Inc., Portland.
- VITARELLI, N. C., RIINA, R., CARUZO, M. B. R., CORDEIRO, I., FUERTES-AGUILAR, J., MEIRA, R. M. 2015. Foliar secretory structures in *Crotoneae* (Euphorbiaceae): Diversity, anatomy, and evolutionary significance. **American journal of botany**, v. 102, n. 6, p. 833-847.
- WEBER, M. G., & KEELER, K. H. 2013. The phylogenetic distribution of extrafloral nectaries in plants, **Annals of botany**, 111, n. 6, p. 1251-1261.
- WEBER, M. G., PORTURAS, L. D., & KEELER, K. H. 2015. World list of plants with extrafloral nectaries. www.extrafloralnectaries.org. [Acesso, 28/01/2018].

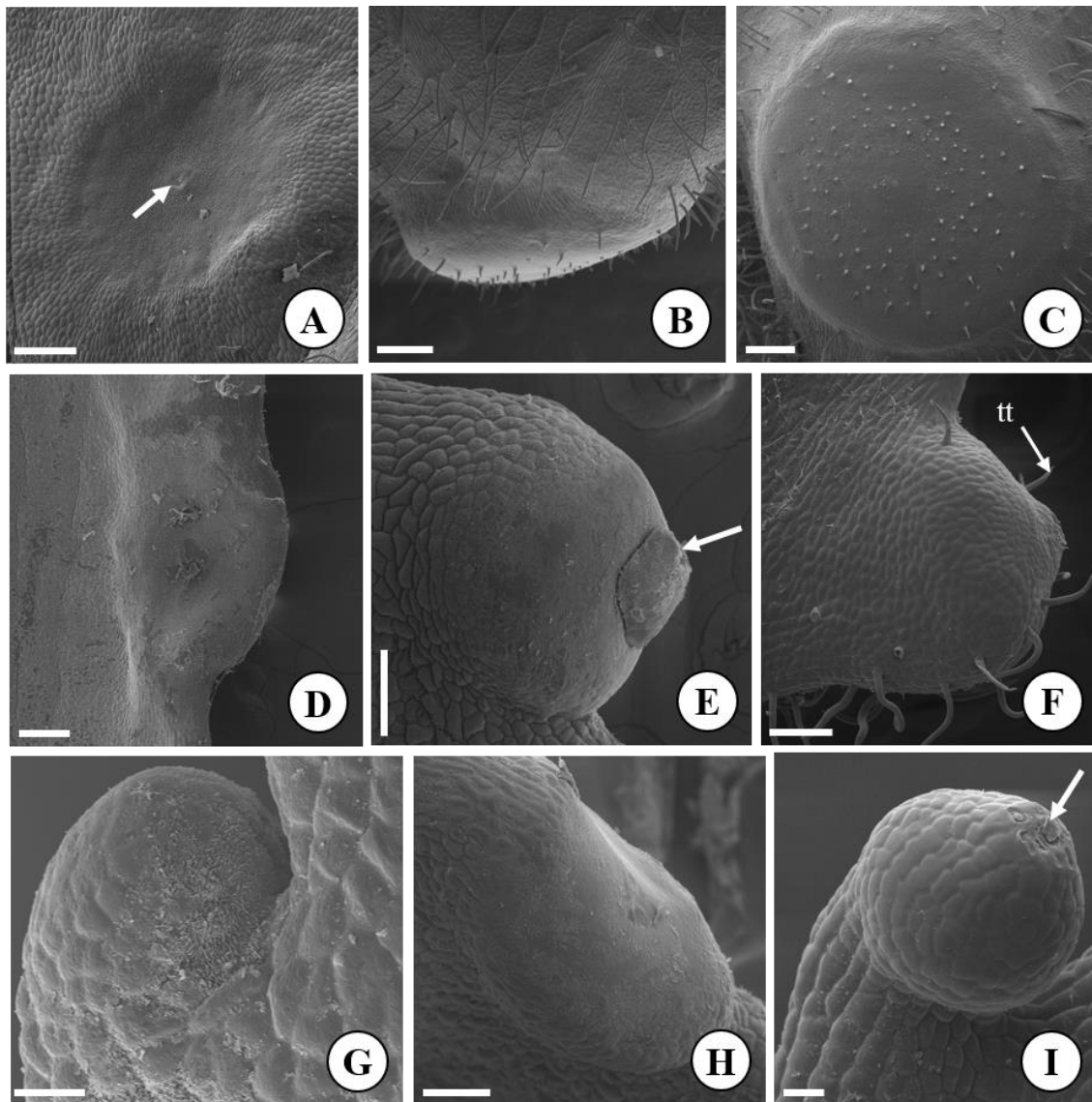


Figura 1. Glândulas foliares observadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando diferentes tipos: dorso-laminares (A-C), marginais (D-F) e estipulares (G-I) em *Passiflora*. **A**, aspecto da morfologia geral da glândula dorso-laminar plana em *P. organensis* (seta) indicando a porção secretora, por onde o exsudato é liberado. **B**- Vista lateral da glândula elevada com superfície secretora côncava, e presença de tricomas tectores em *P. herbertiana*. **C**- Detalhe da vista frontal da glândula anterior. **D**- Morfologia da glândula marginal plana do tipo elipítico-lenticular à semi esferóide em *P. semannii*. **E** e **F**- Glândulas marginais elevadas com padrões lenticulares em *P. umblicata* e *P. serratifolia*, respectivamente. **E**- Glândula com superfície glabra e seta indicando cutícula distendida. **F**- Superfície revestida por tricomas tectores. **G-I**- Morfologia das glândulas estipulares elevadas em *P. umblicata* (**G**), *P. semannii* (**H**) e *P. serratifolia* (**I**), seta indicando região central da glândula por onde o exsudato é liberado. Legenda: tt= tricomas tectores. Barras de escala: **A, C, F, G, H, I**=200 μ m; **B**= 20 μ m; **D**= 500 μ m; **E**= 100 μ m.

