

Renata Cristina Cassimiro de Lemos

Anatomia, ultraestrutura e química das
glândulas foliares de *Passiflora* L.
(Passifloraceae)

Anatomy, ultrastructure and chemistry in foliar
glands of *Passiflora* L. (Passifloraceae)

São Paulo

2017

Renata Cristina Cassimiro de Lemos

Anatomia, ultraestrutura e química das
glândulas foliares de *Passiflora* L.
(Passifloraceae)

Anatomy, ultrastructure and chemistry in foliar
glands of *Passiflora* L. (Passifloraceae)

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

Orientadora: Profa. Dra. Gladys Flavia de Albuquerque Melo-de-Pinna

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica

Lemos, Renata Cristina Cassimiro

Anatomia, ultraestrutura e química das glândulas foliares de *Passiflora* L. (Passifloraceae) / Renata Cristina Cassimiro de Lemos; orientadora Gladys Flavia de Albuquerque Melo-de-Pinna. São Paulo, 2017.

165 páginas

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

1. Nectários 2. Glândulas de resina 3. Lipídeos 4. Aminoácidos 5. Morfologia

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Gladys Flavia de Albuquerque Melo de Pinna

Orientadora

*Ao meu amado pai Antônio, quem
me ensinou a amar as plantas,
dedico essa tese. Sei que
estaria muito orgulho.
Sinto muito sua falta!*

The scientist does not study nature because it is useful to do so.

He studies it because he takes pleasure in it,

and he takes pleasure in it because it is beautiful.

If nature were not beautiful

it would not be worth knowing,

and life would not be worth living.

Jules Henri Poincaré

Science and Method, 1908

(trad. Francis Maitland, 1914)

Agradecimentos

A construção de uma tese de doutorado depende da contribuição e incentivo de muitas pessoas e instituições. Por essa razão gostaria de agradecer a todos que de alguma forma estiveram envolvidos durante os últimos quatro anos de minha vida, mas também àqueles que contribuíram desde o início para minha formação acadêmica e pessoal.

À Universidade de São Paulo, e ao Instituto de Biociências, pela infraestrutura oferecida para a realização deste trabalho. Ao Departamento de Botânica, em especial o Laboratório de Anatomia Vegetal, onde passei grande parte dos meus dias.

Às agências de fomento à pesquisa. À CAPES, pelos primeiros seis meses de bolsa. À FAPESP (processo 2013/07857-4), pela bolsa concedida, propiciando coletas, visitas técnicas, idas à congressos e material essencial para realização do projeto.

Agradeço especialmente à minha orientadora e amiga Flavia (Profa. Dra. Gladys Flavia de Albuquerque Melo de Pinna), por ter me aceitado ainda na graduação e me aguentado por todos esses anos. Por ter me ensinado muito sobre botânica, mas também por mostrar que a busca pelo conhecimento não tem fim, que aquele pequeno detalhe pode explicar muito, que devemos sempre duvidar e pensar fora da caixinha. Obrigada por fazer parte da minha vida muito além dos portões da Universidade, por todas as conversas, por todas as risadas, pela confiança depositada. Agradeço também aos outros membros da família Pinna, ao Mário e à Julia, por serem parte desse aprendizado, e não esquecendo o Bidu, companheirinho durante um ano inteiro.

Aos colaboradores desse projeto, por permitir ir muito além do básico. À Profa Dra. Delmira Costa, por me receber em seu laboratório e facilitar tanto a condução do projeto. Obrigada também pelo dia a dia durantes essas visitas, pela coleta de campo e por mostrar parte da linda Ilhéus. Ao Prof. Dr. Diego Demarco, por dividir o

conhecimento em estruturas secretoras. Às professoras Dra. Déborah Santos e Dra. Eny Floh, pela disposição de fazer as análises com néctar e resina, por aceitar fazer algo diferente do usual em seus laboratórios.

Ao Prof. Dr. Pedro Antônio Oliveira Mangabeira, por partilhar parte de seu conhecimento, me ensinado tanto sobre as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão.

Agradeço também aos professores do Laboratório de Anatomia Vegetal: Profa. Dra. Berta Lange de Morretes (*in memorian*), Profa. Dra. Nanuza Luiza de Menezes (em especial por toda a inspiração, entusiasmo com a profissão e por sempre permitir que o laboratório cresça), Profa. Dra. Verônica Angyalossy, Prof. Dr. Gregório Ceccantini, Profa. Dra. Gladys Flavia de Albuquerque Melo de Pinna e Prof. Dr. Diego Demarco, pela troca de experiências, pelo conhecimento passado em vários momentos.

Aos técnicos por todo auxílio na realização desse projeto: ao Erismaldo, pela ajuda e dicas com as plantas no jardim; à Amanda, por facilitar tanto os trabalhos com aminoácidos; ao Irwando, pelo auxílio com a microscopia eletrônica; à Gisele e à Tássia, por toda a paciência e por toda ajuda nos momentos mais críticos do trabalho; à Yasmim, com toda ajuda na estufa; e ao Lucas e à Larissa, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UESC, pela recepção e auxílio com o início dos trabalhos na área.

À Gisele e Tássia um agradecimento mais que especial, por toda amizade, por muitos momentos juntas, pelos almoços, cafés. Compartilhamos muitas risadas, mau humor, conquistas e perdas. Agradeço por tudo e sei que estaremos sempre juntas, mesmo que espacialmente distantes.

Aos colegas de laboratório e companheiros de equipe, graduandos e pós-graduandos, impossível citar todos depois de todo esse tempo, saibam que de alguma

forma cada um teve sua contribuição nesse trabalho. Foram discussões, trocas de experiências, ajudas práticas e momentos de relaxamento.

Agradeço em especial aos atuais colegas de equipe: Aline, Carlos, Fernanda, Juliana, Leyde, Rafael, Ricardo e Thaila por todos os momentos de trabalho, discussões, reuniões. Obrigada pelos mutirões!

À querida amiga Fernanda que foi além do trabalho, se tornou uma irmã. Obrigada por participar de momentos importantes da minha vida acadêmica e pessoal. Por dividir a casa e ser uma excelente companheira. Obrigada pelas risadas e pelo ombro nos momentos de tristeza.

Aos amigos que fiz no ambiente acadêmico, mas que são para o resto da vida: Fernanda, Gustavo, José e Tássia. Agradeço pelos encontros quase mensais, onde rola muita comilança, estamos ficando craques em vários tipos de comida. Junto com o Bruno, são os troxinhos queridos do meu coração!

Por falar em Bruno, agradeço por me aguentar nessa reta final da tese. Por cuidar de mim com amor e carinho, por ser minha cobaia em inúmeras aventuras culinárias, por ser sincero em suas opiniões. Obrigada por compartilhar os sonhos para o futuro!

Por fim agradeço à minha amada família. À minha mãe Maria Cristina, por todo amor, pelo apoio desde o começo, por sempre achar que iria dar certo, por confiar em mim mais que qualquer um. Ao meu amado pai Antônio (*in memorian*), com quem sempre compartilhei o amor pela natureza, por ter ficado tão feliz quando entrei no doutorado. À Nivalva, obrigada por ser uma segunda mãe, por estar sempre pronta a me apoiar, por todo amor. E aos meus queridos irmãos Adriana, Alan e Ary, e à minha pequena afilhada Cecília, obrigada por serem meu apoio e meu escape.

Muito obrigada!

Índice

Resumo	01
Abstract	02
Introdução Geral	03
Construção da Tese	17
Referências	21
 Capítulo 1. Foliar glands in <i>Passiflora</i> L. (Passifloraceae): a structural review of extrafloral nectaries and resin glands.	27
<i>Abstract</i>	29
Introduction	31
Materials and Methods	35
Results	39
Discussion	62
References	71
Supporting Information	75
 Capítulo 2. Histochemical and ultrastructural approach of secretory cells on extrafloral nectaries and resin glands in <i>Passiflora</i> L. (Passifloraceae).	87
<i>Abstract</i>	89
Introduction	91
Materials and Methods	93
Results	96
Discussion	105
References	114

Capítulo 3. Glândulas foliares em <i>Passiflora</i> L.: análise de lipídios e aminoácidos no exsudato dos nectários extraflorais e glândulas de resina.	121
Resumo	123
Introdução	125
Materiais e Métodos	127
Resultados	131
Discussão	142
Referências	149
Anexos	155
Conclusões Gerais	163

Resumo

A ocorrência de nectários extraflorais (NEF) em espécies de Passifloraceae é muito comum e sua presença, assim como sua forma, é utilizada como característica diagnóstica para espécies do grupo. Contudo, glândulas extraflorais em *Passiflora foetida* L., anteriormente descritas como nectário, ao serem analisadas quanto à natureza química do exsudato, foram reconhecidas como glândulas de resina, apresentando estrutura anatômica distintas dos NEF. Desta maneira, realizamos um estudo anatômico, ultraestrutural e químico das glândulas foliares de *Passiflora* L., procurando estabelecer as claras diferenciações morfológicas e química dos exsudatos dos tipos glandulares presentes. Foram utilizadas técnicas de anatomia, microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Além de testes histoquímicos para a identificação *in situ* das substâncias armazenadas, e técnicas de cromatografia de camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência para as análises de lipídios e aminoácidos, respectivamente, presentes nos exsudatos das glândulas foliares. Também foram utilizadas fitas para glicose, como auxílio para o reconhecimento de carboidratos e definição das glândulas como nectários. Os NEF apresentam formas muito variadas que foram agrupadas em nectários elevados e planos, ambos com anatomia similar. O néctar extrafloral além de ter grande quantidade de açúcares, também apresenta aminoácidos e lipídios em sua composição. Já as glândulas de resina são morfológica e anatomicamente muito distintas. Quimicamente, além de não apresentarem reação para os testes de açúcares, possuem grande quantidade de substâncias lipofílicas, incluindo uma variedade de terpenos, e presença de aminoácidos. As diferentes técnicas utilizadas nos permitiram melhor definir os tipos, e subtipos, glandulares, ressaltando as diferenças entre NEF e glândulas de resina. Novas hipóteses também foram propostas para a ocorrência de glândulas de resina no grupo, aumentando o número de espécies com esse tipo glandular.

Abstract

The occurrence of extrafloral nectaries (EFN) in Passifloraceae species is very common, such that their presence and their shape are widely used as a diagnostic characteristic for species within this group. However, extrafloral glands in *Passiflora foetida* L., previously described as nectaries, were recognized as resin glands when the chemical nature of the exudate was analyzed, showing a distinct anatomical structure from the EFN. Therefore, we carried out an extensive anatomical, ultrastructural and chemical study of the leaf glands of *Passiflora* L. The goal was to establish clear morphological and chemical differences among the exudates of the observed glandular types. Usual techniques of plant anatomy, including scanning and transmission electron microscopy were used. In addition to histochemical tests for the *in situ* identification of the stored substances, techniques of thin layer chromatography and high performance liquid chromatography were respectively employed for the analysis of lipids and amino acids present in the exudates of the foliar glands. Ribbons of glucose test were also used as an aid to the recognition of carbohydrates and the definition of glands as nectaries. The EFN showed very varied forms, which were grouped as elevated or flattened nectaries, both with similar anatomy. Additionally, to having a large amount of sugars, extrafloral nectar also had amino acids and lipids in the composition. On the other hand, resin glands were observed to be morphologically and anatomically very distinct from the EFN. Besides not reacting to sugar tests, they chemically have a large amount of lipophilic substances, including a variety of terpenes and the presence of amino acids. The different techniques used allowed us to better define the glandular types and subtypes, emphasizing the differences between EFN and resin glands. New hypotheses were also proposed for the occurrence of resin glands in the group, increasing the number of species with this glandular type.

Introdução Geral

Conhecida e admirada pelas belas flores e seus frutos comestíveis, a família Passifloraceae Juss. ex Roussel é objeto de estudo em diversas áreas. Muito utilizada na medicina popular, tem encontrado lugar na medicina moderna como sedativo, para o alívio de ansiedade e no tratamento de espasmos musculares, sendo *Passiflora incarnata* L. a espécie mais cultivada para o mercado medicinal (Feuillet 2004, Ulmer & MacDougal 2004). Entre as várias espécies com frutos comestíveis, cinco ou seis possuem maior importância econômica, sendo *Passiflora edulis* Sims a principal espécie cultivada para fins alimentícios, especialmente *Passiflora edulis* fo. *edulis* (maracujá amarelo) e *Passiflora edulis* fo. *flavicarpa* O. Deg. (maracujá roxo) (Feuillet 2004, Ulmer & MacDougal 2004).

A família Passifloraceae apresenta 17 gêneros e mais de 700 espécies (Feuillet & Macdougal 2007). Tais espécies podem ser trepadeiras (com gavinhas axilares), ocasionalmente herbáceas, e menos frequentes arbustos ou árvores (nestes casos sem gavinhas) (Feuillet 2004, Souza & Lorenzi 2012, Judd *et al.* 2008, Simpson 2010). Uma das características mais marcantes da família é a presença de corona nas flores (Feuillet & Macdougal 2007), segundo Judd *et al.* (2008) esta é a característica que suporta a monofilia do grupo.

Passifloraceae apresenta distribuição essencialmente pantropical, com algumas espécies ocorrendo na região temperada da América do Norte e do Sul, sul da China, Austrália e Nova Zelândia (Feuillet & Macdougal 2007). No Brasil ocorrem quatro gêneros (*Ancistrothyrsus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L.) e cerca de 140 espécies (Souza & Lorenzi 2012).

Tradicionalmente, a família Passifloraceae está subdividida em duas tribos: Paropsieae, pequeno grupo parafilético de arbustos e árvores; e Passifloreae, grupo monofilético que inclui a maior parte das espécies, em sua maioria trepadeiras (Bernhard 1999, Muschner *et al.* 2003, Feuillet 2004, Ulmer & Macdougal 2004, Cervi 2006, Judd *et al.* 2008).

Entretanto, no APG III as antigas famílias Turneraceae e Malesherbiaceae foram inseridas em Passifloraceae, subdividindo a família Passifloraceae *sensu lato* em três subfamílias: Malesherbioideae, Turneroideae e Passifloroideae (com as tribos Paropsieae e Passifloreae), situação mantida no APG IV (Stevens 2001, APG 2009, APG 2016). Tokuoka (2012), ao analisar sequências de *rbcL*, *atpB*, *matK* e 18S rDNA, encontrou forte suporte para Passifloraceae *s.l.*, assim como confirmou a monofilia das antigas famílias Passifloraceae *s.s.*, Turneraceae (as duas últimas como grupos irmãos) e Malesherbiaceae. O mesmo autor também encontrou forte suporte para a subdivisão de Passifloraceae *s.s.* nas tribos Paropseae e Passifloreae.

Pertencente à tribo Passifloreae (Passifloraceae *s.s.*), o gênero *Passiflora* L. é o mais representativo da família, com mais de 500 espécies, ocorrendo majoritariamente na América, com algumas espécies se estendendo do sul asiático à Nova Zelândia (Feuillet & MacDougal 2003, Ulmer & MacDougal 2004, Feuillet & Macdougal 2007, Krosnick *et al.* 2009, Krosnick *et al.* 2013).

No gênero *Passiflora* a corona, apesar de presente em praticamente toda a família, é mais desenvolvida e diferenciada, mostrando vários graus de especialização em tamanho, cor, fusão e função, se tornando uma importante característica nas flores do gênero (Ulmer & MacDougal 2004). O androginóforo também está presente na grande maioria das espécies e, juntamente com a corona, dão uma morfologia características às flores, que muitas vezes na história foram associadas com as marcas

da crucificação de Cristo, ficando conhecidas como flores da paixão e dando origem ao nome do gênero (Ulmer & MacDougal 2004).

Feuillet & MacDougal (2003) subdividiram *Passiflora* em quatro subgêneros: *Astrophea*, *Deidamiooides*, *Decaloba* e *Passiflora*. No entanto, recentemente, Krosnick e colaboradores (2009) propuseram um novo subgênero: *Passiflora* L. subg. *Tetrapathea* (DC.) P.S. Green. Os autores inseriram no subgênero *Tetrapathea* os gêneros monotípicos *Hollrungia* K. Schum. e *Tetrapathea* (DC.) Reichb., além de uma nova espécie australiana.

O subgênero *Astrophea*, mais diverso no norte da América do Sul, consiste de espécies lianas ou pequenas árvores, com folhas não lobadas, glabras e estípulas pequenas (Feuillet & MacDougal 2003).

O subgênero *Decaloba* consiste de pequenas trepadeiras, com flores reduzidas, frutos pequenos e frequentemente roxos, com folhas geralmente bilobadas ou com um lobo central curto. É o subgênero com maior distribuição geográfica, e o segundo maior em número de espécies, apresentando espécies no Novo e Velho Mundo (Feuillet & MacDougal 2003).

As espécies do subgênero *Deidamiooides* são trepadeiras ou lianas, que algumas vezes possuem gavinhas bifurcadas ou com discos apicais, as folhas não são lobadas e as plantas glabras, ocorrem na América Central e do Sul (Feuillet & MacDougal 2003).

O subgênero *Passiflora* é o mais diverso em número de espécies, sendo caracterizado por ter espécies trepadeiras ou lianas, com flores grandes com múltiplas séries de filamentos de corona, brácteas geralmente conspícuas e frutos grandes, ocorrendo na América do Norte e do Sul, onde é mais abundante (Ulmer & MacDougal 2004, Krosnick *et al.* 2013).

Já o subgênero *Tetrapathea* é o menor em número de espécies, sendo elas lianas dioicas, glabras e com folhas não lobadas, ocorrendo no nordeste da Austrália, Papua Nova Guiné e Nova Zelândia (Krosnick *et al.* 2009, Krosnick *et al.* 2013).