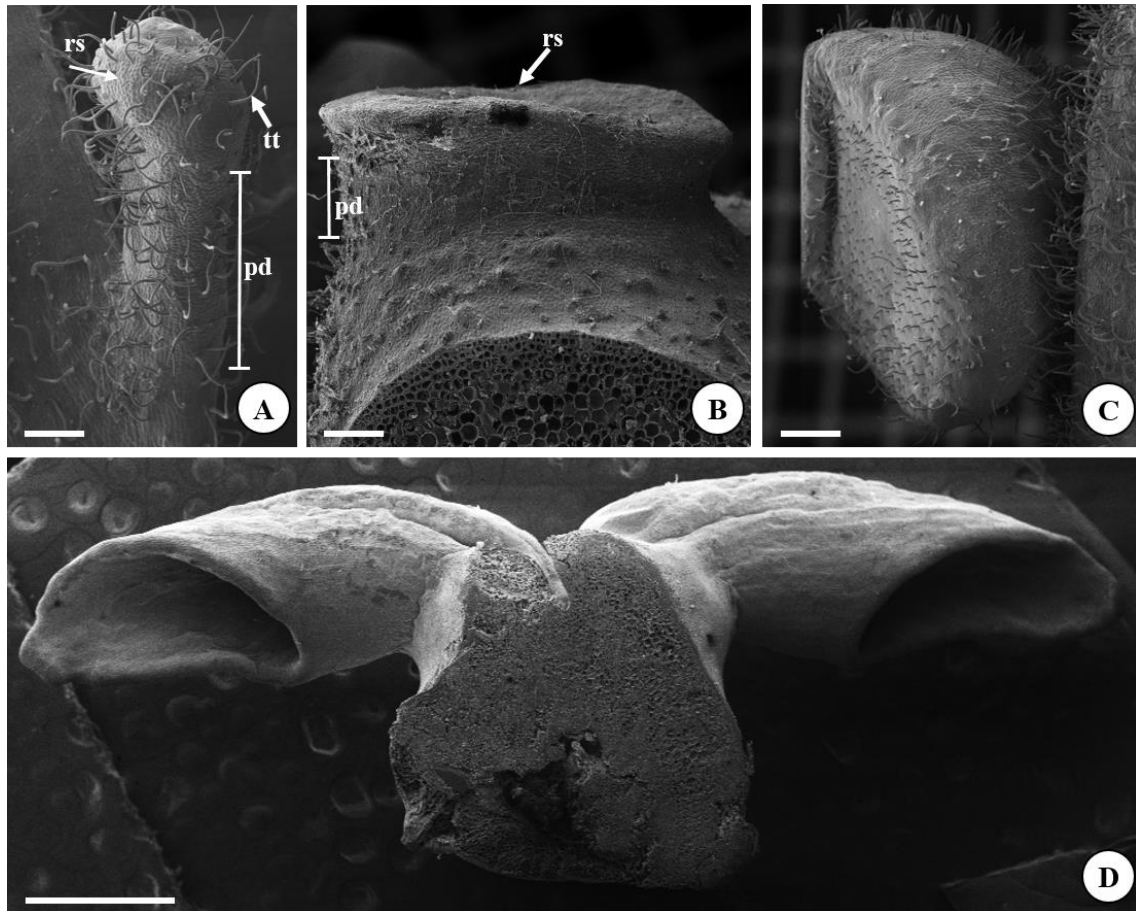


Figura 2. Aspecto geral da morfologia das glândulas peciolares elevadas em *Passiflora* sob MEV. **A** - Glândula peciolar em *P. serratifolia* com pedúnculo alongado e uma porção apical esferóide, com tricomas tectores revestindo toda a superfície. **B** - Glândula em *P. coriacea* com pedúnculo curto, porção apical côncava e superfície glabra, com padrão glandular do tipo cotiliforme. **C** - Glândula peciolar em *P. herbertiana* com padrão glandular elipítico-pateliforme apresentando superfície convexa, sendo revestida por tricomas tectores. **D** - Glândula peciolar em *P. semanii* com padrão cotiliforme. Legenda: pd= pedúnculo; rs= região secretora. Barras: **A**= 1 mm; **B**= 500 μ m **C**= 200 μ m; **D**= 100 μ m; **E**= 50 μ m.