Dados recentes confirmam *Astrophea*, *Decaloba*, *Passiflora* e *Tetrapathea* como grupos monofiléticos, sendo sustentados por dados moleculares (Muschner *et al.* 2003, Hansen *et al.* 2006, Yotoko *et al.* 2011, Krosnick *et al.* 2013). No entanto, as relações de *Deidamiooides* ainda não estão resolvidas, com parte das espécies aparecendo como um grupo irmão do subgênero *Passiflora* e outro grupo de espécies aparecendo como grupo irmão do subgênero *Astrophea* (Krosnick *et al.* 2013). A relação entre os cinco subgêneros pode ser vista na figura 1.

Uma importante característica presente em grande parte das espécies do gênero *Passiflora* são os nectários extraflorais (NEF). A ocorrência de NEF é muito comum e sua presença, assim como sua forma, tem sido extensivamente utilizada como características diagnósticas (Killip 1938, López-Meruvia *et al.* 1993a, López-Meruvia *et al.* 1993b, Cervi 2006, Vanderplank 2000, Ulmer & MacDougal 2004, Souza & Lorenzi 2012, Krosnick *et al.* 2009, Krosnick *et al.* 2013, Mezzonato-Pires *et al.* 2013). Os NEF podem estar presentes no pecíolo (nectários peciolares) ou lâmina foliar (nectários laminares), sendo algumas vezes encontrados em brácteas e estípulas (Feuillet & MacDougal 2003, Ulmer & MacDougal 2004).

A distribuição dos NEF nos subgêneros de *Passiflora* apresentam as seguintes características: *Astrophea*, com dois nectários peciolares e ausência de nectários na lâmina foliar; *Decaloba*, nectários peciolares, quando presentes, em número de dois (raramente mais de quatro), lâminas foliares com nectários em forma de pontos; *Deidamiooides*, com dois nectários peciolares e ausência de nectários na lâmina foliar ou, quando presentes, inconspícuos e na margem da lâmina; *Passiflora*, com nectários

peciolares em número de dois a seis (raramente mais de seis ou ausente), nectários nas lâminas foliares presentes ou ausentes, quando presentes são marginais (Feuillet & MacDougal 2003, Ulmer & MacDougal 2004); e *Tetrapathea*, com nectário peciolares, quando presentes, em até dois por pecíolo, nas formas ovóide, subsséveis ou crateriformes, e até oito nectários laminares, quando presentes, ovoides, em alguns casos inseridos em pares entre as nervuras medianas e primárias na base da lâmina, ou dispersos ao longo das nervuras principais (Krosnick 2009).

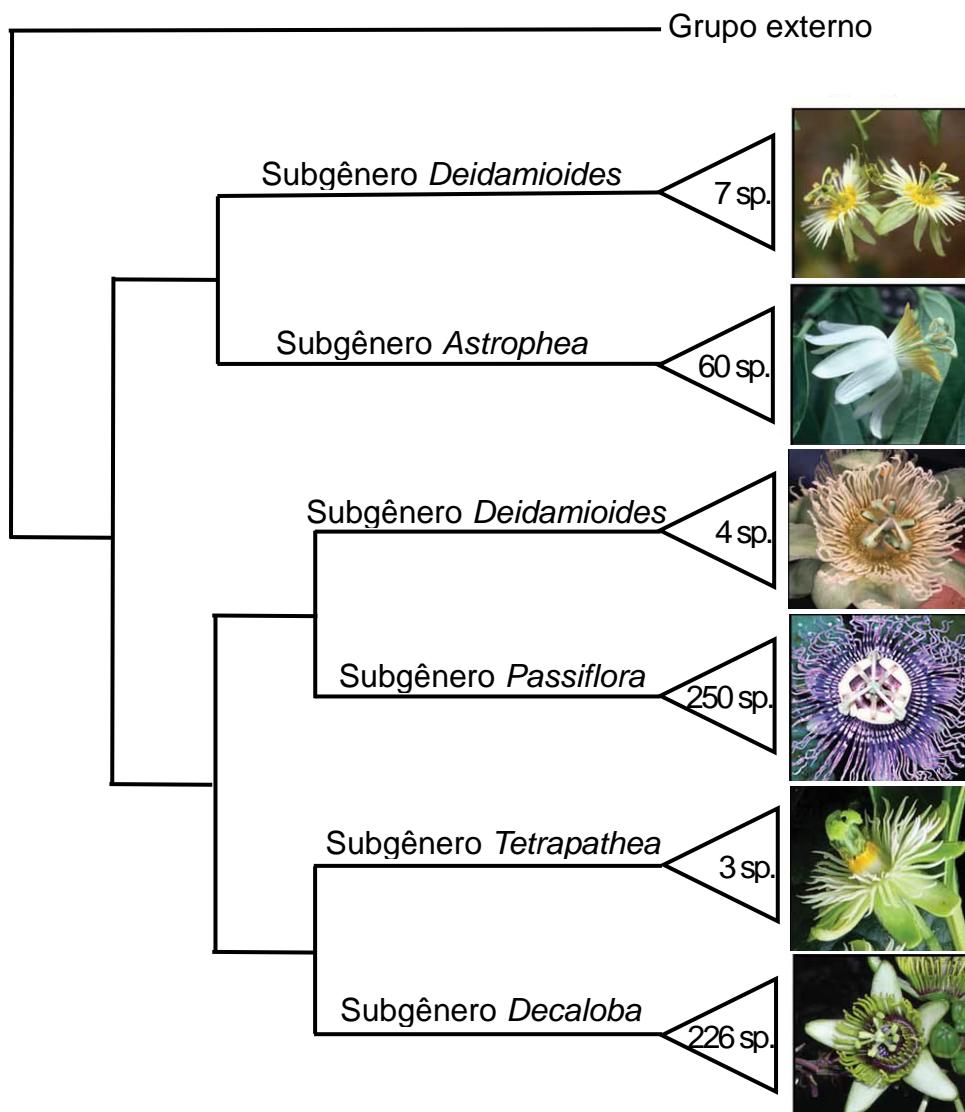


Figura 1. Visão geral da relação entre os subgêneros de *Passiflora* L., baseado na combinação entre os dados de nrITS, ncpGS, trnL-F, and ndhF. O número de espécies por clado é apresentado em cada triângulo. Fotos das espécies com créditos: *P. arbelaezii* (R. Boender); *P. arborea* (L. Escobar); *P. deidamiooides* (L. Gilbert); *P. incarnata* (E. Leiter); *P. aurantiooides* (A. Ford); *P. sexocellata* (A. Hernández). (Figura modificada de Krosnick *et al.* 2013)

Os nectários são estruturas especializadas que secretam uma substância conhecida como néctar (Elias 1983, Nicolson *et al.* 2007), que tem como principais constituintes sacarose, glicose, frutose, aminoácidos, proteínas e traços de outros componentes (Fahn 1979, Elias 1983).

Um importante estudo morfológico foi realizado por Zimmermann (1932), e complementado por Elias (1983), dividindo os NEF em sete tipos:

- **Nectários amorfos** ("formless nectaries" ou "Gestaltosennektarien"): não possuem estrutura especializada ao nível de tecido ou órgão, mas são capazes de secretar néctar;
- **Nectários planos** ("flattened nectaries" ou "Flachnektarien"): achatados com parte da sua estrutura aprofundada no tecido fundamental do órgão em que ocorrem, deixando superfície glandular levemente acima ou logo abaixo da superfície do tecido ao redor. Eles são geralmente arredondados ou ovais, com a superfície plana, côncava ou convexa, geralmente presentes na superfície abaxial das folhas;
- **Nectários em fendas** ("pit nectaries" ou "Grubbenektarien"): ocorrem em depressões da superfície do órgão em que estão presentes, essas depressões apresentam a abertura com diâmetro igual ou maior que o nectário;
- **Nectários profundos** ("hollow nectaries" ou "Hohlnektarien"): cavidades com um canal estreito, fenda ou poro que se estendem até a superfície. As cavidades são geralmente revestidas por tricomas glandulares;
- **Nectários em forma de escama** ("scalelike nectaries" ou "Schuppennektarien"): tricomas modificados especializados na produção e secreção de néctar. A maioria é em forma de escamas, embora alguns

sejam em forma de taça e sempre ocorrem como unidades distintas.

Ambos são frequentemente visíveis à olho nu;

- **Nectários elevados** ("elevated nectaries" ou "Hochnektarien")
(Zimmermann 1932): inclui todos os nectários, com exceção daqueles em forma de escamas, que são distintamente elevados da superfície do órgão em que ocorrem;
- **Nectários imersos** ("embedded nectaries" ou "Einbettenektarien"): totalmente embebidos no tecido do órgão em que ocorrem.

Em Passifloraceae, Killip (1938), em um extenso trabalho sobre as espécies do Continente Americano, descreve diversas formas para as glândulas presentes nas espécies da família, como: globosas, em forma de clava, pateliformes, sésseis, estipitadas, orbiculares, liguliformes, todos podem ser descritos como nectários elevados, seguindo classificação de Zimmermann (1932) e Elias (1983), e em forma de cicatriz, que poderiam ser descritos como nectários embutidos ou nectários achatados na classificação de Zimmermann (1932) e Elias (1983), necessitando, nesse caso, de uma descrição mais precisa. Durkee (1982) descreve a estrutura de NEF em nove espécies de *Passiflora*. Nesse estudo a autora apontam que os nectários do pecíolo possuem vários tamanhos e morfologias, geralmente distinguíveis do órgão em que se encontram, sendo possível encaixá-los entre os nectários elevados, já os nectários da lâmina foliar foram descritos como imersos na superfície abaxial.

Segundo Ulmer & MacDougal (2004), em *Passiflora* os NEF do pecíolo aparecem geralmente em pares, alternos ou opostos, muitas vezes como saliências ou em formas cilíndricas, podem lembrar trombetas ou colheres quando se estreitam no ponto de fixação. Algumas vezes não formam saliência alguma, estando na forma de pequenas cicatrizes. Os autores mencionam ainda que os NEF laminares ocorrem em

diversas formas: 1) como “dentes” glandulares marginais, 2) glândulas marginais, 3) glândulas submarginais associadas às nervuras de menor calibre na superfície abaxial, e 4) em forma de ocelos (“as ocellae”) associados às três nervuras principais ou espalhados na superfície abaxial (Fig. 2).

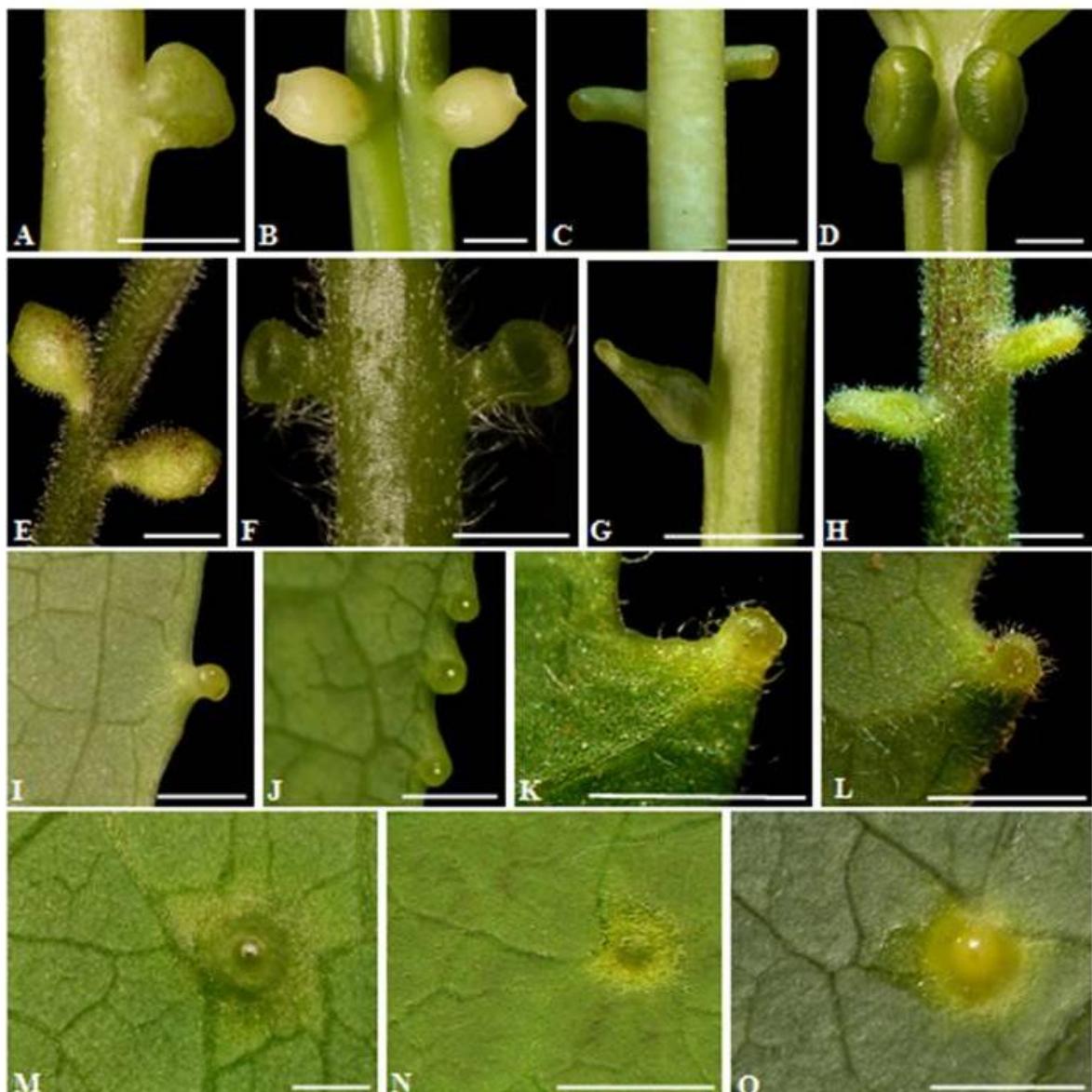


Figura 2. Diversidade de nectários extraflorais em espécies de *Passiflora*. **A- H.** Glândulas peciolares. **A.** *Passiflora actinia*. **B.** *P. alata*. **C.** *P. amethystina*. **D.** *P. edulis*. **E.** *P. morifolia*. **F.** *P. suberosa*. **G.** *P. tenuifila*. **H.** *P. urubiciensis*. **I- L.** Glândulas na margem da lâmina foliar. **I.** *P. caerulea*. **J.** *P. eichleriana*. **K-L.** *P. urubiciensis*. **M-O.** Glândulas em forma de ocelo na lâmina foliar. **M.** *P. misera*. **N.** *P. organensis*. **O.** *P. urnifolia*. Barras = 1mm. (Figura modificada de Mondin et al. 2011).

Segundo Elias (1983), duas categorias são geralmente encontradas nos NEF: **nectários não vascularizados**, com dois subtipos, os sem estrutura definida, onde a única evidência anatômica é a separação entre a epiderme e as células subjacentes devido ao acúmulo de néctar, e os com estrutura definida, cujo tipo mais comum são os nectários em forma de escama; e os **nectários vascularizados**, todos com estrutura bem definida, variáveis na forma e tamanho, normalmente maiores que os não vascularizados (Elias 1983).

Anatomicamente, a estrutura dos NEF em *Passiflora* é bem definida e semelhante nas espécies estudadas até o momento (Durkee 1982, Durkee 1983, Rocha *et al.* 2009, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013). Seguindo a classificação de Elias (1983), os NEF em *Passiflora* poderiam ser descritos como vascularizados. Nesses tipos de nectário, geralmente são reconhecidas três regiões distintas e especializadas: **epiderme** do nectário, com ou sem estômatos e tricomas, é o local onde o néctar é liberado para o exterior; **parênquima nectarífero**, camadas de células pequenas e densamente coradas logo abaixo da epiderme, produz ou armazena néctar; e **parênquima subnectarífero**, com células grandes e menos justapostas (Fahn 1979, Durkee 1983, Nicolson *et al.* 2007). Situação muito semelhante ao que foi descrito para as espécies de *Passiflora* (Fig. 3).

A epiderme dos NEF nas espécies de *Passiflora* estudadas até o momento é geralmente múltipla e constituída de células cuboidais ou colunares densas, com núcleo grande, vacúolos de vários tamanhos e muitos plastídeos; a superfície é coberta por cutícula e o néctar, na fase secretora, se acumula no espaço subcuticular (Durkee 1982, Durkee 1983, Rocha *et al.* 2009, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013). Segundo Nepi (2007), o espessamento e a permeabilidade da cutícula dos nectários variam muito, podendo a cutícula ser completamente impermeável e, neste caso, o néctar se acumula

no espaço formado entre a epiderme e a cutícula. Nas nove espécies estudadas por Durkee (1982) a liberação do néctar se dá pelo rompimento da cutícula. Entretanto, Cardoso-Gustavson e colaboradores (2013) relatam que o rompimento encontrado em *Passiflora edulis* está associado ao comportamento das formigas ao coletar néctar, não sendo observado em *P. alata*. O método de liberação do néctar em espécies onde não há ocorrência de estômatos no nectário ou rompimento da cutícula ainda necessita de mais análises. Recentemente, Krosnick (2011), por meio de análise em microscopia eletrônica, verificou poros na cutícula que, segundo a autora, seriam utilizados para a liberação do néctar.

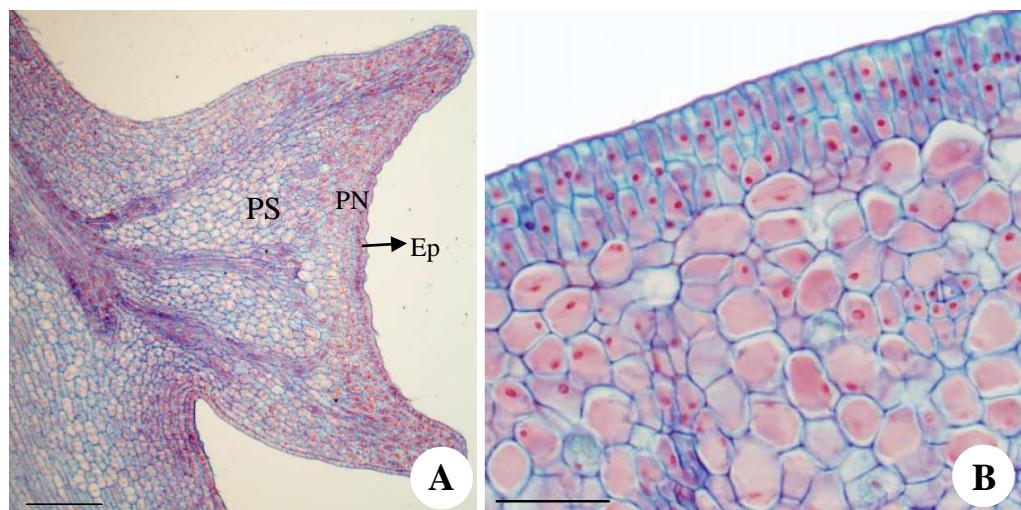


Figura 3. A. Nectário extrafloral de *Passiflora alata*, com parênquima nectarífero visualizado pelo denso conteúdo celular (pré-néctar). B. NEF de *Passiflora edulis*, epiderme e parênquima nectaríferos, com pré-néctar no interior das células secretoras. Ep=epiderme do nectário; PN= parênquima nectarífero; PSn= parênquima subnectarífero. (Figura modificada de Cardoso 2010).

As análises de Durkee (1982), em nove espécies de *Passiflora* (*P. auriculata*, *P. biflora*, *P. coerulea*, *P. edulis*, *P. helleri*, *P. ligularis*, *P. quadrangularis*, *P. seemannii* e *P. warmingii*), revelam que as células secretoras da epiderme, em fase pré-secretora, possuem citoplasma rico em ribossomos, com muitas cisternas de retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e plastídios, o último podendo apresentar amido.

Dictiossomos são observados ocasionalmente, revelando atividade relacionada à síntese de parede nas células jovens, estando presentes também pequenos vacúolos dispersos pelas células. Com o começo da secreção, os vacúolos se tornam mais proeminentes, os plastídios não apresentam amido e os dictiossomos são geralmente inativos.

A diminuição do amido nos plastídios durante a fase secretora pode indicar que o amido acumulado nessas células, durante a fase pré-secretora, é fonte de produção de, ao menos, parte do néctar (Fahn 1979).

Interno à epiderme, ocorre o parênquima nectarífero que, nas espécies de *Passiflora* estudadas até o momento, apresenta células isodiamétricas, maiores que as da epiderme, normalmente mais vacuoladas e com citoplasma menos denso, sendo abundantes nessa área cristais de oxalato de cálcio (Durkee 1982, Rocha *et al.* 2009, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013). Na fase pré-secretora, a análise ultraestrutural revela semelhanças com as células epidérmicas. Entretanto, na fase secretora, as células do parênquima nectarífero são menos densas que as da epiderme, os plastídios contêm traços de amido, e os vacúolos são conspícuos (Durkee 1982). Em *P. alata*, idioblastos secretores são visualizados nessa região e próximos às terminações vasculares (Cardoso-Gustavson *et al.* 2013).

Nepi (2007) comenta que, geralmente, o tamanho dos vacúolos nas células do parênquima nectarífero varia de acordo com o estágio de desenvolvimento do nectário, sendo que, na fase pré-secretora, os vacúolos são pequenos, podendo aumentar de tamanho na fase secretora, mas um grande aumento é verificado após a secreção. O citoplasma é rico em ribossomos e mitocôndrias, que aumentam em número no momento da secreção, indicando maior requerimento de energia para produção de néctar.

Os NEF de *Passiflora* são vascularizados por xilema e floema, com terminações de floema podendo alcançar as camadas mais externas do parênquima nectarífero (Rocha *et al.* 2009) ou terminar no parênquima subnectarífero (Durkee 1982, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013).

Segundo Durkee (1983), a vascularização dos nectários geralmente termina no parênquima subnectarífero e consiste de floema ou, menos frequentemente, de floema e xilema. Entretanto, Nepi (2007) diz que tanto o parênquima subnectarífero como o nectarífero podem ser vascularizados. Assim, segundo Nepi (2007), a epiderme e o parênquima nectarífero estão envolvidos na produção e secreção de néctar, constituindo a unidade funcional do nectário, enquanto o parênquima subnectarífero não está diretamente envolvido na produção de néctar.

De acordo com Nepi (2007), a estrutura e ultraestrutura do parênquima nectarífero dependem do mecanismo de transporte do pré-néctar (via apoplasto ou simplasto) e da fonte de carboidratos do néctar (reserva de amido ou direto da fotossíntese), uma evidência para a via simplástica seria a ocorrência de numerosos plasmodesmas, que podem ocorrer entre o parênquima nectarífero e subnectarífero.

Para o mecanismo de secreção do néctar, pela epiderme, dois tipos são descritos: secreção **granulócrina** ("granulocrine"), na qual a solução de açúcar é transportada em direção à membrana da célula secretora, por meio de vesículas, fundindo-se à membrana e liberando o néctar; e secreção **écrina** ("eccrine"), na qual moléculas de açúcar são transportadas através da membrana (Durkee 1983).

Nas espécies de *Passiflora* estudadas por Durkee (1982), a autora considera que ocorre secreção écrina, pois, apesar da abundância de retículo endoplasmático e dictiosomos, não houve evidências de fusão com a membrana plasmática.

Quanto à composição dessa secreção, os poucos estudos realizados com NEF de espécies de *Passiflora* focam principalmente na concentração de açúcares, demonstrando grande concentração de glicose, frutose e sacarose, podendo variar entre as espécies e entre os diferentes nectários de uma mesma espécie (Durkee 1982, Rocha *et al.* 2009, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013). Em *P. amethystina*, por exemplo, a concentração de açúcares nas glândulas peciolares (52,82%) é maior que nas glândulas laminares (39,67%), sendo que, nas peciolares, 1,75% desses açúcares corresponde à frutose, 3,76% à glicose e 47,31% à sacarose (Rocha *et al.* 2009).

A composição do néctar entre os diferentes táxons apresenta grande variação, tanto quantitativa quanto qualitativamente, ocorrendo (Pacini & Nicolson 2007):

- **Água**, cuja origem pode ser do floema ou xilema, com uma concentração menor encontrada em nectários cuja terminação vascular é composta apenas de floema. A água no néctar pode ser uma recompensa importante aos insetos em condições de seca;
- **Carboidratos**, o constituinte principal do néctar, podendo estar na forma de sacarose, glicose ou frutose, com demais classes, como mono e dissacarídeos, ocorrendo em menor proporção;
- **Aminoácidos**, o segundo maior soluto do néctar, inclui uma grande variedade de aminoácidos essenciais e não essenciais;
- **Proteínas**, incluindo enzimas, parecem possuir funções homeostáticas e regulatória;
- **Ions**, derivados do xilema e/ou floema;
- **Lipídeos**, fonte altamente energética para os animais que se alimentam do néctar, contudo, geralmente ocorrem apenas traços;
- **Terpenoides**, geralmente na forma volátil;

- **Metabólitos secundários**, como fenóis e alcaloides, podem agir atrativo ou repelentes.

Em *Passiflora edulis* Sims e *P. alata* Curtis, Cardoso-Gustavson e colaboradores (2013), além da presença de açúcares, observaram metabólitos secundários ocorrendo no néctar extrafloral dessas espécies, como flavonoides, no exsudato de ambas as espécies, e alcaloides presentes no néctar de *P. edulis*. A presença de aminoácidos também é descrita para algumas espécies de *Passiflora* (Baker *et al.* 1978, Durkee 1982).

A análise dos componentes do exsudato das glândulas em *Passiflora*, geralmente descritas como NEF, tornou-se mais relevante a partir do estudo de Durkee e colaboradores (1984) com *P. foetida* L. Nesse trabalho, os autores relataram que o exsudato das glândulas, que anteriormente acreditava ser NEF, não apresentavam açúcares nem aminoácidos, sendo insolúvel em água, pouco solúvel em acetona e completamente solúvel em etanol 95% e xileno, além de reagirem fortemente com corantes para lipídeos. Dessa forma, os autores definiram as glândulas de *P. foetida* como glândulas de resina.

As glândulas de *P. foetida* apresentam diferenças estruturais, além das diferenças químicas do exsudato, comparado com os NEF estudados até o momento em *Passiflora*. Anatomicamente, Durkee e colaboradores (1984) descrevem as glândulas de resina como possuindo uma camada de células epidérmicas secretoras alongadas, com lipídeo em seu interior; um tecido clorenquimático internamente à epiderme e tecido vascular, ocupando o centro, constituído de xilema e floema, mas com terminações em floema. No entanto, os autores encontraram as diferenças mais marcantes, no nível ultraestrutural, como a presença do retículo endoplasmático liso, além de vacúolos e vesículas (próximas ou se fundindo com a membrana) contendo substâncias

osmiofílicas. A epiderme, geralmente multisseriada nos NEF, apresenta uma única camada nas glândulas de *P. foetida* e o parênquima clorenquimático subjacente à epiderme apresenta células alongadas, diferentemente do parênquima nectarífero, que não apresenta alterações, como aumento da vacuolização entre as fases pré-secretora e secretora.

O exsudato das glândulas presentes em *P. foetida* já foi analisada quanto à presença de uma variedade de substâncias químicas, tendo sido verificada a presença de flavonoides (Echeverri *et al.* 1991) e lactonas, nomeadas genericamente de passifloricinas (Echeverri *et al.* 2001, Cardona *et al.* 2004). Também já foi relatado que as glândulas presentes nas brácteas de *Passiflora foetida* apresentam enzimas digestivas, tendo essa espécie sido considerada carnívora (Radhamani *et al.* 1995). As glândulas presentes nas folhas e brácteas de *P. foetida*, no entanto, não foram analisadas quanto a possibilidade de carnivoria.

Construção da Tese

Diante do exposto acima, algumas questões ficam em aberto: as glândulas extraflorais em *Passiflora* podem ser generalizadas como nectários? A presença de glândulas resiníferas encontradas em *P. foetida* é uma inovação para a espécie ou sua distribuição é mais ampla? Há características morfológicas, anatômicas e ultraestruturais nas glândulas foliares que possam auxiliar na identificação e compreensão da evolução das mesmas? Há diferenças entre os componentes químicos dos exsudatos nos diferentes grupos?

Krosnick (2011) enfatiza que os nectários são uma inovação importante para *Passiflora* e há necessidade de estabelecer claramente as homologias entre os diferentes tipos de nectários. Sendo assim, a análise da estrutura e composição química dos nectários extraflorais podem fornecer informações na compreensão da evolução dos

nectários no gênero. Segundo Krosnick (2011), dados sobre anatomia e desenvolvimento sugerem similaridades entre as glândulas da margem das estípulas e folhas com os encontrados na face abaxial da lâmina e no pecíolo. A mesma autora relata ainda que, apesar dos dados sobre as diferentes classes de açúcares ainda não ter se mostrado informativo para separar os tipos de NEF, o conteúdo de aminoácidos pode fornecer uma boa base de comparação. Contudo, como já exposto anteriormente, poucos trabalhos que relatam a composição dos NEF no gênero, tratando principalmente os açúcares presentes, com pouca descrição dos demais componentes.

Para a escolha das espécies a serem estudadas, inicialmente foi utilizada a filogenia gerada por Yotoko e colaboradores (2011) (Fig. 4), na qual a relação entre algumas espécies pertencente aos subgêneros *Decaloba* e *Passiflora* (os dois subgêneros com maior número de espécies) estão demonstradas. Posteriormente, mais táxons foram adicionados ao trabalho, alguns desses táxons não estão presentes na filogenia de Yotoko e colaboradores (2011). As espécies foram adicionadas pela facilidade de coleta e disponibilidade de sementes, aumentando assim o número amostral. A maioria das espécies adicionadas foi utilizada para as análises morfológicas e anatômicas relatadas no primeiro capítulo.

Em especial, *Passiflora foetida* L. foi escolhida por possuir glândulas de resina, como relatado por Durkee e colaboradores (1984), e *P. sublanceolata* (Killip) MacDougal foi escolhida por pertencer à mesma seção de *P. foetida*, seção *Dysosmia* DC. A comparação entre as duas pode revelar similaridades entre a estrutura e composição das glândulas de resina. A comparação de *P. foetida* com as espécies que, teoricamente, apresentam nectários extraflorais também pode permitir encontrar características

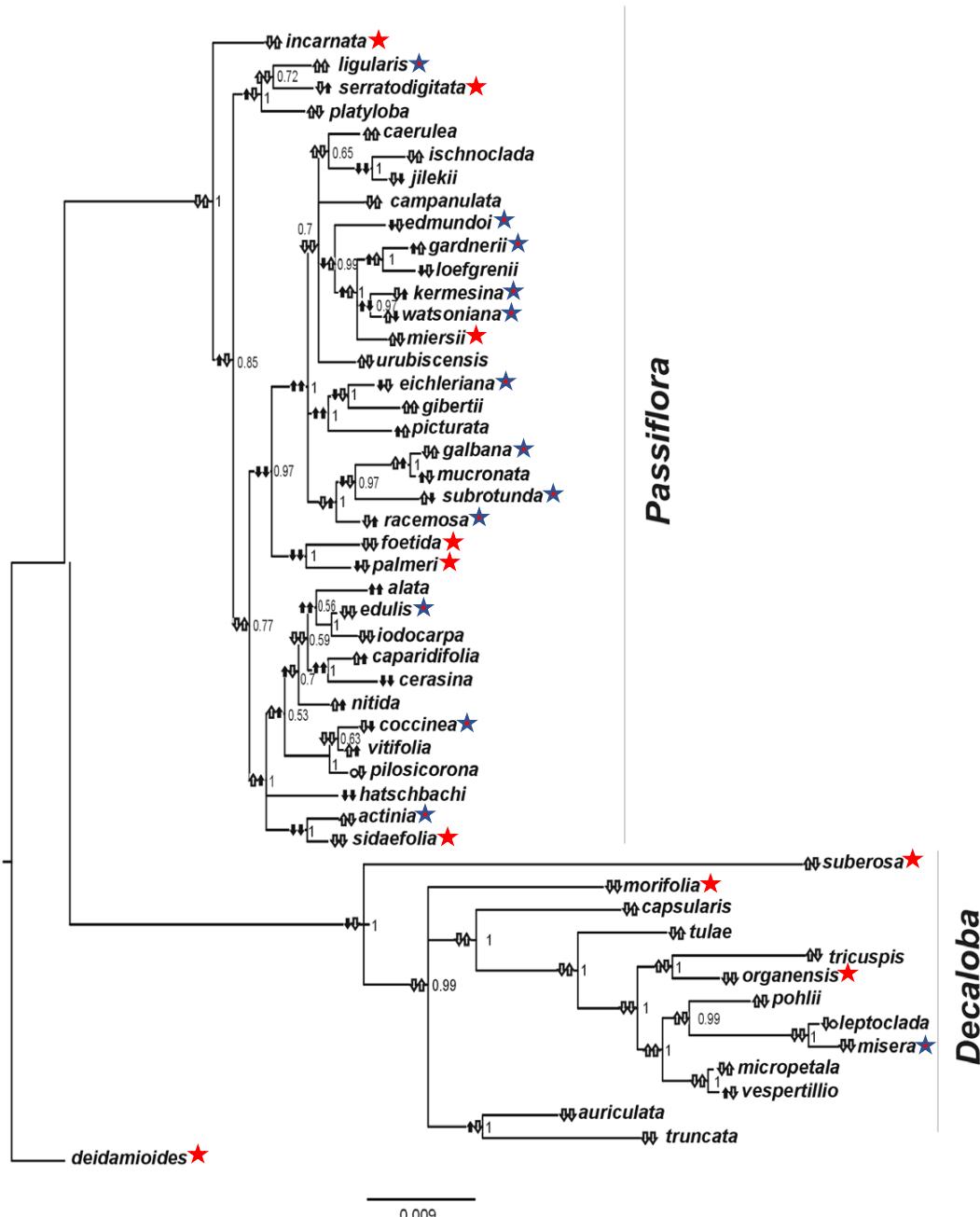


Figura 4. Cladograma dos subgêneros *Passiflora* e *Decaloba*, proposto por Yotoko e colaboradores (2011, modificado), evidenciando algumas das espécies selecionadas para o presente estudo. \star = espécies originalmente selecionadas, $\star\star$ = espécies adicionadas ao trabalho.

morfológicas e anatômicas que nos permitam distinguir glândulas de resina e nectários, visto que Durkee e colaboradores (1984) enfatizam que as glândulas de resina dessa espécie se assemelham, superficialmente, aos nectários, tanto na localização como na morfologia.

A tese está dividida em três capítulos, os quais apresentam uma sequência de construção de conhecimento sobre as glândulas extraflorais. No primeiro capítulo são apresentados dados morfológicos e anatômicos das glândulas presentes 34 espécies do gênero *Passiflora*, discutidos quanto às diferenças que podem separar glândulas de resina e nectários extraflorais. No capítulo 2, espécies selecionadas com base nas análises morfológicas e anatômicas são estudadas quanto às características ultraestruturais e histoquímicas das células secretoras dos dois tipos glandulares. O terceiro, e último capítulo, trata de análises químicas conduzidas com o exsudato produzido pelas glândulas extraflorais.

As espécies utilizadas nos capítulos 2 e 3 foram, na sua maioria, germinadas e mantidas em casa de vegetação (Fig. 5) para facilitar a coleta de exsudato e procurar minimizar as variáveis ambientais que possam influenciar nas análises químicas.