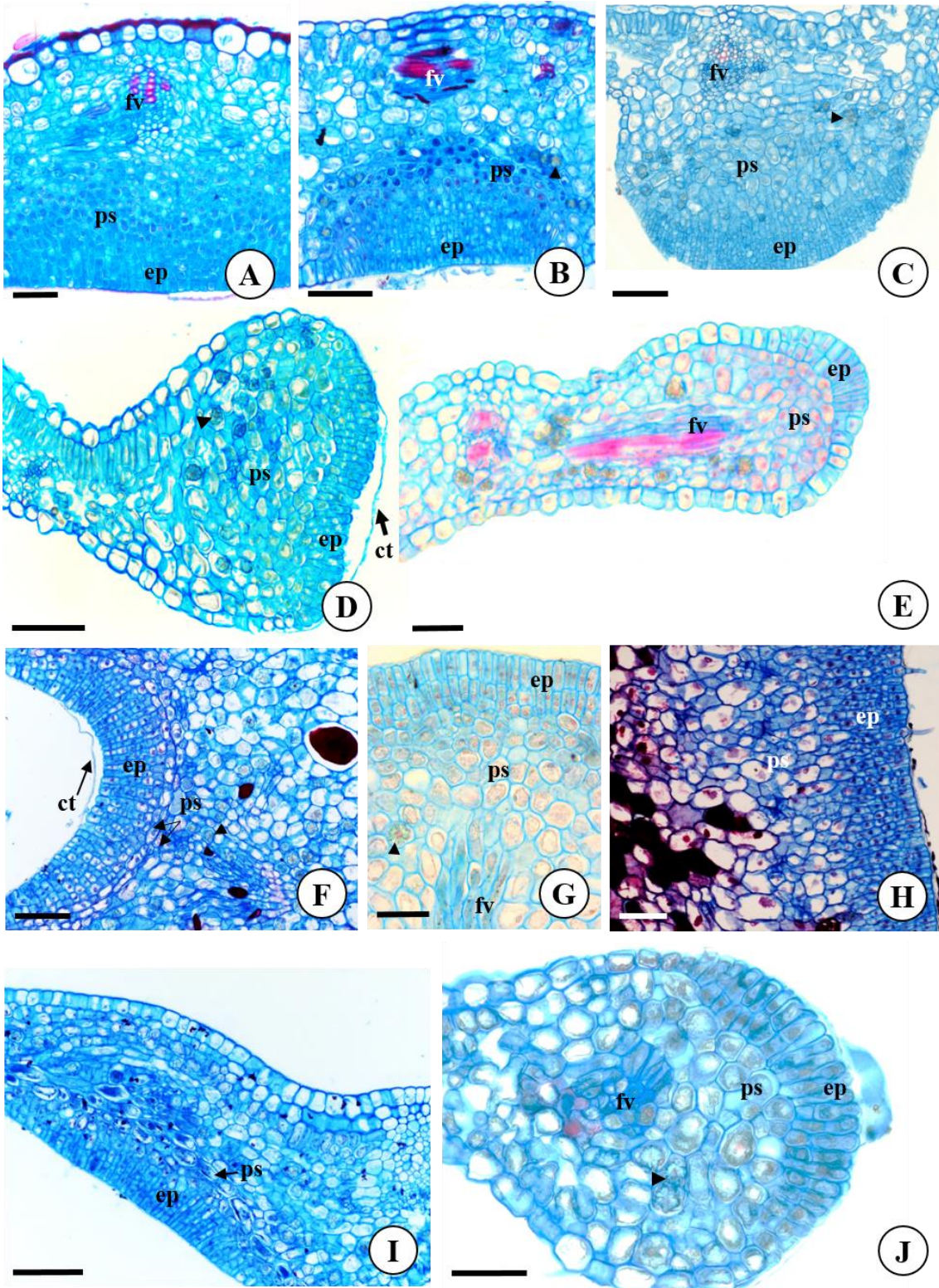


Figura 3. Secções longitudinais das glândulas foliares em *Passiflora*. **A-C** - Glândulas dorso-laminares. **D, E e I** - Glândulas marginais. **F-H** - Glândulas peciolares. **J** - Glândula estipular. **A-B** -Glândulas dorso-laminares planas apresentando uma epiderme multisseriada em *P. coriacea* (**A**), e *P. organensis* (**B**). **C** - Glândula dorso-laminar elevada em *P. hebertiana* com células do parênquima subsecretor maiores e mais justapostas que a epiderme secretora. Notar presença de drusas (ponta da seta). **D** - Glândula marginal em *P. umblicata*, mostrando o espaço subcuticular (seta), e uma epiderme secretora bisseriada, parênquima subepidérmico e drusas (ponta da seta). **E**, - Glandula marginal em *P. serratifolia* apresentando uma epiderme secretora bisseriada. Notar conexão dos feixes vasculares na região do parênquima subepidérmico. **F** - Glândula peciolar em *P. semannii* evidenciando a cutícula distendida (seta) e células planas e alongadas do parênquima secretor (seta). **G** - Glândula peciolar em *P. serratifolia* com epiderme bisseriada e presença de drusas (ponta da seta). **H** - Glândula peciolar em *P. herbertiana* mostrando epiderme multisseriada. **I** - Glândula marginal em *P. semannii*, com células da epiderme secretora alongadas e parênquima subsecretor com células planas (seta). **J** - Glândula estipular em *P. umblicata*, com epiderme secretora bisseriada. Legendas. ct= cutícula; ep= epiderme; fv= feixe vascular ps= parênquima secretor. Barras: **A- I**= 100µm; **J**= 50 µm.

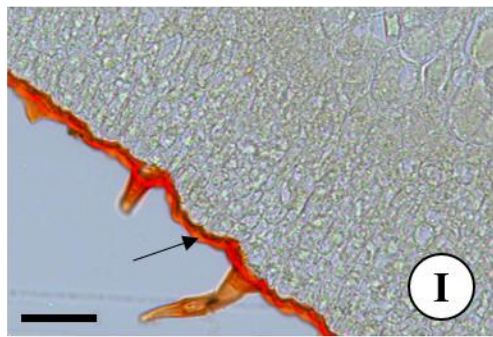
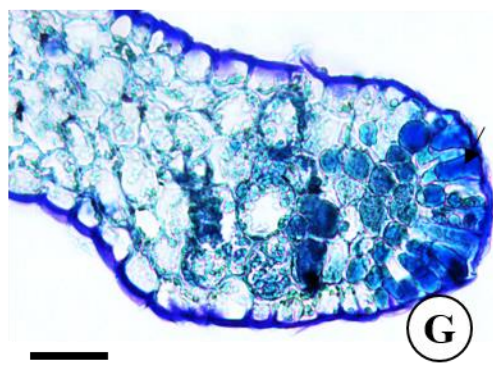
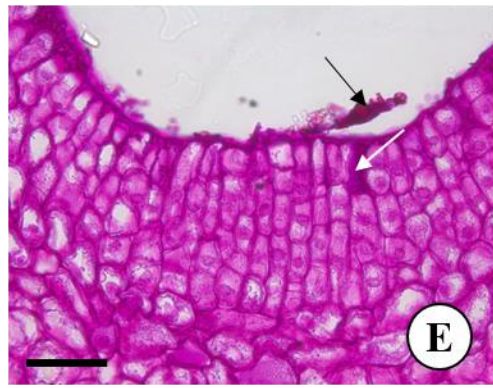
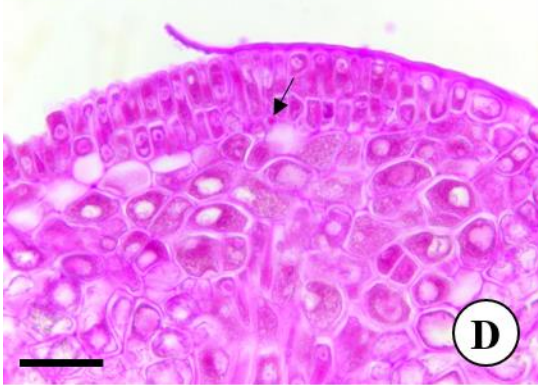
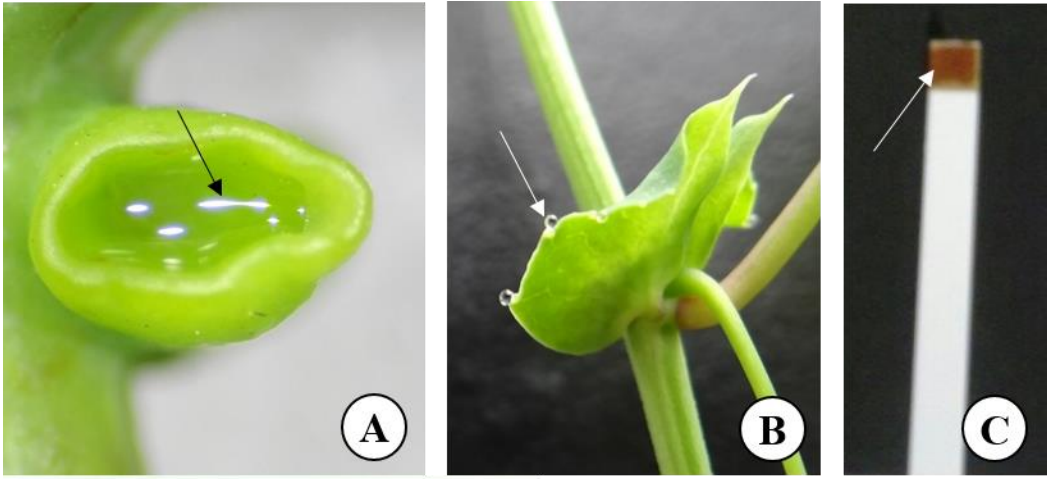


Figura 4. Teste de glicofita e análises histoquímicas das glândulas foliares em *Passiflora*. **A-B** - Exsudato com aparência translúcida sendo acumulado na estrutura côncava da glândula em *P. semanii* (**A**) e sobre a glândula estipular em *P. umblicata* (**B**). **C** - Reação positiva para glicose no teste da glicofita (seta), coloração amarronzada indica a presença de glicose nos exsudatos. **D-F** - Detecção de carboidratos nas glândulas pelo teste de PAS (seta). **D** - Presença de carboidratos na glândula peciolar em *P. serratifolia*. indicado por meio da seta. **E** - Presença de carboidratos na epiderme secretora (seta branca) e após ser liberado para o exterior (seta preta). **F** - Presença de carboidratos na glândula estipular em *P. serratifolia* (seta). **G** - Teste com azul de anilina indicando a presença de proteína na glândula estipular em *P. serratifolia*. **H** - Reação positiva para Vermelho de rutênio, detectando a presença de mucilagem ácida no espaço subcuticular na glândula peciolar em *P. serratifolia* (*). **I** - Reação negativa para lipídios gerais a partir do teste com Sudan IV na glândula peciolar em *P. herbertiana*. Notar reação positiva apenas na cutícula (seta). Barras: **D, H e I**= 50 µm; **E**= 60µm; **F**=100 µm.