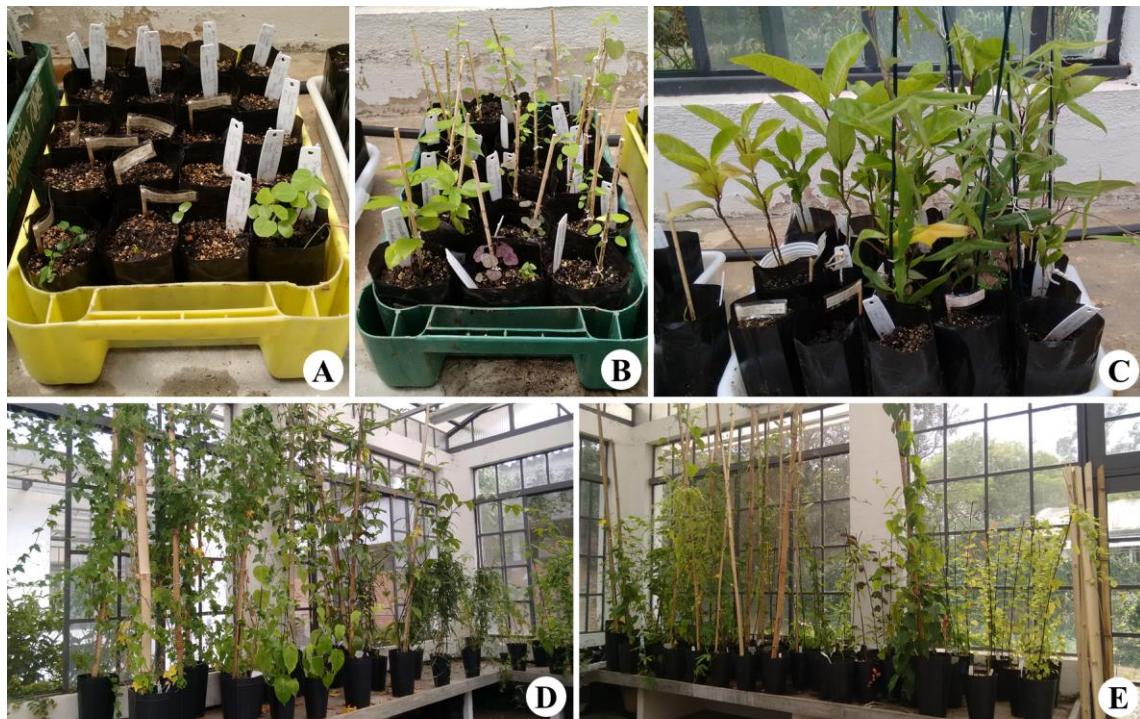


Figura 5. Cultivo de espécies de *Passiflora* L., material mantido em casa de vegetação. **A.** Material em germinação. **B - C.** Plantas jovens. **D-E.** Plantas mantidas em cultivo para coleta de néctar extrafloral e resina.

Referências

- 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.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG). 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 - 20.
- BAKER, H. G.; OPLER, P. A.; BAKER, I. 1978. A comparison of the amino acid complement of floral and extrafloral nectars. **Botanical Gazette** 139 (3): 322-332.
- BERNHARD, A. 1999. Flower structure, development and systematics in Passifloraceae and *Abatia* (Flacourtiaceae). **International Journal of Plant Sciences** 160: 135 – 150.
- CARDONA. W. G.; QUIÑONES W. F.; ECHEVERRI, F. L. 2004. Leishmanicidal activity of passifloricin A and derivatives. **Molecules** 9: 666-672.
- 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.
- 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.
- DURKEE, L. T. 1982. The floral and extrafloral nectarines of *Passiflora*. II. The extrafloral nectar. **American Journal of Botany** 69(9): 1420-1428.

- DURKEE, L. T. 1983. **The ultrastructure of floral and extrafloral nectaries.** In: BENTLEY B., ELIAS T. (eds). *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** 71:596-602.
- ECHEVERRI, F.; CARDONA, W.; TORRES, F.; PELAEZ, C.; QUIÑONES, W.; RENTERIA, E. 1991. Ermanin: an insect deterrent flavonoid from *Passiflora foetida* resin. **Phytochemistry** 30 (1): 153-155.
- ECHEVERRI, F.; ARANGO, V.; QUIÑONES, W.; TORRES, F.; ESCOBAR, G.; ROSERO, Y.; ARCHBOLD, R. 2001. Passifloricins, polyketides α-pyrone from *Passiflora foetida* resin. **Phytochemistry** 56: 881-885.
- 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.
- FAHN, A. 1979. **Secretory tissues in plants.** Academic Press Inc, London.
- FEUILLET, C. 2004. **Passifloraceae (Passion Flower Family).** In: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. (Eds.) *Flowering Plants of the Neotropics*. Princeton University Press & New York Botanical Garden, Oxford.
- FEUILLET, C. P.; MACDOUGAL, J. M. 2003. A new infrageneric classification of *Passiflora*. **Passiflora** 13: 34-38.
- FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J.M. 2007. **Passifloraceae.** 270-281. In: KUBITZKI, K. (ed.). *The Families and Genera of Vascular Plants. vol. 9*. Berlin: Springer.

- 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): 138-150.
- 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. 2011. What is a nectary? *Passiflora* as a model system for studying nectary evolution. **Southeastern Biology** 58(3): 269.
- 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.
- 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.
- MEZZONATO-PIRES, A. C.; SALIMENA, F. R. G.; BERNACCI, L. C. 2013. Passifloraceae na Serra Negra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia** 64: 123–136.

- 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.
- NEPI, M. 2007. Nectary structure and ultrastructure. In: NICOLSON, S. W.; NEPI, M. & PACINI, E. 2007. **Nectaries and nectar**. Spring-Verlag, The Netherlans.
- NICOLSON, S. W.; NEPI, M. & PACINI, E. 2007. **Nectaries and nectar**. Spring-Verlag, The Netherlans.
- PACINI, E.; NICOLSON, S. W. 2007. Introduction. In: NICOLSON, S. W.; NEPI, M. & PACINI, E. **Nectaries and nectar**. Spring-Verlag, The Netherlans.
- RADHAMANI, T. R.; SUDARSHANA, L.; KRISHNAN, R. 1995. Defense and carnivory: Dual role of bracts in *Passiflora foetida*. **Journal of Biosciences** 20: 657-664.
- ROCHA, D. I.; 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: 619-626.
- SIMPSON, M. G. 2010. **Plant Systematics**. 2^a ed. Editora Elsevier.
- STEVENS, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since].
- 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.

TOKUOKA, T. 2012. Molecular phylogenetic analysis of Passifloraceae sensu lato (Malpighiales) based on plastid and nuclear DNA sequences. **Journal of Plant Research.** 125: 489-497.

ULMER, T.; MACDOUGAL, M. J. 2004. ***Passiflora: Passionflowers of the world.*** Timber Press, Inc., Portland.

VANDERPLANK, J. 2000. **Passion Flowers.** 3rd edition The MIT Press, Cambridge, Massachusetts.

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.

ZIMMERMAN, J. G. 1932. Über die extrafloralen nektarien der Angiospermen. **Beihefte zum Botanischen Centralblatt** 49: 99-196.

Capítulo 1

Foliar glands in *Passiflora* L. (Passifloraceae): a structural review of extrafloral nectaries and resin glands

Renata CC Lemos¹, Delmira C Silva² and Gladys FA Melo-de-Pinna¹

¹ Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, CEP 05508-090, São Paulo, Brazil.

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, CEP 45662-900, Bahia, Brazil.

*Submetido à revista Plos One em março de 2017

ABSTRACT

Although extrafloral glands in Passifloraceae species have aroused the interest of many researchers because of the wide morphological diversity, comparative studies of the morphological and anatomical characteristics of foliar glands are scarce. The present work analyzed the foliar glands on 34 species of *Passiflora* from samples containing glands in the petiole and foliar blade fixed in 50% solution of formaldehyde-ethanol-acetic acid and stored in a 70% ethanol solution. For anatomical analyses part of material was embedded in Paraplast, longitudinally sectioned and double stained with safranin and Astra blue. Scanning electron microscopy analysis was also carried out. To analyze the presence of sugars in the secretion of foliar glands, glucose strip test was used. Based on the results of morphological, anatomical and glucose strip tests, the foliar secretory glands in *Passiflora* are grouped into two categories: 1) Nectaries, which can be elevated or plane; and 2) Resin Glands. From an anatomical viewpoint, glands characterized as extrafloral nectaries show a multi-stratified nectary epidermis usually followed by two layers of nectary parenchyma, which are flatter and have a denser content. Internally to these layers, the subnectary parenchyma shows vascular bundles that terminate in phloem cells. On the other hand, the resin glands show a single layer of elongated secretory epidermal cells, internally followed by parenchyma tissue and vascular tissue with both phloem and xylem terminations. The analyzed species show a wide variety of gland shape and localization. Among the extrafloral glands, the anatomy was observed to be similar between the extrafloral nectaries, and more significant variations were observed when comparing them to the resin glands.

INTRODUCTION

The genus *Passiflora* L. is the most representative one in the Passifloraceae s.s. family, comprising more than 500 species (Feuillet & MacDougal 2003, Ulmer & MacDougal 2004, Krosnick *et al.* 2009, Krosnick *et al.* 2013). According to the most recent infrageneric classification the family is subdivided in the following subgenera: *Astrophea* (DC.) Mast., *Deidamiooides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb., and *Passiflora* (Feuillet & MacDougal 2003), the latter being the most abundant one in South America (Ulmer & MacDougal 2004). However, a new subgenus was proposed by Krosnick *et al.* (Krosnick *et al.* 2009), *Passiflora* L. subg. *Tetrapathea* (DC.) P. S. Green including three representatives.

The occurrence of extrafloral nectaries (EFN) in Passifloraceae species is very common, and their presence, as well as their shape, has been widely used as a diagnostic characteristic for species or species groups within the genus *Passiflora* (Killip 1938, López-Meruvia *et al.* 1993a, López-Meruvia *et al.* 1993b, Vanderplank 2000, Ulmer & MacDougal 2004, Cervi 2006, Krosnick *et al.* 2009, Souza & Lorenzi 2012, Krosnick *et al.* 2013, Mezzonato-Pires *et al.* 2013). The EFN can be found at the petiole (petiolar nectaries) or in the foliar blade (laminar nectaries), occasionally being found in bracts and stipules (Feuillet & MacDougal 2003, Ulmer & MacDougal 2004).

According to Solereder (1908), the leaves of some species of *Passiflora* and *Adenia* Forssk. can also have glandular spots at the abaxial surface, which have an external appearance of rounded brown spots at the abaxial surface. When observed in cross-section the glandular spots show many layers of elongated epidermal cells at the glandular region, which are followed by a tissue with several crystal formations. When analyzed in a frontal section of the leaf surface, the epidermal cells of the secretory

region show a polygonal outline. The author also suggests that the petiolar glands, which are frequently observed in *Passiflora*, are modifications of these glandular spots.

The petiolar extrafloral nectaries are one of the main characteristics in order to identify *Passiflora* species. They can appear as scars, protrusions, and can also resemble small barrels, trumpets or spoons (Ulmer & MacDougal 2004). Laminar nectaries also occur in various forms, such as glandular marginal teeth, isolated marginal glands, submarginal glands, and as ocellae between the three major veins or even dispersed through the abaxial surface of the foliar blade (Ulmer & MacDougal 2004).

Nectaries are specialized structures that secrete a sugary substance known as nectar (Elias 1983, Pacini & Nicolson 2007), which is mainly composed of sucrose, fructose, amino acids, proteins and other trace components (Fahn 1979, Pacini & Nicolson 2007). In the present study, we use the term EFN for the foliar nectaries found in Passifloraceae, following the nomenclature recommended by Schmid (1988) of using the term “extrafloral nectaries” (EFN) for works that do not verify the function of these glands. The term was initially proposed by Caspary (1848) based solely on the structure positional distinction. Therefore, for the foliar nectaries that occur in Passifloraceae we distinguished this structure based on its position.

An important morphological study carried out by Zimmermann (1932) and completed by Elias (1983) divided the nectaries in seven different types: **formless nectaries** ("Gestaltosennektarien"), **flattened nectaries** ("Flachnektarien"), **pit nectaries** ("Grubbenektarien"), **hollow nectaries** ("Hohlnektarien"), **scale-like nectaries** ("Schuppennektarien"), **elevated nectaries** ("Hochnektarien") (Zimmermann 1932), and **embedded nectaries** ("Einbettennektarien"), this last one identified and added by Elias (1983).

In an extensive work about the species of Passifloraceae in the American continent, Killip (1938) described diverse shapes for the glands found in the species of this family. The ones described as globose, clubbed, patelliform, sessile or stipitate, orbicular, and liguliform were mentioned as elevated nectaries by Zimmermann (1932) and Elias (1983). The ones reported by Killip (1938) as scar-shaped could be described as embedded or flattened nectaries according to the classifications of Zimmermann (1932) and Elias (1983), although in this case a more precise description would be needed. Durkee (1982) characterized the structure of EFN of nine *Passiflora* species. In this study the author points out that petiolar nectaries show a variety of sizes and morphologies, usually distinguishable from the organ where they are found. Thus, they fit the classification of elevated nectaries proposed by Elias (1983). On the other hand, the nectaries of the foliar blade were described as embedded in the abaxial surface of the leaf.

According to Elias (1983) two categories are usually reported for EFN: **non-vascularized nectaries**, which are further divided in two sub-types, the ones without a defined structure, in which the only anatomical evidence is the separation between the epidermis and the sub-adjacent cells due to nectar accumulation, and the one with a defined structure, the most common of which being the scale-like nectaries; **vascularized nectaries**, all of which have a well-defined structure, but vary in shape and size, and are usually bigger than the non-vascularized nectaries (Elias 1983).

Based on the studied already carried out with the EFN in *Passiflora* they could be described as vascularized ones, according to Elias (1983). From an anatomical viewpoint the structure of the EFN in *Passiflora* is quite similar for the already studied species. Therefore, it's possible to distinguish three regions that compose the nectary: glandular epidermis, sub-epidermal parenchyma, and sub-glandular parenchyma

(Durkee 1982, Durkee 1983, Rocha *et al.* 2009, Cardoso-Gustavson 2013, Silva *et al.* 2017), considering that the various authors have used different nomenclature. In these types of nectaries three different and specialized regions are usually recognized as: **nectary epidermis**, where the nectar is liberated to the exterior, stomata and trichomes may be present or absent; **nectary parenchyma** that produces or stores the nectar, and is composed by layers of small and densely stained cells immediately under the epidermis; **subnectary parenchyma**, which has large and less juxtaposed cells (Fahn 1979, Durkee 1983, Nepi 2007).

Besides the presence of nectaries, the occurrence of a glandular type referred to as “gland-tipped hairs”, “sticky glands” and “sticky hairs” is also reported (Killip 1938, Vanderplank 2000, Ulmer & MacDougal 2004, Vanderplank 2013). This glandular type seems to be restricted to some species of the *Dysosmia* DC. section (Solereder 1908) that show a characteristic absence of petiolar glands, which are replaced for the “gland-tipped hairs” (Ulmer & MacDougal 2004, Vanderplank 2013). When working with on development of *Passiflora foetida* L., Roth (1968) described this glandular type as an extrafloral nectary. However, Durkee *et al.* (1984) were not able to find sugars in the chemical composition of the exudate. Although, the authors verified the exudate was soluble in ethanol and xylene, but not in water, and it also had and osmiophilic material within the vacuole of secretory cells. According to the authors, *Passiflora foetida* shows a variability regarding the gland morphology and physiology that can represent a transition from true extrafloral nectaries to lipid secretory glands, thus naming them as resin glands.

In the present study petiolar and laminar glands of leaves from thirty-four species that represent the four subgenera of *Passiflora* are described for their morphology and anatomy. We aimed at highlighting similarities and differences among

the species and the glands of a same species, as well as between nectaries and resin glands.

MATERIALS AND METHODS

Thirty-four species were selected from the subgenera *Astrophea* (DC.) Mast. (1 species), *Deidamiooides* (Harms) Killip (2 species), *Decaloba* (DC.) Rchb. (5 species) and *Passiflora* (26 species) (Table 1). Part of the analyzed species have been cultivated in a greenhouse at the Institute of Biosciences of the University of São Paulo. Another part was obtained from cultivation at Embrapa Cerrados (Brasilia, Federal District, Brazil) or from greenhouses of private collectors. Part of the voucher material was deposited at the Herbarium of the Botany Department at the University of São Paulo (SPF). Voucher numbers of private collectors were also used for information about where the species were sampled (Table 1).

In order to structurally characterize the glands, samples were analyzed through Scanning Electron Microscopy (SEM) and the shape definition was based on the descriptions for solid shaped by Radford *et al.* (1974). Samples were fixed in a 50% solution of formaldehyde-ethanol-acetic acid (FAA 50) for 24 hours (Johansen 1940), dehydrated in ascending ethanol series, and then submitted to critical point drying with carbonic gas (CPD 030, Balzer). After drying, samples were mounted in metal stubs and metalized with gold (Silveira 1989). The analysis was carried out using a QUANTA 250 (FEI COMPANY) Scanning Electron Microscope at the Laboratory for Electron Microscopy of the Santa Cruz State University (UESC, Ilhéus - BA) and using a Zeiss DSM 940 Scanning Electron Microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) at the Institute of Biosciences of the University of São Paulo (IB/USP).