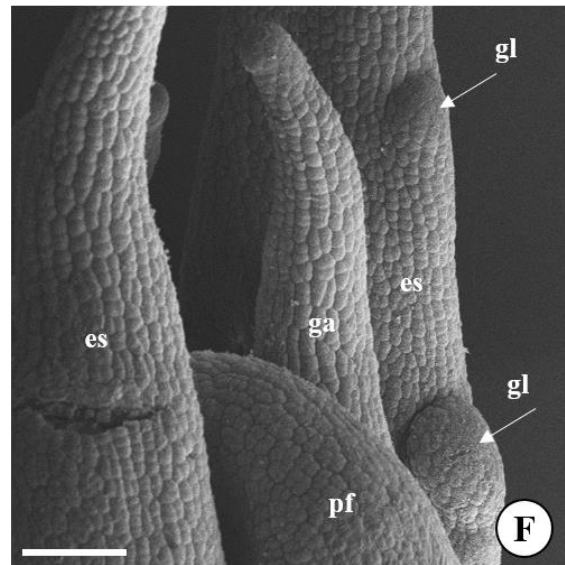
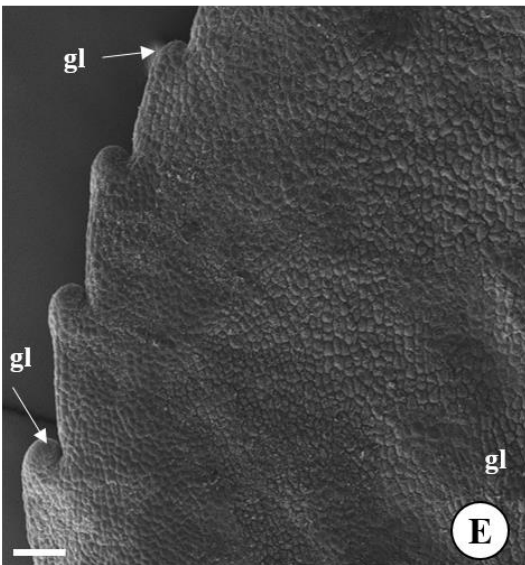
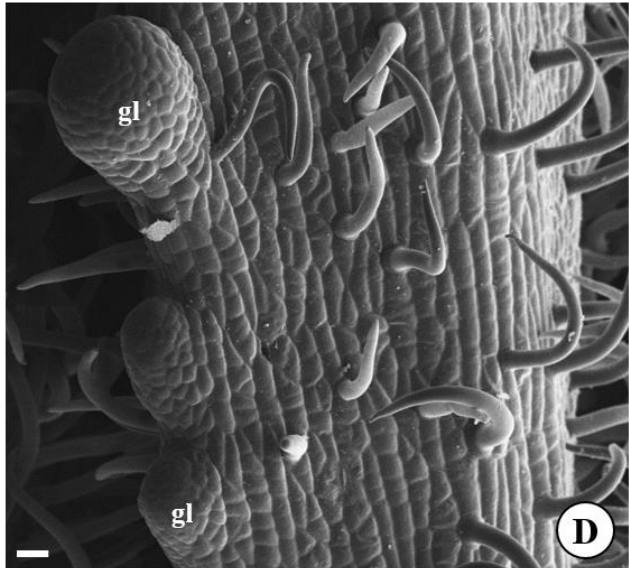
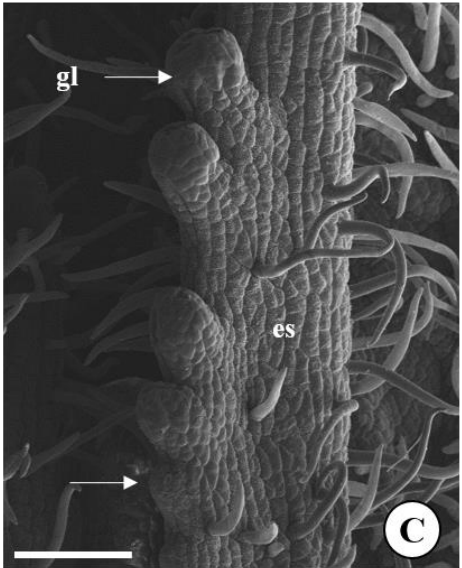
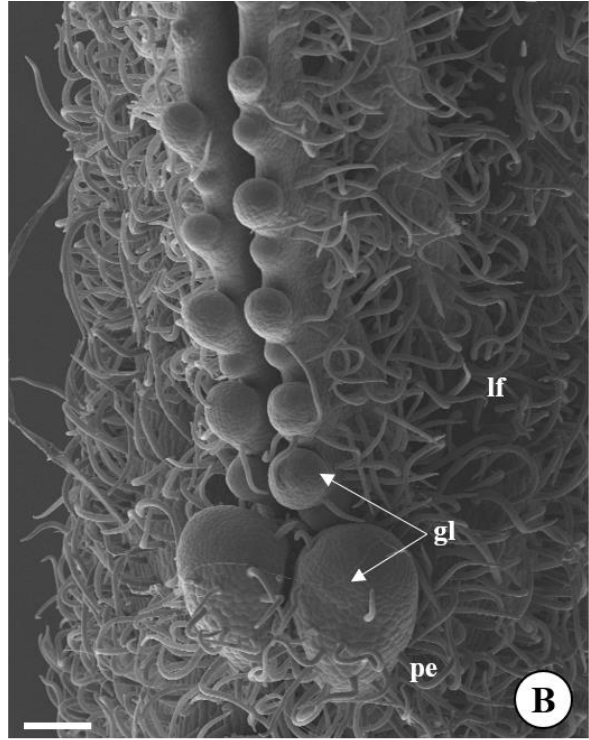
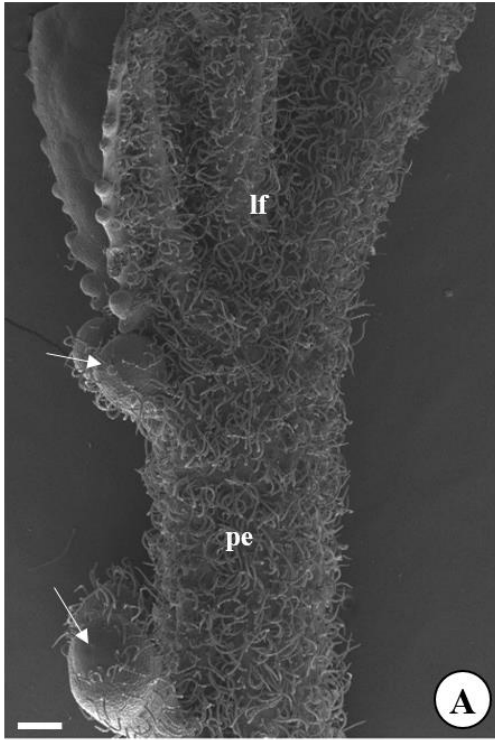


Figura 5. Assincronia do desenvolvimento das glândulas foliares em *Passiflora* observado em MEV. **A** e **B** - Desenvolvimento acrópeto das glândulas peciolares e laminares em *P. serratifolia*, isto é, as glândulas são mais desenvolvidas na base do pecíolo e da lâmina foliar, respectivamente. **C** - Desenvolvimento basípeto das glândulas estipulares em *P. serratifolia*, com glândulas mais desenvolvidas no ápice da lâmina foliar. **D** Detalhe da imagem anterior, evidenciando o desenvolvimento basípeto das glândulas. **E** e **F** - Glândulas da região basal da estípula mais desenvolvidas (desenvolvimento acrópeto) em *P. umblicata* (**E**), e *P. semannii* (**F**). Legendas: es= estípula; ga=gavinha; gl= glândula; lf= lâmina foliar; pe= pecíolo; pf= primórdio foliar. Barras: **A, D**= 200 μm ; **B, C, E**= 100 μm ; **F**= 20 μm .

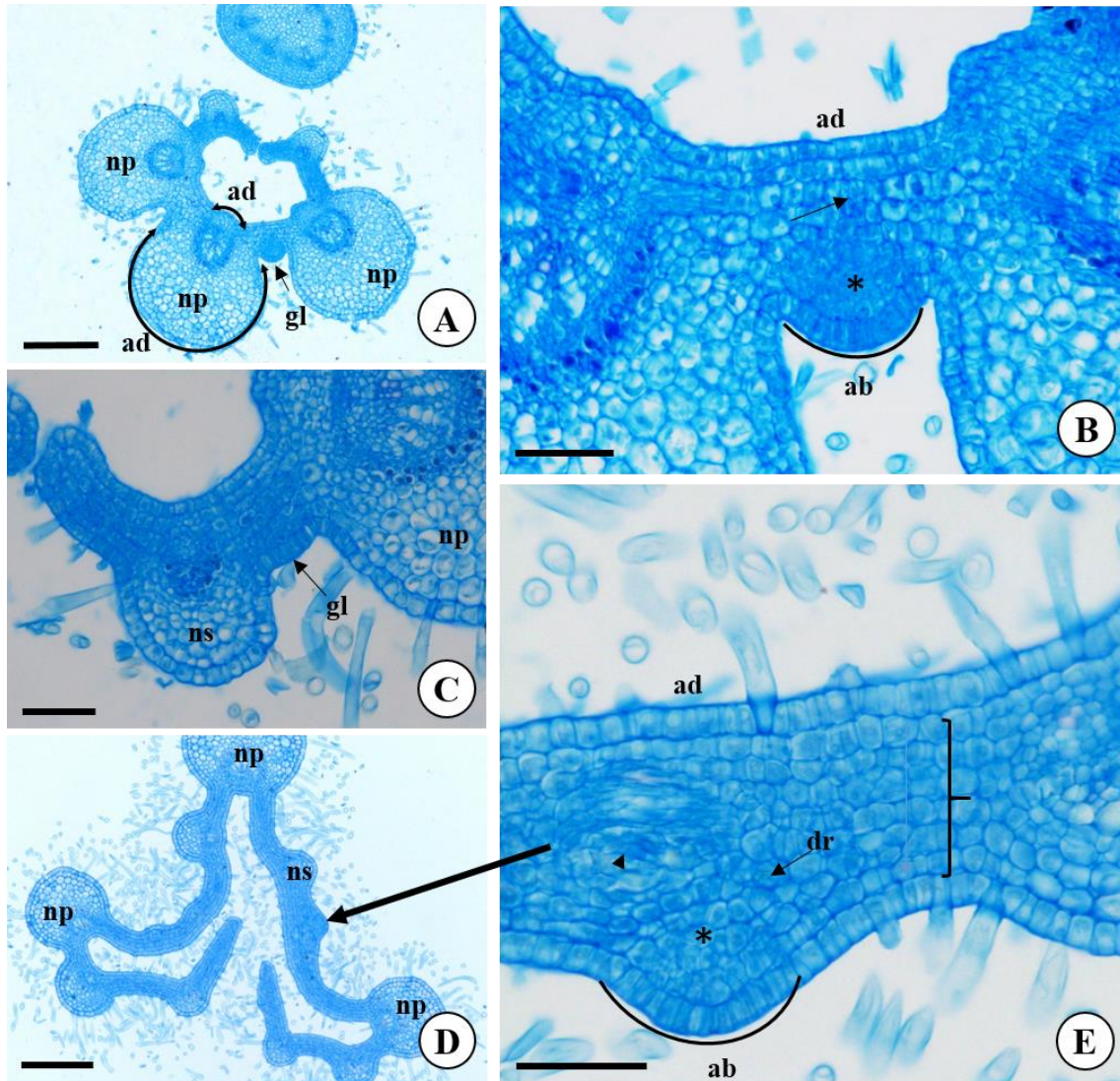


Figura 6. Fases ontogenéticas das glândulas dorso-laminares em *Passiflora* a partir de secções transversais do ápice caulinar de *Passiflora organensis* (A-C) e *P. hebertiana* (D e E). **A** - Início da formação das glândulas entre as nervuras principais na face abaxial da lâmina foliar a partir do plastrocono 5(p5) (seta). **B** - Detalhe da imagem anterior, mostrando a formação da glândula na face abaxial, com diferenciação da epiderme em paliçada, e uma região subepidérmica com células apresentando diferentes padrões de divisão (*). Notar início da diferenciação das células do procâmbio (seta preta). **C** e **D** - Início do desenvolvimento de novas glândulas entre as nervuras secundárias. **E** - Detalhe da ontogênese da glândula entre as nervuras secundárias, com o mesmo padrão das descritas entre as nervuras principais. Notar células da epiderme em paliçada e região subepidérmica s (*), com a diferenciação das células do procâmbio (ponta da seta). Nesta fase também é possível observar a presença de drusas (seta) além do mesófilo ainda não completamente diferenciado (chave). Legendas: ab= abaxial; ad= adaxial; dr= drusas; ep= epiderme; gl= glândula; np= nervuras principais; ns= nervuras secundárias. Barras: **A** e **D**= 200 μ m; **B**, **C**, **E**= 50 μ m.