1 Table 1. Distribution, shapes and types of glands in *Passiflora* L. species.

Species	Voucher	Distribution of glands	Glands shapes	Type of glands
Subgenus Astrophea				
<i>P. haematostigma</i> Mart. ex Mast.	R.C.C.Lemos 09	Petiole Margins of leaf blade	Depressed ovoid Elliptic-lenticular	Elevated nectaries Elevated nectaries
Subgenus Decaloba				
<i>P. ferruginea</i> Mast.	R.C.C.Lemos 43	Petiole Abaxial surface of leaf blade	Crateriform Concave ocellus to convex ocellus	Elevated nectaries Flattened nectaries
<i>P. misera</i> Kunth	R.C.C.Lemos 57	Abaxial surface of leaf blade	Concave ocellus to convex ocellus	Flattened nectaries
<i>P. morifolia</i> Mast.	R.C.C.Lemos 62	Petiole	Cotyliform	Elevated nectaries
<i>P. organensis</i> Gardner	R.C.C.Lemos 51	Abaxial surface of leaf blade	Concave ocellus to convex ocellus	Flattened nectaries
<i>P. suberosa</i> L.	R.C.C.Lemos 59	Petiole	Crateriform	Elevated nectaries
Subgenus Deidamiooides				
<i>P. contracta</i> Vitta	R.C.C.Lemos 61	Petiole Abaxial surface of leaf blade	Depressed ovoid Convex ocellus	Elevated nectaries Flattened nectaries
<i>P. deidamiooides</i> Harms	R.C.C.Lemos 31	Petiole Petiolule	Elliptic-patelliform Patelliform	Elevated nectaries Elevated nectaries
Subgenus Passiflora				
<i>Passiflora actinia</i> Hook	R.C.C.Lemos 55	Petiole	Obconic	Elevated nectaries
<i>P. ambigua</i> Hemsl	M. Peixoto 65002	Petiole	Depressed ovoid	Elevated nectaries
<i>P. arida</i> (Mast. & Rose) Killip	R.C.C.Lemos 58	Petiole Dispersed on both surfaces of leaf blade	Terete	Resin glands
<i>P. coccinea</i> Aubl.	R.C.C.Lemos 24	Petiole Abaxial surface of leaf	Lenticular Lenticular	Elevated nectaries Elevated nectaries

blade			
<i>P. edmundoi</i> Sacco	R.C.C.Lemos 32	Petiole	Obconic long-stipated
		Margins of leaf blade	Obconic short-stipated
<i>P. eichleriana</i> Mast.	R.C.C.Lemos 15	Petiole	Obconic short-stipated
		Margins of leaf blade	Elliptic-lenticular
<i>P. elegans</i> Mast.	R.C.C.Lemos 29	Petiole	Obconic
		Margins of leaf blade	Obconic
<i>P. foetida</i> L.	R.C.C.Lemos 48	Petiole	
		Dispersed on both surfaces of leaf blade	Pyriforme long-stipated
<i>P. galbana</i> Mast.	R.C.C.Lemos 45	Petiole	Lenticular
		Margins of leaf blade	Convex ocellus
<i>P. gardneri</i> Mast.	R.C.C.Lemos 44	Margins of leaf blade	Lenticular
		Petiole	Elliptic-patelliform
<i>P. incarnata</i> L.	R.C.C.Lemos 60	Margins of leaf blade	Elliptic-patelliform
		Petiole	Obconic long-stipated
<i>P. kermesina</i> Link & Otto	R.C.C.Lemos 50	Margins of leaf blade	Obconic
		Petiole	
<i>P. laurifolia</i> L.	R.C.C.Lemos 18	Depressed ovoid	Elevated nectaries
		Petiole	Obconic asymmetric long-stipated
<i>P. ligularis</i> Juss.	R.C.C.Lemos 56	Petiole	Elevated nectaries
		Margins of leaf blade	Lenticular
<i>P. maliformis</i> L.	R.C.C.Lemos 30	Petiole	Obconic
		Margins of leaf blade	
<i>P. miersii</i> Mart.	R.C.C.Lemos 37	Petiole	Elevated nectaries
		Margins of leaf blade	Lenticular
<i>P. odontophylla</i> Harms ex Glaz	R.C.C.Lemos 20	Petiole	Depressed ovoid
		Margins of leaf blade	Convex ocellus
<i>P. racemosa</i> Brot.	R.C.C.Lemos 4	Petiole	Depressed ovoid
		Petiole	Elevated nectaries
<i>P. serratodigitata</i> L.	R.C.C.Lemos 42	Petiole	Cotyliform
		Margins of leaf blade	Elliptic-lenticular to semi-spheroid
<i>P. setacea</i> DC.	R.C.C.Lemos 26	Petiole	Elevated nectaries
		Petiole	Lenticular
<i>P. sidifolia</i> M. Roem.	R.C.C.Lemos 17	Petiole	Obconic short-stipated
		Margins of leaf blade	Lenticular to elliptic-lenticular
<i>P. sub lanceolata</i> (Killip)	R.C.C.Lemos 41	Petiole	Clavate
			Resin glands

MacDougal		Dispersed on both surfaces of leaf blade	Capitate long-stipated	Resin glands
		Margins of leaf blade	Clavate	Resin glands
<i>P. subrotunda</i> Mast.	R.C.C.Lemos 23	Petiole	Obconic	Elevated nectaries
		Margins of leaf blade	Lenticular	Elevated nectaries
<i>P. umbilicata</i> (Griseb.) Harms		Margins of leaf blade	Elliptic-lenticular	Elevated nectaries
		Petiole		
<i>P. villosa</i> Vell.	R.C.C.Lemos 33	Dispersed on both surfaces of leaf blade	Terete	Resin glands
		Petiole	Obconic short-stipated	Elevated nectaries
<i>P. watsoniana</i> Mast.	R.C.C.Lemos 46	Margins of leaf blade	Semi-spheroid	Elevated nectaries

For the anatomical analysis, samples of petiolar and laminar glands were fixed in FAA 50 for 24 hours (Johansen 1940) and subsequently stored in a 70% ethanol solution. The material was dehydrated in a butanol series (Ruzin 1999) and embedded in Paraplast (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). Longitudinal anatomical sections of the glands varying from 8 to 12 µm thick were cut in a Reihertt-Jung Auto Cut 2040 rotatory microtome and mounted in permanent slides. Material was double stained with a 1% safranin solution in 50% ethanol and a 1% Astra blue solution, and mounted in permanent slides with Canada balsam (Gerlach 1984). Photographic data acquisition was carried out by using a Leica DMLB microscope coupled to a Leica DFC 310FX camera and by using the IM50 software at the Plant Anatomy Laboratory (IB/USP).

In order to analyze the presence of sugars in the secretion of foliar glands, glucose strip test was used (Inlab Diagnóstica— Alamar Tecno Científica Ltda.) for the species cultivated at the Institute of Biosciences of the University of São Paulo. The same method was used for the species *Passiflora sublanceolata* (Killip) MacDougal cultivated in a *Passiflora* active germplasm bank at UESC (BAG-Passifloras).

RESULTS

In the studied species of *Passiflora*, glands were found in the petioles (petiolar glands), at the margin of the leaf blade (marginal glands), on the abaxial face of the leaf blade and/or dispersed on both sides of the foliar blade (laminar glands). In a same specie glands may occur in more than one region, and the most common combination observed was the presence of petiolar and marginal glands on the same leaf (Table 1).

Based on the results of morphological, anatomical and glucose strip tests (Fig 1), the foliar secretory glands in *Passiflora* are grouped into two categories: 1) Nectaries, which can be elevated or plane; and 2) Resin Glands (Table 1).

Nectaries – leaf glands that have a sugar content high enough to be detected by glucose strip test analysis (Fig 1). The nectaries are anatomically formed by palisade secretory epidermis, which is usually multi-layered, followed by secretory parenchymal cells (formed by juxtaposed cells with dense content), and filled by non-secretory parenchyma cells with large cells with a loose arrangement. Two patterns are morphologically described. Pattern I – which can be well-structured pectoral and marginal ones, with evident projection in relation to the foliar tissue; Pattern II – abaxial surface of leaf blade and marginal glands with tissue closely pressed against the leaf blade tissue, and with a poorly evident projection.

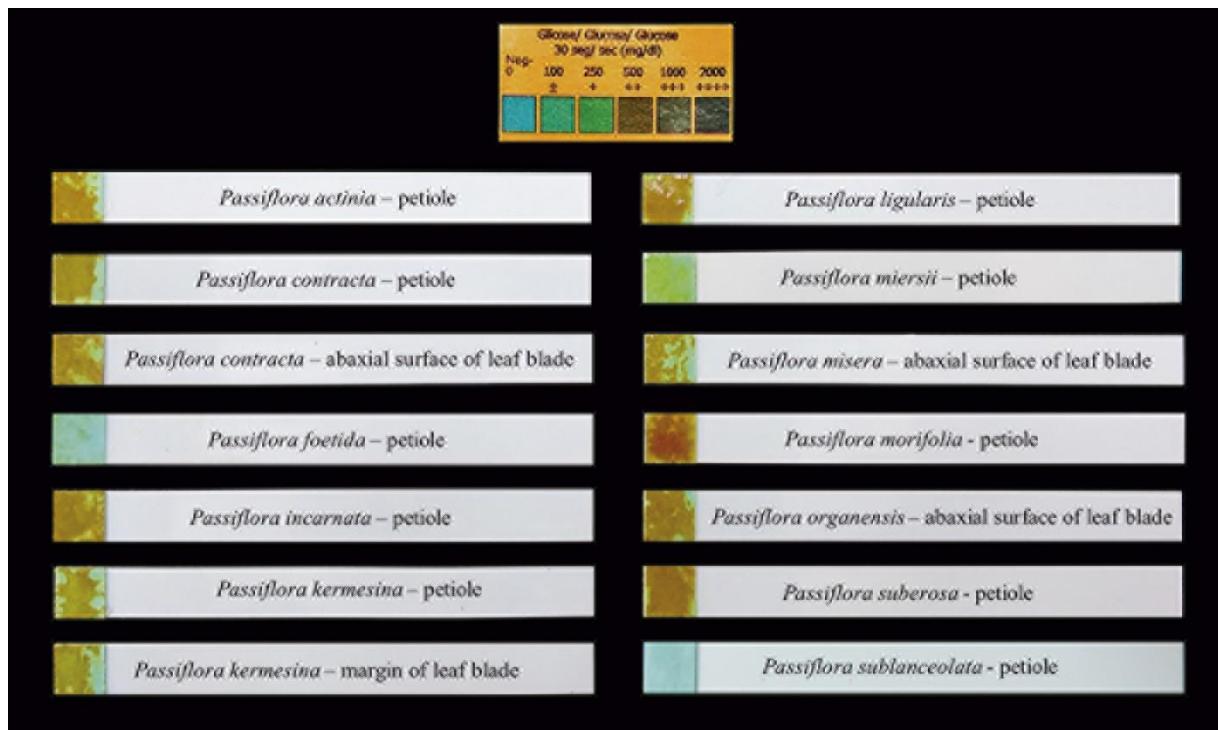


Figure 1. Glucose strip tests of glands in leaves of *Passiflora* L. Positive results are shown for extrafloral nectaries located on: petiole of *Passiflora actinia* Hook, petiole and abaxial surface of leaf blade of *P. contracta* Vitta, petiole of *P. incarnata* L., petiole and margin of 40

leaf blade of *P. kermesina* Link & Otto, petiole of *P. ligularis* Juss., petiole of *P. miersii* Mart., abaxial surface of leaf blade of *P. misera* Kunth, petiole of *P. morifolia* Mast., abaxial surface of leaf blade of *P. organensis* Gardner and petiole of *P. suberosa* L. Negative results are shown for resin glands of *P. foetida* L. and *P. sublanceolata* (Killip) MacDougal.

In **pattern I**, several forms can be found. In *Passiflora deidamoides* the glands found in the petiolule are patelliform, i.e. sessile, rounded and have a slight depression in the central region (Fig 2A). On the other hand, the glands of the petiole are more elongated with an elliptic-patelliform shape, and have a more evident depression in the central region (Fig 2B). This elliptic-patelliform shape also occurs in petiolar and marginal glands of *P. incarnata* (Figs 2C-D), in which the central depression becomes more evident as the gland expands. In the early stages of expansion, the glands are small and did not initiate the secretion process (Fig 2E). In an intermediate stage of development secretion is already initiated and accumulated under the cuticle (Fig 2F). Cuticle ruptured was observed in some of the analyzed glands (Fig 2C).

The petiolar glands of *P. coccinea*, *P. galbana*, *P. maliformis* and *P. setacea*, and the marginal glands of *P. coccinea*, *P. gardneri*, *P. miersii*, *P. sidifolia* and *P. subrotunda* are lenticular ones (Figs 2G-O). The lenticular glands resemble the patelliform shape, given that they also are sessile and rounded. However, lenticular glands do not present a central depression, but are straight to slightly convex in that region. In some glands, a distension of the cuticle occurs, probably due to the accumulation of secretion under the cuticle (Figs 2J and 2M).

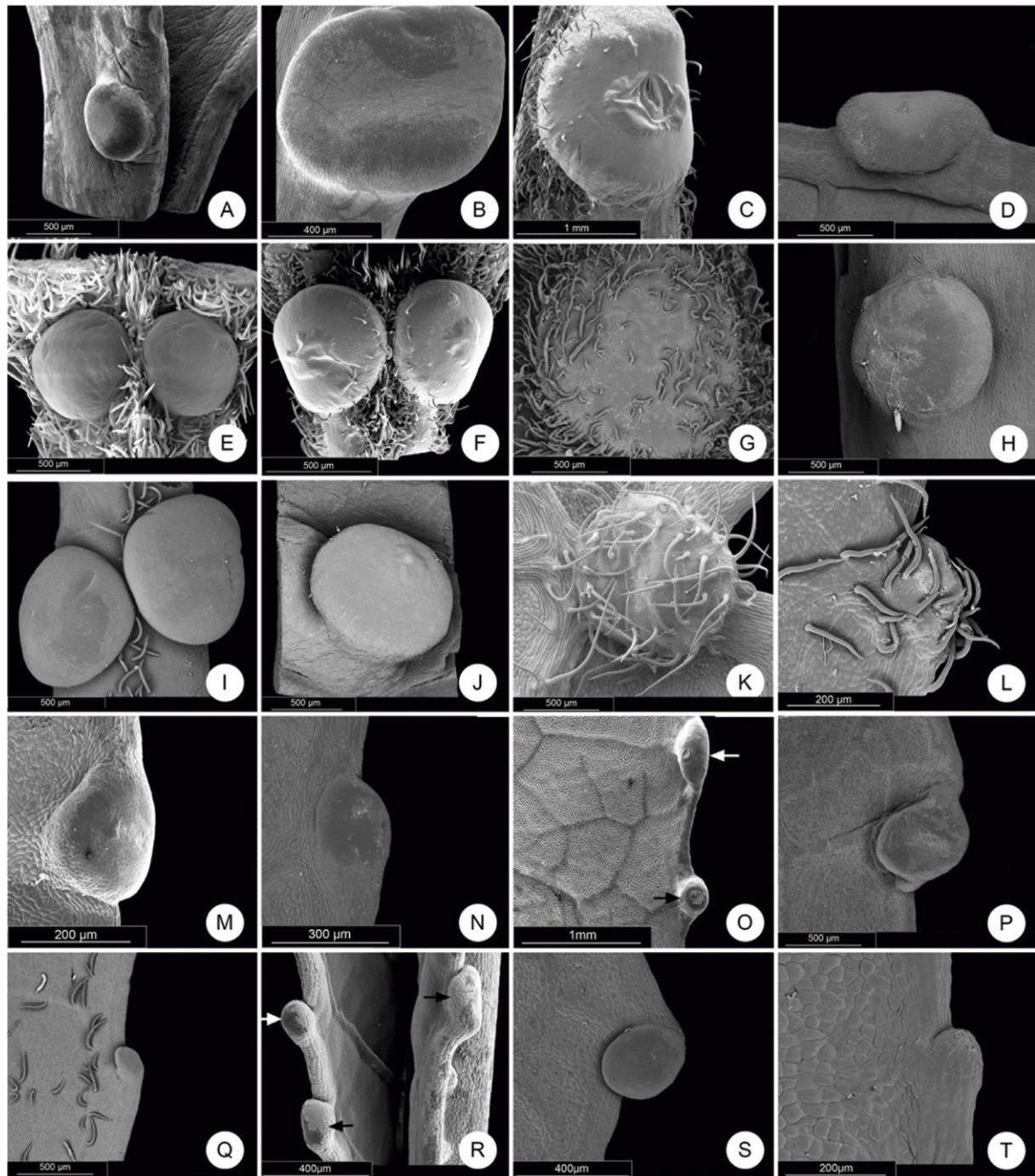
In *Passiflora sidifolia* (Fig 2O) the marginal glands have different shapes, some of them are more elongated than the glands previously described, thus being called elliptic-lenticular glands. This form also occurs in the marginal glands of *P. eichleriana*, *P.*

haematostigma, *P. serratodigitata* and *P. umbilicata* (Figs 2P-S). Besides having elliptic-lenticular glands in the leaf margins, *Passiflora serratodigitata* (Fig 2R) may also have semi-spheroid glands in this region. This shape is also found in the marginal glands of *P. watsoniana* (Fig 2T). These glands are sessile, circular, and convex on the face facing outside.

Figure 2. SEM image of the different types of glands in leaves of *Passiflora* L. (A)

Patelliform gland of petiolule in *P. deidamoides* Harms. (B-J) Petiolar glands. (B-F) Elliptic-patelliform gland in *P. deidamoides* Harms (B) and *P. incarnata* L., respectively (C-F). (G-K) Lenticular gland of *P. coccinea* Aubl., *P. galbana* Mast., *P. maliformis* L., *P. setacea* DC. and *P. coccinea* Aubl., respectively. (L-T) Marginal glands of leaf blade. (L-N) Lenticular gland in *P. gardneri* Mast., *P. miersii* Mart. and *P. subrotunda* Mast., respectively. (O) Lenticular gland (black arrow) and elliptic-lenticular gland (white arrow) in *P. sidifolia* M. Roem. (P-S) Elliptic-lenticular glands in *P. eichleriana* Mast., *P. haematostigma* Mart. ex Mast., *P. serratodigitata* L. (black arrow) and *P. umbilicata* (Griseb.) Harms, respectively. (T) Semi-spheroid gland in *P. serratodigitata* (white arrow).

(T) Semi-spheroid gland in *P. watsoniana* Mast.



A shape that is slightly different from the ones previously mentioned is the depressed ovoid shape, which occurs in the petiolar glands of *P. ambigua*, *P. contracta*, *P. haematostigma*, *P. laurifolia*, *P. odontophylla* and *P. racemosa* (Figs 3A-F). These glands are sessile, more elongated in their longitudinal axis, have a convex central region, and their margins join gently to the petiole. In *P. haematostigma* and *P. odontophylla* (Figs 3C and 3E) trichomes were observed in the glandular region, most abundantly in *P. haematostigma*.

The petiolar glands of *P. actinia*, *P. elegans*, *P. miersii*, *P. subrotunda* (Figs 3G-J), as well as the marginal glands of *P. elegans* and *P. kermesina* (Figs. 3K-L) are sessile and have the obconical shape, i.e. they are circular and slightly tapered towards the insertion in the petiole, the apex being flattened or slightly convex. In *P. actinia*, there is a curvature towards the abaxial region of the petiole (Fig 3G).

Similarly, to the previous format, there are the obconical short-stipited glands, in which a short stalk that ends in an obconical shape. These glands occur in the petiole of *P. eichleriana*, *P. sidifolia* (in this case it makes a curvature towards the abaxial region of the petiole), *P. watsoniana* (Figs 3M-O) and in the leaf margin of *P. edmundoi* (Fig 3P).

The obconical long-stipited gland occurs on the petiole of *P. edmundoi* and *P. kermesina* (Figs 4A-B). In *P. ligularis* there is a variation of this type of gland, in which a long stalk ends in a nearly obconical shape, but that does not insert itself centrally in the stalk; this gland was determined as obconical asymmetric long-stipited (Fig 4C).

In *Passiflora morifolia* (Figs 4D-E) and *P. serratodigitata* (Figs 4F-G), the petiolar glands show a very short stalk ending in a cotyliform shape, in which the central region is deep and the margins of the glands form the shape of a cup. At the beginning of the development of the gland observed in *P. morifolia*, where the central region is not deep, there

is the onset of secretory accumulation in the central region (Fig 4E). At the beginning of their development, the petiolar glands of *P. serratodigitata* have a nearly crateriform shape with a small concavity. At this stage, the gland is not active (Fig 4G).

The crateriform shape occurs in the stipated petiolar glands with a short stalk observed in *P. ferruginea* and *P. suberosa*, which are circular and flat, with a shallow depression in the central region (Figs 4H-I). At the beginning of their development the glands of *P. suberosa* show a completely flat surface (Fig 4J). In a posterior phase, it is possible to observe a small depression in the center of the gland and the beginning of the accumulation of secretion under the cuticle (Fig 4I).

Among the **nectaries that follow pattern II**, the glands on abaxial surface of leaf blade show the form of a rounded spot, which may form a slight depression, called concave ocellus, or a slight bulging, called convex ocellus (Figs 4K-N). In *Passiflora contracta*, *P. ferruginea*, *P. misera*, and *P. organensis* there are ocellus concave glands (Figs 4K-L) usually observed in the region among the main vascular bundles at the base of the foliar lade, as well as convex ocellus glands (Fig 4M) dispersed in the foliar blade. In *P. contracta* the glands on abaxial surface of leaf blade are ocellus concave shape only (Fig 4N). Convex ocellus glands also occur at the margin of the leaf blade in *P. galbana* and *P. odontophylla* (Figs 4O-P). These glands are minute and hardly recognizable to the naked eye.

The secretory epidermis is usually located in the central region of the glands, in some cases restricted to either one of the sides, occupying a region that is proportionally small regarding the total size of the glandular projection (S1-S4 Fig). The cuticle usually forms a subcuticular space that can accumulate secretion (Figs. 5A-B). In some species, the rupture of the cuticle was observed. Epidermal cells are generally elongated in the anticlinal direction, but they may vary from short to elongated (Figs. 5C-H, S1 Table). The nuclei are relatively

large, usually centralized (Figs 5A-C and 5G), and the cell contents are dense with large vacuoles or innumerable small vacuoles. The number of cells constituting the secretory epidermis can be variable in the same species and even in the same gland (S1 Table). In *P. racemosa* there is a predominance of single layer of elongated cells forming the secretory epidermis. However, regions with more than one layer are often found (Fig 5I). The non-secretory epidermis shows only one layer of cells with a slightly evident nucleus and a large vacuole (Figs 5A and 5H).

Multicellular and unicellular trichomes can be found in the secretory region of the epidermis in *P. coccinea* and *P. haematostigma*, respectively (Figs 5E and 5J-K). Extensions of the sub-epidermal parenchyma occur in the regions underlying the base of the trichomes. Internally to the epidermis, the secretory parenchyma is usually formed by small cells with an evident nucleus and dense content, whereas in more mature glands these cells can be flattened (Figs 5C, 5F-G, 5J, 5L and 6A-F). In some species, the border between this region and the cells of the non-secretory parenchyma is unclear. In *P. haematostigma* the cells are slightly smaller and more juxtaposed than the innermost layers, and apparently derived from the hypodermis by periclinal divisions (Fig 6G). In *P. laurifolia*, the younger glands have a less clear secretory parenchyma, and in glands fully developed, there are cells with a dense content and are smaller than the cells of the non-secreting parenchyma (Figs 6H-I).

In general, the secretory parenchyma does not present druses or vascular endings. Nevertheless, vascular endings formed only by phloem occur in inner layers of the secretory parenchyma in *Passiflora ferruginea* and *P. suberosa* (Figs. 6J and 5D). Druses also occur in some species, such as *P. ferruginea*, *P. morifolia*, *P. setacea*, *P. incarnata*, *P. laurifolia*, *P. maliformis*, *P. odontophylla* (petiolar gland) and *P. racemosa* (Figs 5A-F, 5H-L 6A-L, S1 Table).

The innermost region of the glands is formed by non-secreting parenchyma with vascular bundles and innumerable idioblasts with druses (Figs. 5A-F, 5H-L and 6A-L). This region is the most variable one in extension, as it can form projections of the glands (S1-S4 Fig). In general, in marginal glands its extension is limited to a few layers of cells, being very short in the marginal gland of *P. watsoniana*. In petiolar glands it can be very extensive, especially in *P. ligularis* (S3 Fig D). In glands of abaxial surface of leaf blade, the non-secretory parenchyma takes the place of the palisade parenchyma that is present in the rest of the foliar blade, thus forming a very distinct region of palisade parenchyma with rounded cells and large vacuoles occupying most of the cells (Figs 7A-D).

The vascularization of the glands occurs until the region of the non-secretory parenchyma consisted of collateral bundles. However, in most species the endings are solely constituted of phloem cells (Figs 5C, 5F and 6B). Meanwhile, In *P. gardneri* vascular endings are composed of both phloem and xylem (Fig 7E).

In petiolar glands, the vascularization can show many ramifications (Fig 7E) or a single bundle, like the marginal glands (Fig 5B and 6F). In the glands of abaxial surface of leaf blade, the general vascularization runs parallel to the leaf surface, with the phloem tissue closer to the secretory tissue (Fig 7D).

Resin glands - a single pattern was observed for resin glands, which did not show a positive reaction to the glucose strip test. These glands may be found in the petiole or across the entire foliar blade, showing a minute size, and thus being easily mistaken by trichomes. Anatomically, the resin glands have secretory epidermis with a single layer of anticlinally elongated cells. There is no distinction between secretory and non-secreting parenchyma.

In *P. arida* and *P. villosa* the petiolar and laminar glands found on both sides and on the margin of the leaves are elongated, with trichomes along the stalk and with a rounded apex (Figs 8A-B). They are termed “terete” ones.

On the other hand, the petiolar and laminar glands of *Passiflora foetida* that were termed pyriform long-stipated do not present trichomes in their long stalks, but the termination is globose with an acuminate apex (Fig 8C). Very similar to these ones, there are the non-marginal laminar glands of *P. sublanceolata*, which differ in the globular, non-pyriform termination observed in the previous one. They receive the denomination of capped long-stipated (Fig 8E). In *Passiflora sublanceolata* there also are clubbed glands at the margins of the leaf blade and in the petiole (Figs 8E-F).

In these species, the glands are elongated with the secretory region restricted to the apex, and formed by anticlinally elongated epidermal cells (Figs 9A-J). The epidermal cells of the stalk region are periclinally elongated, short in the antecinal direction (Figs 9C and 9H-I), and in *P. arida* and *P. villosa* there are also trichomes along it. The inner region has few layers of parenchyma cells, some of them with druses (Fig 9E). The vascular system is central and it has xylem and phloem terminations. In *P. foetida* there is a gradual tapering in the secretory region, which ends with two apical-most cells (Fig 9E). In *P. sublanceolata*, the petiolar glands have a broader secretory region that extends almost to the middle part of the gland (Fig 9F). In addition, the sub-epidermal cells are wider in the petiolar glands of *P. sublanceolata* (Fig 9G) and it has scarcer druses than in *P. foetida*. In *P. arida* the secretory region is more restricted, with shorter secretory cells that have thin walls (Figs 9A-B).

In *P. villosa* some secretory epidermal cells divide (Fig 9J), although a multi-seriate epidermis does not occur as it does in species that have nectaries. In the sub-epidermal layers lignified parenchyma cells occur in the more developed glands (Fig 9I-J).

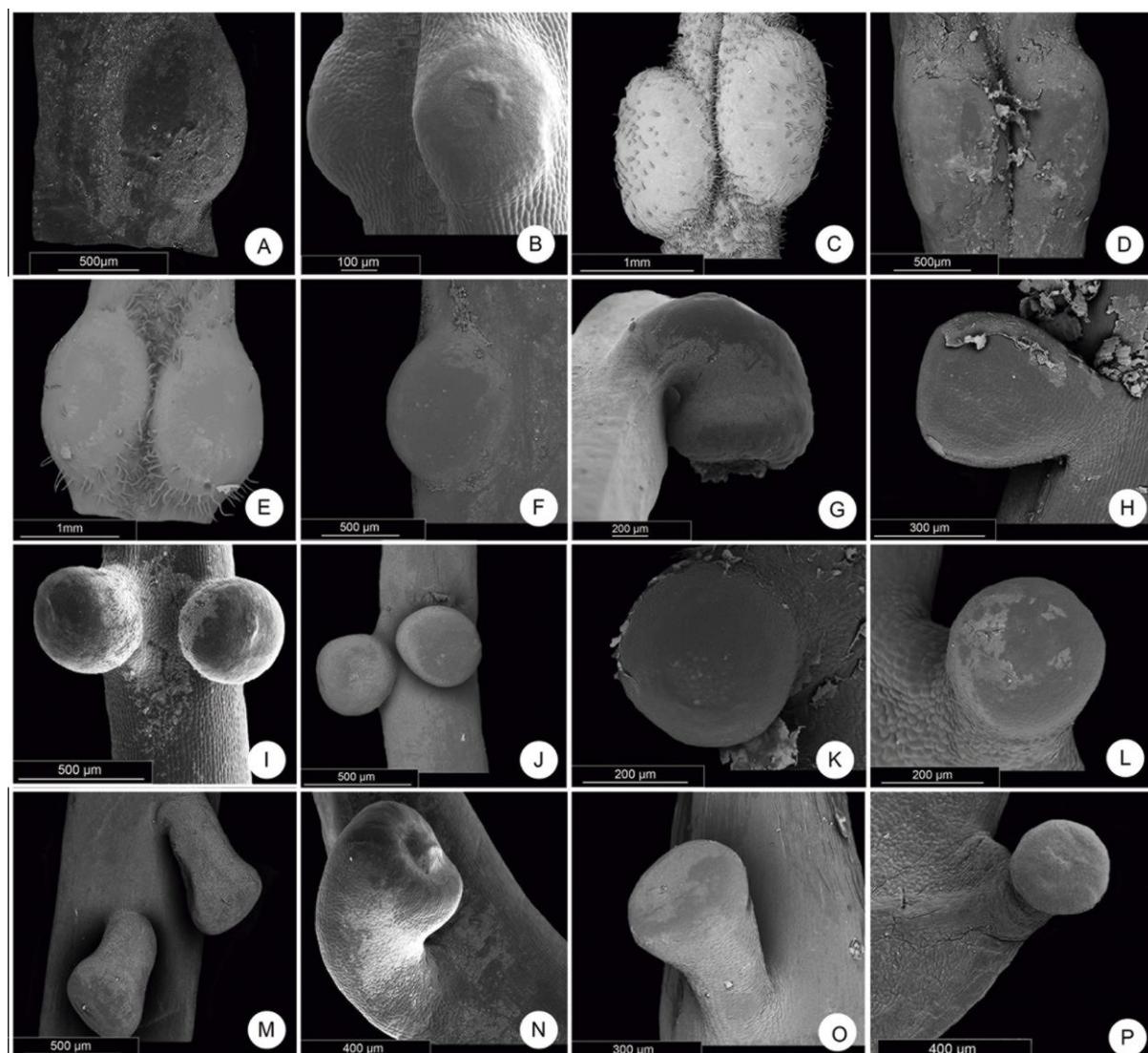


Figure 3. SEM image of the different types of glands in leaves of *Passiflora* L. (A-J)
 Petiolar glands. (A-F) Depressed ovoid glands in *P. ambigua* Hemsl., *P. contracta* Vitta, *P. haematostigma* Mart. ex Mast., *P. laurifolia* L., *P. odontophylla* Harms ex Glaz and *P. racemosa* Brot., respectively. (G-J) Obconic glands on petiole of *Passiflora actinia* Hook, *P. elegans* Mast., *P. miersii* Mart. and *P. subrotunda* Mast., respectively. (K-L) Detail of obconic gland on margin of leaf blade in *P. elegans* Mast. and *P. kermesina* Link & Otto, respectively. (M-O) Obconic short-stipited glands on petiole of *P. eichleriana* Mast., *P. sidifolia* M. Roem. and *P. watsoniana* Mast., respectively. (P) Obconic short-stipited gland on the margins of leaf blade in *P. edmundoi* Sacco.

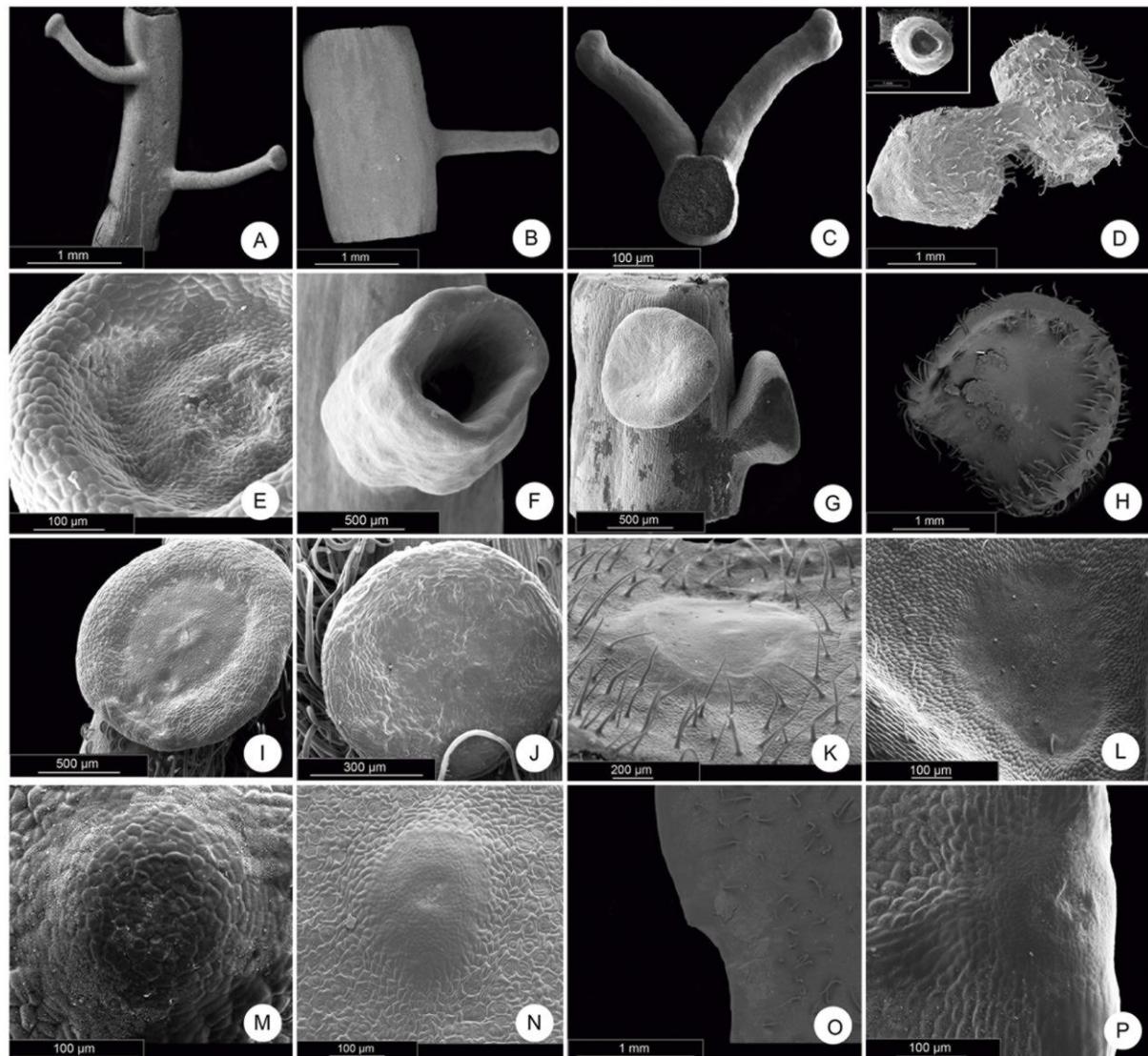


Figure 4. SEM image of the different types of glands in leaves of *Passiflora* L. (A-B) Obconic long-stipated glands on petiole of *P. edmundoi* Sacco and *P. kermesina* Link & Otto. C. Asymmetric long-stipitate on petiole of *P. ligularis* Juss. D-G. Cotyliform petiolar glands in *P. morifolia* Mast. (D-E) and *P. serratodigitata* L. (F-G). H-J. Crateriform petiolar gland in *P. ferruginea* Mast. (H) and *P. suberosa* L. (I-J). K-L. Detail of concave ocellus glands on abaxial surface of leaf blade in *P. ferruginea* Mast. L. and *P. misera* Kunth, respectively. M-N. Detail of convex ocellus glands on abaxial surface of leaf blade in *P. organensis* Gardner Vitta and *P. contracta*, respectively. O-P. Detail of convex ocellus glands on margin of leaf blade in *P. galbana* Mast.