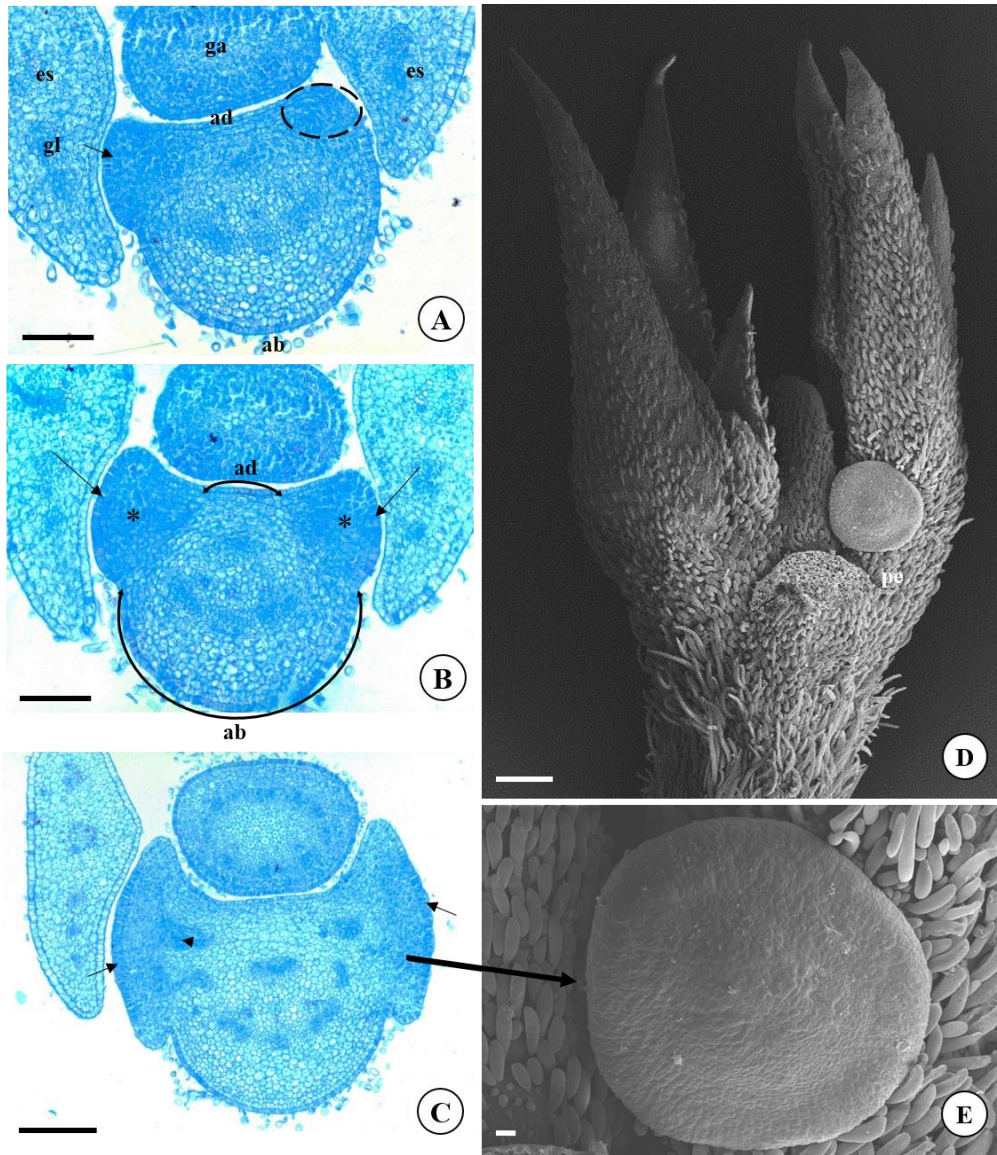


Figura 7. Secções transversais do ápice caulinar evidenciando as fases ontogenéticas das glândulas peciolares em *Passiflora coriacea*, evidenciando a origem das glândulas na região da interface entre os domínios adaxial e abaxial. **A** - Desenvolvimento das glândulas a partir do plastrocono 6 (p6). Nesta fase é possível observar o início do desenvolvimento das glândulas (área pontilhada). **B** - Estágio posterior do desenvolvimento das glândulas (asteriscos). **C** - Glândulas totalmente diferenciadas no p11, com uma epiderme secretora bisseriada (seta), região subepidérmica em diferentes camadas com a conexão dos feixes vasculares nessa região (ponta da seta). **D-E** - Morfologia das glândulas peciolares totalmente desenvolvidas em MEV, com detalhe (**E**), da glândula em vista frontal. Legendas: ab= abaxial; ad= adaxial; es= estípula; ga=gavinha; gl=glândula. Barras: **A, D**= 100; **C, D**= 200; **E**= 20 μ m.