Figure 5. Longitudinal sections of extrafloral nectaries (EFN) in *Passiflora* L. (A) Petiolar EFN of *Passiflora actinia* Hook., showing subcuticular space (arrow). (B) Marginal EFN of *P. incarnata* L., note secretion in the subcuticular space and nuclei centralized in secretory epidermal cell. (C) EFN in the petiolule of *P. deidamoides* Harms., showing the short secretory epidermal cells and secretory parenchyma. (D-J) Peciolar EFNs. (D) *P. suberosa* L. with short secretory epidermal cells. (E) *P. haematostigma* Mart. ex Mast. with elongated secretory epidermal cells. Note one unicellular trichome (arrow). (F) *P. incarnata* with elongated secretory epidermal cells and secretory parenchyma with flattened cells, note the vascular bundle ending with phloem cells (arrow). (G) *P. eichleriana* Mast. elongated secretory epidermal cells and secretory parenchyma with flattened cells. (H-I) EFN in *P. ligularis* Juss. and *P. racemosa* Brot., respectively, showing elongated secretory epidermal cells. Note regions with two layers of cells (arrow) in *P. racemosa* Brot.. (J) Extensions of the sub-epidermal parenchyma (arrow) and multicellular trichomes in *P. coccinea* Aubl. (K) Multicellular trichome in laminar EFN of *P. coccinea* Aubl. (L) Petiolar EFN of *P. deidamoides*, showing secretory parenchyma cells and non-secreting parenchyma with vascular bundles. Ep = epidermis, Sp = secretory parenchyma.

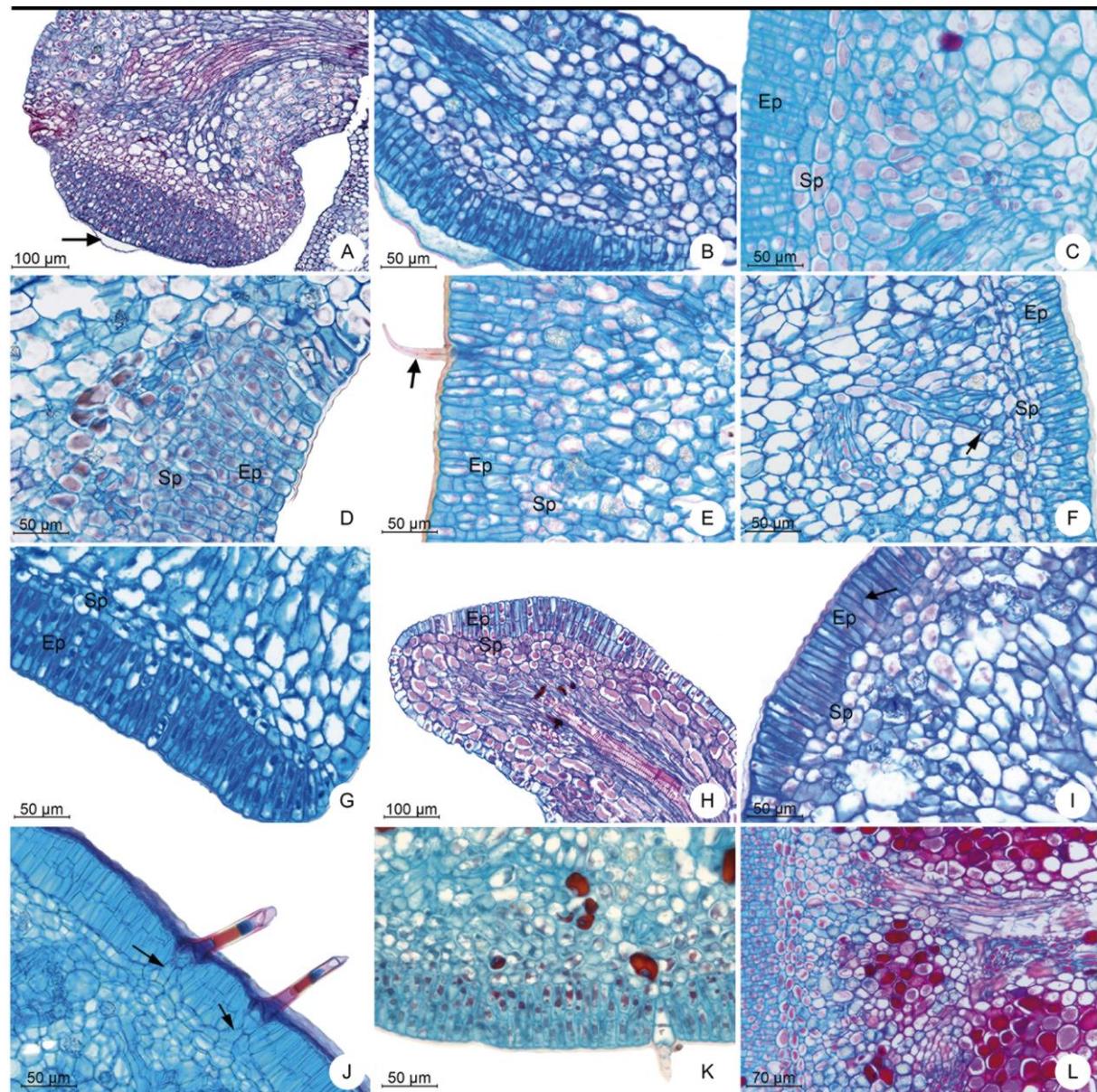
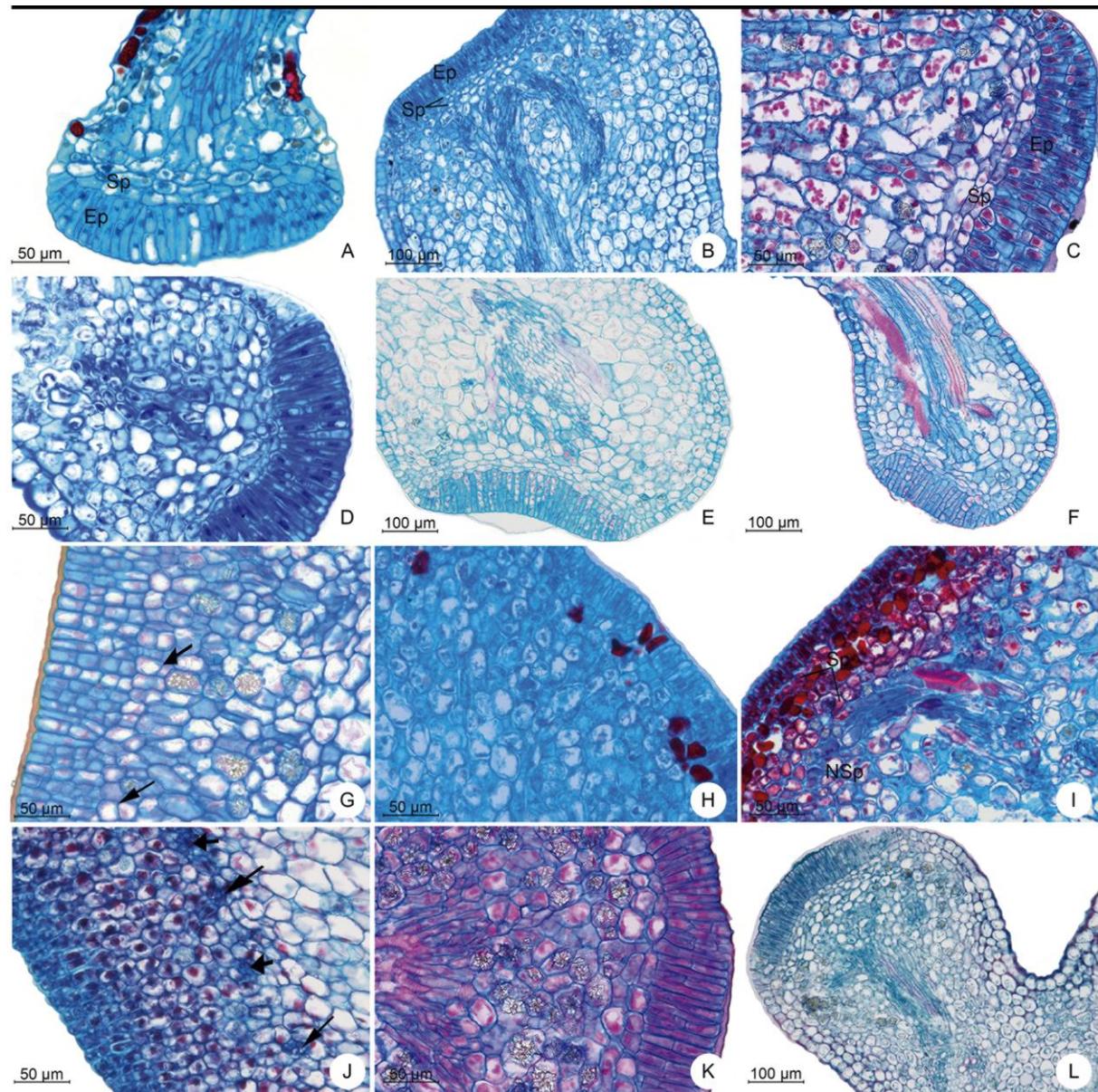


Figure 6. Longitudinal sections of extrafloral nectaries (EFN) in *Passiflora* L. (A) EFN on the margin of leaf blade of *P. edmundoi* Sacco with elongated secretory epidermal cells and secretory parenchyma with flattened cells. (B) Petiolar EFN of *P. gabana* Mast. with elongated secretory epidermal cells and vascular band ending with phloem cells in the non-secreting parenchyma. (C) Petiolar EFN of *P. kermesina* Link & Otto with elongated secretory epidermal cells and secretory parenchyma with flattened cells. Note druses on the non-secreting parenchyma. (D) EFN on the margin of leaf blade of *P. miersii* Mart. with elongated secretory epidermal cells. (E-F) EFN in *P. sidifolia* M. Roem. showing elongated secretory epidermal cells and secretory parenchyma with flattened cells on petiole (E) and margin of leaf blade (F). (G-L) Petiolar EFNs. (G) *P. haematostigma* Mart. ex Mast. With elongated epidermal cells, cells of the secretory parenchyma slightly smaller and more juxtaposed than the layers of the non-secreting parenchyma, note periclinal divisions on the secretory parenchyma (arrow). (H-I) Different stages of EFN in *P. laurifolia* L. (H) Younger glands without clear limits between secretory parenchyma and no-secreting parenchyma. (I) Fully developed gland showing cells with a dense content smaller than the cells of the non-secreting parenchyma. (J) *P. ferruginea* Mast., showing extensive secretory parenchyma and vascular endings formed by phloem cells (arrow). (K-L). *P. subrotunda* Mast. (K) and *P. miersii* (L) showing elongated secretory epidermal cells, and druses on the non-secreting parenchyma. Ep = epidermis, Sp = secretory parenchyma, Nsp = non-secretory parenchyma.



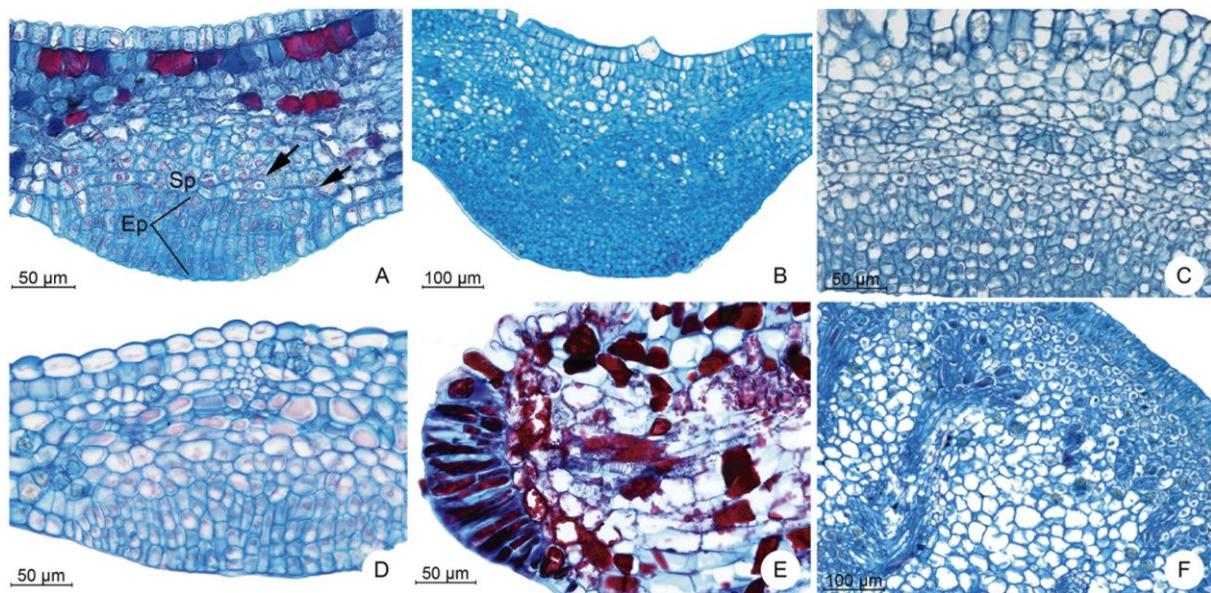


Figure 7. Longitudinal sections of extrafloral nectaries (EFN) in *Passiflora* L. (A-D) EFNs on the abaxial surface of leaf blade. (A) Elongated secretory epidermal cells and druses on secretory parenchyma (arrow) in *P. contracta* Vitta. (B-D) Short secretory epidermal cells in *P. ferruginea* Mat., *P. misera* Kunth and *P. organensis* Gardner, respectively. (E) EFN on the margin of leaf blade of *P. gardneri* Mast. with vascular ending composed of both phloem and xylem cells. (F) Petiolar EFN of *P. setacea* DC. showing the vascularization with ramifications. Ep = epidermis, Sp = secretory parenchyma.

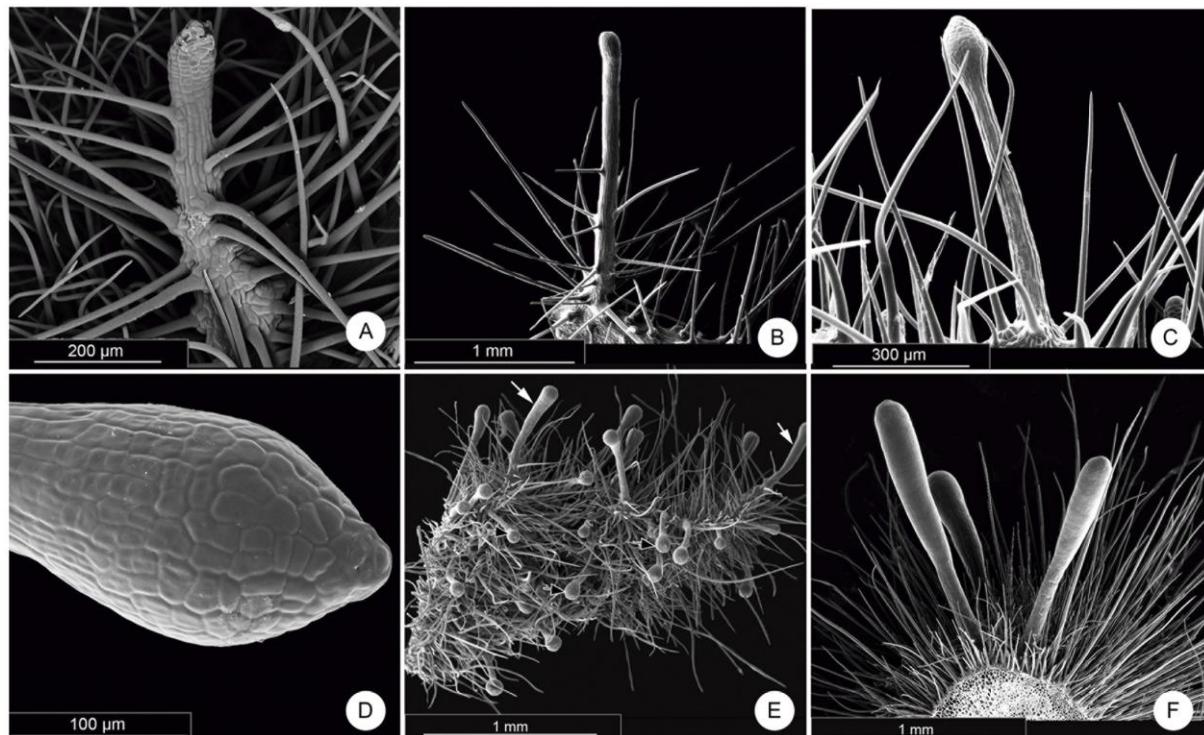


Figure 8. SEM image of the different types of resin glands in leaves of *Passiflora* L. (A-B) Terete gland with trichomes along the stalk in *P. arida* (Mast. & Rose) Killip. and *P. villosa* Vell., respectively. (C-D) Pyriforme long-stipated gland on petiole in *P. foetida* L. Detail of capitulate apical region (D). (E) Capitate long-stipated (black arrow) and clavate (white arrow) glands on the lamina in *P. sublanceolata* (Killip) MacDougal. (F) Detail of clavate glands on petiole of *P. sublanceolata* (Killip) MacDougal.