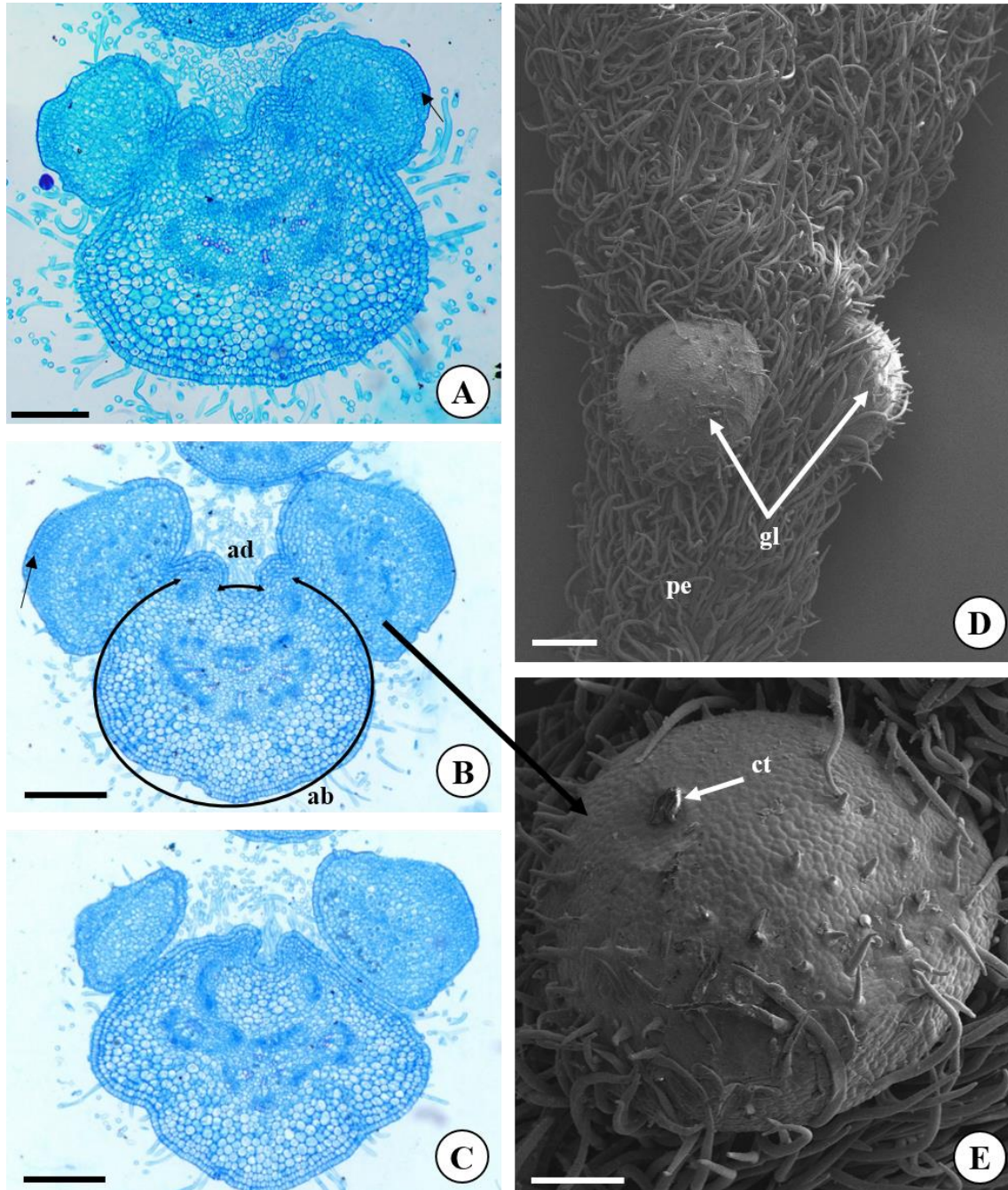


Figura 8. Secções transversais do ápice caulinar evidenciando as fases ontogenéticas das glândulas peciolares em *P. herbertina* em (A-C), mostrando o desenvolvimento das glândulas originadas a partir do domínio abaxial do plastrocono 6 (p6). **B** - Glândula no p11 totalmente diferenciada com uma epiderme secretora bisseriada e região subepidérmica em diferentes camadas (seta). **C** - Região do primórdio foliar onde é possível observar as glândulas livres do pecíolo. **D-E** - Morfologia das glândulas acropetolares totalmente desenvolvidas em MEV, mostrando em detalhe (**E**) a região da cutícula distendida (seta branca). Legendas: ab= abaxial; ad= adaxial; ct= cutícula; gl=glândula; pe= pecíolo. Barras: **A, B, C, D**= 200; **E**= 100µm.

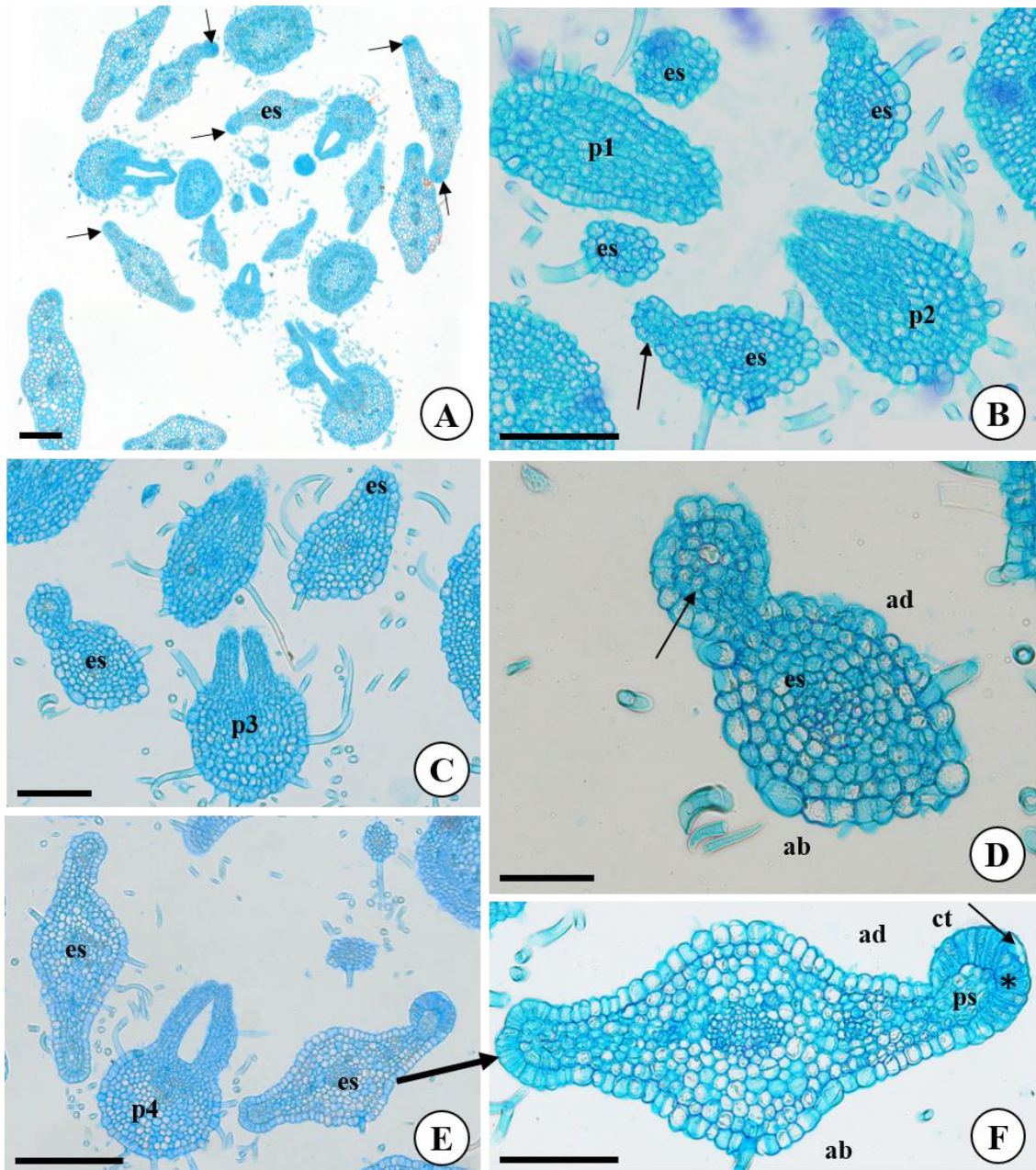


Figura 9. Fases ontogenéticas das glândulas estipulares em *P. serratifolia* a partir de secções transversais do ápice caulinar. **A** – Aspecto geral mostrando primórdios foliares e estípulas em diferentes estágios de diferenciação, com as glândulas estipulares em diferentes fases de desenvolvimento (seta). **B** - Início da formação das glândulas nas margens das estípulas a partir do plastrocono 2 (p2). **C** – Plastocrono 3 mostrando as glândulas em estágio posterior de diferenciação. **D** - Detalhe da imagem anterior, mostrando a glândula estipular com uma epiderme em paliçada e uma região subepidérmica (seta). **E** - Glândula totalmente desenvolvida no p4. **F** - Detalhe da glândula madura no p4 com uma epiderme em paliçada. Notar cutícula distendida (seta) e uma região de parênquima secretor. Legendas: ab= abaxial; ad= adaxial; ca= caule; es= estípula; fv= feixe vascular; ga= gavinha; gl= glândula; ps= parênquima secretor. Barras: **A**= 500 μ m; **B, C, F**= 100 μ m; **D**= 50; **E**= 200 μ m

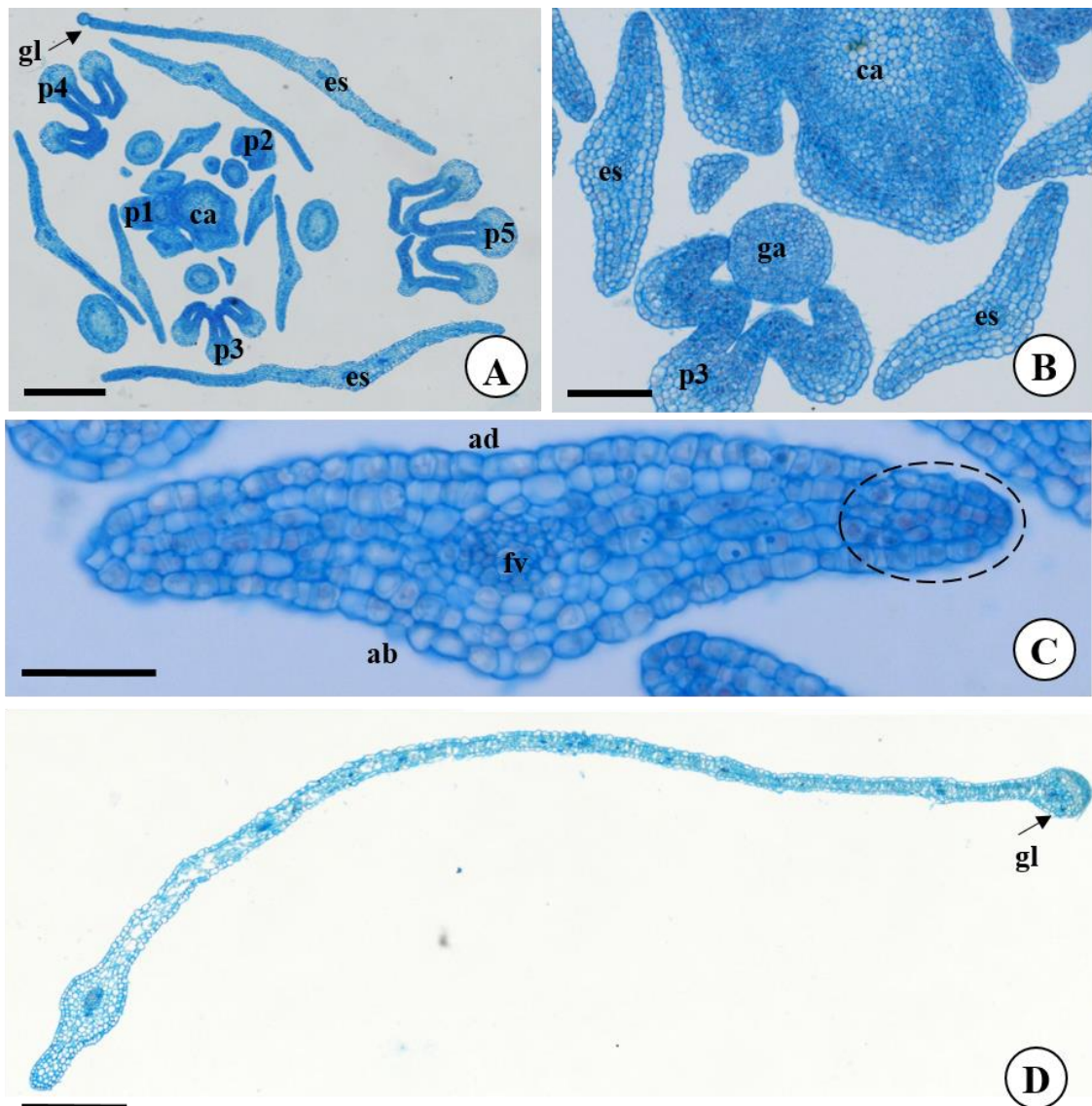


Figura 10. Fases ontogenéticas das glândulas estipulares em *P. umblicata* a partir de secções transversais do ápice caulinar. **A-B** – Aspecto geral da secção transversal do ápice caulinar, mostrando primórdios foliares (p1 – p5) e estípulas em diferentes estágios de desenvolvimento. **C** – Detalhe de uma estípula mostrando a atividade do crescimento marginal (área pontilhada) nos flancos entre os domínios adaxial e abaxial. **D** - Estípula madura assimétrica com glândula marginal totalmente desenvolvida. Notar que houve maior atividade do crescimento marginal no lado direito da figura, enquanto que a lâmina foliar do lado esquerdo é, proporcionalmente mais reduzida. Legendas: ab= abaxial; ad= adaxial; ca= caule; es= estípula; fv= feixe vascular; ga= gavinha; gl= glândula; p1-p5= primórdios foliares. Barras: **A, D**= 500µm; **B**= 100µm; **C, D**= 50µm.

Conclusões Gerais

O ponto chave dos trabalhos realizados pelo grupo de equipe coordenado pela Dra. Gladys Melo de Pinna é sempre buscar descrever as estruturas foliares com base nas diferentes regiões de crescimento das folhas. Nesta dissertação damos continuidade aos estudos envolvendo esta abordagem, porém, neste trabalho, foi a primeira vez em que estruturas glandulares foram descritas sob este aspecto.

Dentre todos os tópicos abordados nesta pesquisa, destacamos alguns pontos relevantes para conclusão deste trabalho.

Os nectários extraflorais apresentam uma grande diversidade morfológica, porém, todos compartilham um mesmo padrão anatômico. Sob a vertente ontogenética, vimos que os nectários laminares surgem durante a terceira fase da expansão do primórdio foliar e se diferenciam antes do mesofilo. Em relação aos peciolares, esses apresentam uma diferenciação basípeta ou acrópeta sem relação aparente com a zona meristemática do primórdio foliar. Ademais, eles não são estruturas primariamente homólogas, visto que surgem em domínios diferentes em relação a polaridade ad /abaxial do primórdio foliar.

Depreendemos, portanto, que futuros estudos abordando os mesmos aspectos em outras espécies em *Passiflora* serão extremamente importantes, uma vez que nosso trabalho trouxe novas evidências no desenvolvimento dessas glândulas, que podem ser potencialmente informativos na evolução no grupo e suas relações filogenéticas.