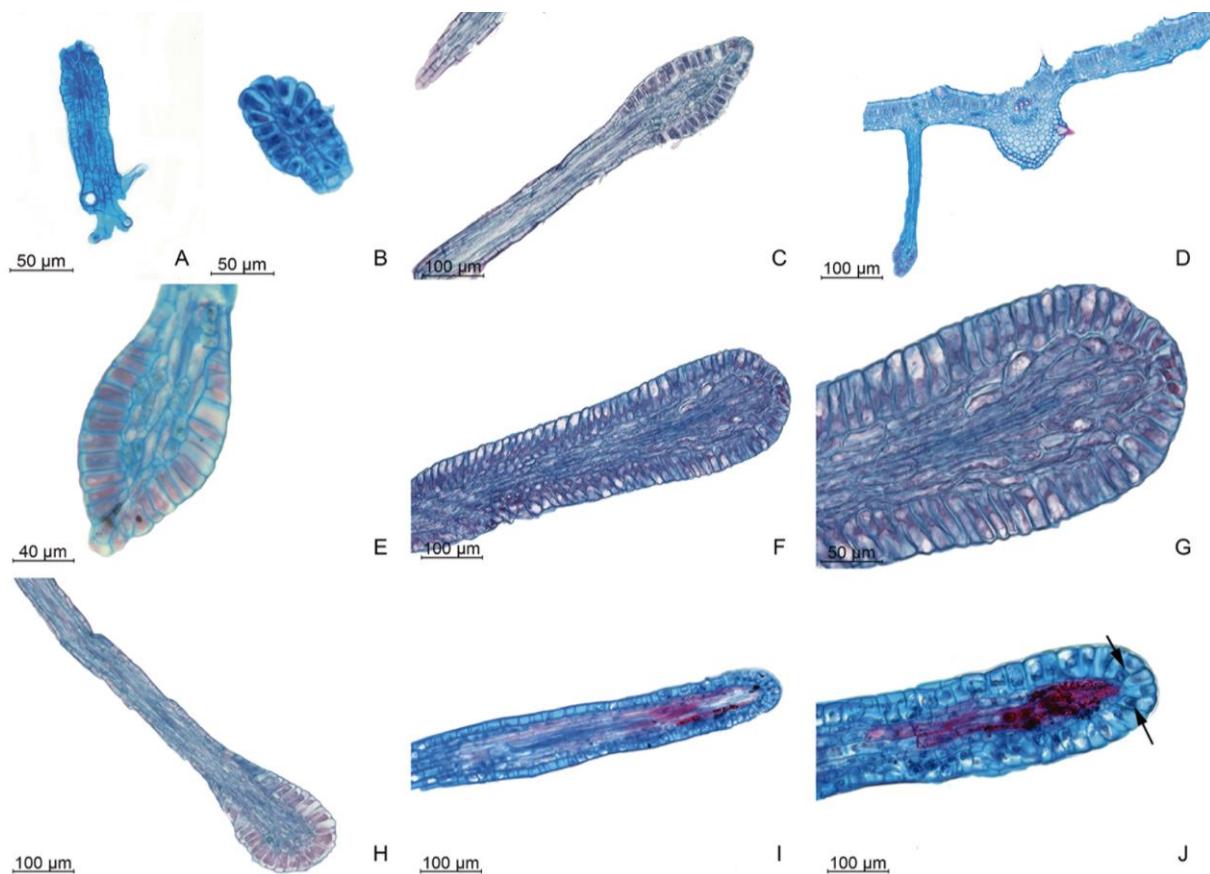


Figure 9. Longitudinal sections of resin glands in *Passiflora* L. In all cases, the secretory region is restricted to elongated epidermal cells. (A-C) Petiolar gland of *P. arida* (Mast. & Rose) Killip (A-B) and *P. foetida* L. (C). (D-E) Laminar resin gland in *P. foetida* L. (E) Detail of elongated epidermal cells. (F-G) Petiolar resin gland in *P. sublanceolata* (Killip) MacDougal. (H) Laminar resin gland in *P. sublanceolata* (Killip) MacDougal. (I-J) *P. villosa* Vell. With lignified parenchyma cells, note secretory epidermal cells dividing (arrow).

DISCUSSION

The comparative study of the studied species' morphology revealed a great variety of forms among the extrafloral secretory glands, being possible to classify them in distinct groups: the nectaries and the resin glands.

Nectar secreting glands are present in some form in *Passiflora*, with few exceptions (Killip 1938, Vanderplank 2000) and the presence of extrafloral nectaries in Passifloraceae, as well as their shape, position and number, has been used as an important diagnostic feature for species or groups of species within the family (Killip 1938, López-Meruvia *et al.* 1993a, López-Meruvia *et al.* 1993b, Vanderplank 2000, Ulmer & MacDougal 2004, Cervi 2006, Krosnick *et al.* 2009, Souza & Lorenzi 2012, Krosnick *et al.* 2013, Mezzonato-Pires *et al.* 2013). EFN can occur as protuberances on the petiole, and may resemble small barrels, trumpets or spoons; along the margin of the leaf blade, bracts or stipules; or as ocellus on the abaxial surface of the leaves (Killip 1938, Feuillet & MacDougal 2004, Ulmer & Macdougal 2004).

As for the distribution of the extrafloral nectaries, the subgenera show the following features: *Astrophea* has two petiolar nectaries near the leaf blade and the absence of nectaries in the leaf blade; *Deidamiods* has two petiolar nectaries and the absence of nectaries in the leaf blade, or a presence of inconspicuous nectaries at the margin of the leaf blade; *Decaloba* has two (rarely more than four) petiolar nectaries, when present, and leaf blades with nectaries in the shape of spots; *Passiflora* has two to six petiolar nectaries (rarely absent or more than six ones), and in the foliar blades nectaries may be absent or present (marginal ones) (Feuillet & MacDougal 2004, Ulmer & Macdougal 2004); and *Tetrapathea* has petiolar nectaries that, when present, are up to two per petiole, in ovoid, sub-sessile or crateriform shapes, and up to eight laminar nectaries, when present, that are ovoid and in some cases inserted in pairs

between the median and primary veins at the base of the leaf blade, or even dispersed along the major veins (Krosnick *et al.* 2009).

Among the analyzed species there is a great morphological diversity in the glands of the subgenus *Passiflora*, many of them with petiolar and laminar glands in the same specimen. As mentioned in the description of the subgenus, the laminar glands observed in the present study were all marginal ones. Still, Silva *et al.* (2017) reported the occurrence of ocellus extrafloral nectars on abaxial surface of leaf blade in at least one species of the subgenus *Passiflora*, *P. glandulosa* Cav. In the subgenus *Decaloba*, the analyzed species tend to have only one type of gland, either petiolar or dorso-laminar, except for *P. ferruginea*, which has petiolar glands and ocellus glands on abaxial surface of leaf blade. The two analyzed species belonging to the subgenus *Deidamiooides* show common features to those described for the group, with two petiolar nectaries, in the case of *P. deidamiooides* also present in the petiolule. As for *P. haematostigma*, from the subgenus *Astrophea*, unlike the description for the group, there are also nectaries on the foliar blade, additionally to petiolar nectaries.

Among the species that have been demonstrated to show glands defined as EFN, verified through chemical tests for the presence of carbohydrates (Durkee 1982, Rocha *et al.* 2009, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013, Silva *et al.*, 2017), most of them have glands that fit exclusively in the pattern I described in the present work. Considering this morphological type as a representative of EFN in *Passiflora*, we can classify them as **elevated nectaries** ("Hochnektarien") according to the classification of Zimmermann (1932). Other authors, such as Durkee (1982) and Silva *et al.* (2017), in describing the structure of EFN of *Passiflora* species already classified these glands as elevated nectaries. Gonzales & Ocantes (2006),

when analyzing the extrafloral nectaries of *Piriqueta* and *Turnera* (genera currently within the Passifloraceae), classified most of the nectaries as elevated ones.

In a second pattern of nectaries, the glands occur on abaxial surface of leaf blade and margin of leaf blade, have a circular shape forming an ocellus, and the projection in relation to the leaf tissue is not evident to the naked eye. In this group, we mention the species *Passiflora contracta*, *P. ferruginea*, *P. misera* and *P. organensis*, two of which have exclusively glands on abaxial surface of leaf blade (*P. misera* and *P. organensis*) and the other two have petiolar glands that fall under the first morphological group. The marginal glands included in this morphological type are present in only two of the analyzed species, *P. galbana* and *P. odontophylla*. Considering this second morphological type also as representative one among the EFN of *Passiflora*, we classified them as **flattened nectaries** ("Flachnektarien") according to Zimmermann (1932). Durkee (1982) mentions the nectaries of the abaxial surface as embedded in the surface of the organ, whereas Silva *et al.* (2017) classify the nectaries on abaxial surface of leaf blade as pit nectaries. Gonzales & Ocantes (2006) also placed the EFN on abaxial surface of leaf blade and part of the marginal ones among the flattened nectaries.

The nomenclature of the different glandular shapes varies among authors. The description of the glands for some species is often mentioned only as sessile or stipated, or as concave or convex (Killip 1938, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013, Mezzonato-Pires *et al.* 2013, Silva *et al.* 2017). Killip (1938), in an extensive work on Passifloraceae species of the American Continent, describes several shapes of glands, such as: globose, clubbed, patelliform, sessile or stipitate, orbicular, and liguliform.

In this work, we are using nomenclature for gland shape based on the solid form descriptions found in Radford *et al.* (1974). This approach will facilitate the comparative

study through nomenclatural standardization, also contributing to a more accurate and diverse definition of the variety of glandular forms found among the different *Passiflora* species. When analyzing extrafloral nectaries in several species of *Piriqueta* Aubl. and *Turnera* L. (Turneraceae), Gonzales & Ocantes (2006) divide the nectaries into four distinct shapes: flat (for nectaries on abaxial surface of leaf blade), globose, hemispherical and cupuliform (the last three shapes related to elevated nectaries). However, we chose not to use this classification, since it would limit the discretion of the glandular shapes found in the species studied here, thus not highlighting the great variety that found in *Passiflora*.

Anatomically, the extrafloral nectaries show small variations of the same pattern among the various studied species. All extrafloral glands framed as nectaries are vascularized nectaries according to the definition of Elias (1983). In this type of nectary three distinct regions can be described: 1) nectary epidermis; 2) nectary parenchyma 3) subnectary parenchyma (Fahn 1979, Durkee 1983, Nepi 2007). The anatomical analysis reveals a multi-layered nectary epidermis (in palisade), varying in number of layers, followed by two layers of nectary parenchyma cells with dense content (this number is also variable between different species and even within a single nectary), and internally there is the subnectary parenchyma, where vascular bundles with phloem terminations occur. These characteristics are very similar to those already described for extrafloral nectaries in *Passiflora* species (Durkee 1982, Jáuregui *et al.* 2002, Rocha *et al.*, 2009, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013, Silva *et al.* 2017), even when there is difference regarding the nomenclature in some works. Durkee (1982) names the nectary epidermis as “secretory tissue”, which the author describes as being followed by 2-5 layers of sub-secretory tissue (nectary parenchyma) that separates the secretory tissue (nectary epidermis) from the vascular supply.

The nectary epidermis of the EFN of *Passiflora* species studied to date is generally a multiple one, and it consists of dense cuboidal or columnar cells with large nuclei, vacuoles of various sizes and many plastids; the surface is covered by cuticle and during the secretory phase the nectar accumulates in the subcuticular space (Roth 1974, Durkee 1982, Durkee 1983, Rocha *et al.*, 2009, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013, Silva *et al.* 2017). This is similar to what is found in the species that were analyzed, having been verified the presence of subcuticular space formation where there is a possible accumulation of nectar.

According to Nepi (2007), the thickening and permeability of the nectary cuticles varies widely. The cuticle can even be completely impermeable and, in this case, the nectar accumulates in the space formed between the nectary epidermis and the cuticle. For the nine species studied by Durkee (1982) the release of the nectar is due to the rupture of the cuticle. However, Cardoso-Gustavson *et al.* (2013) reported that the rupture found in *Passiflora edulis* Sims is associated with the behavior of ants when collecting nectar, which is not observed in *P. alata* Curtis. In the SEM analysis of some species of *Passiflora*, such as *P. incarnata* and *P. sidifolia*, we also perceived a rupture of the cuticle. However, we cannot say whether this is a way of releasing the nectar or a result of the behavior of animals when collecting nectar. The release of nectar done exclusively by rupture of the cuticle appears, however, to be unlikely, given that the EFN initiate the profusion of exudates in leaves not yet fully expanded and continue the production for several days. Accordingly, in the majority of glands analyzed by SEM, cuticles were not rupture, even when some of them had certainly went through more than one release of exudate. Silva *et al.* (2017) verified the presence of a foveolar area in the nectary of *P. nitida* Kunth, suggesting that the release of nectar can be performed by cuticle pores. In *Piriqueta* and *Turnera* the presence of "pores" has also been reported. In this case, the "pore" is an area in which the cuticle is thinner and does not detach itself from the

epidermis, suggesting that the release of nectar would actually be trans-cuticular (Gonzalez & Ocantes 2006). The presence of pores in the cuticle was not verified in any of the species analyzed in the present study, and further studies are needed to determine the most common mode of nectar release in *Passiflora* species.

An uncommon characteristic found in *P. coccinea* and *P. haematostigma* is the presence of non-secreting trichomes in the nectary epidermis. In general, the trichomes are restricted to the non-secretory region of the glands. Silva *et al.* (2017) also reported the presence of non-secreting trichomes in the epidermis of *P. tholozanii* Sacco.

Internally to the nectary epidermis, we observed the nectary parenchyma, which in *Passiflora* species have isodiametric cells, larger than those of the epidermis, usually more vacuolated and with a dense cytoplasm (less dense than the nectary epidermis), with calcium oxalate crystals abundant in this area (Durkee 1982, Durkee 1983, Silva *et al.* 2017). In the species studied here, the nectary parenchyma cells are generally larger than the nectary epidermal cells, but it may also be flatter, being found with dense vacuolar content and few druses (which are more abundant in the subnectary parenchyma). In some cases, the differentiation between nectary and subnectary parenchyma is a fine one. Jáuregui *et al.* (2002) report that in this region the cells have a slightly thickened wall, they are also very compact and almost indistinguishable from the secretory epidermis. In the species studied here the difficulty of distinguishing between the nectary epidermis and the nectary parenchyma can be verified only in some glands on abaxial surface of leaf blade. Roth (1974), through an ontogenetic study, verified that in the glands present on abaxial surface of leaf blade this region originates by periclinal divisions of the sub-epidermal layer, but that anticlinal rows do not form as in the epidermis. In the studied glands, it was possible to detect evidence of periclinal divisions of the sub-epidermal layer (hypodermis) occurring not only in

the glands of abaxial surface of leaf blade, but also in the ones of the elevated type (Fig. 5I, 5F, 6C e 6G).

The subnectary parenchyma forms a large part of the glandular projections in the species studied, especially in the elevated EFN, and it is in this region that vascularization occurs. EFN of *Passiflora* are vascularized by both xylem and phloem (Durkee 1982, Durkee 1983, Rocha *et al.* 2009, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013, Silva *et al.* 2017), with phloem terminations reaching the outermost layers of the glandular parenchyma (Rocha *et al.* 2009). However, the vascularization of nectaries usually terminates some cells away from the nectariferous tissue, i.e., in the subnectary parenchyma, and it consists of phloem or, less frequently, of both phloem and xylem (Durkee 1982, Durkee 1983, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013, Silva *et al.* 2017). Nepi (2007) mentions that both the subnectary, and the nectary parenchyma tissues may be vascularized. In the analyzed species, the vascular endings mainly composed by phloem cells, reach the outer layers of the subnectary parenchyma. Only in *P. ferruginea* the phloem actually enters the nectary parenchyma. EFN of *Piriquetta* and *Turnera* have vascular endings composed only of phloem and do not enter the outermost parenchyma layers (Gonzalez & Ocantes 2006).

In the subnectary parenchyma we find a large number of idioblasts containing druses. The presence of druses in the EFN parenchyma of Passifloraceae is common, and they are often more concentrated around vascular bundles (Durkee 1982, Gonzalez & Ocantes 2006, Rocha *et al.* 2009, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013, Silva *et al.* 2017). In this region, for some species is also possible to find idioblasts that containing compounds with a strong reaction to safranin. The presence of these idioblasts tends to increase as the gland matures, and these compounds may also be present in some epidermal cells. Silva *et al.* (2017) also report the presence of these idioblasts in nectaries during the secretory phase.

In addition, the presence of EFN described by several authors in Passifloraceae, Solereder (1908) reports the occurrence of "glandular shaggy hairs" in *Passiflora* and *Malesherbia*. In the genus *Passiflora* the author reports that these "trichomes" are restricted to some species like *Passiflora clathrata* Mast., *P. foetida*, *P. lepidota* Mast. and *P. villosa*. Solereder (1908) reports that "glandular shaggy hairs" have a multi-seriate stalk. The stalk is mentioned to be variable in length, and when long, it has vascular bundles inside it. The glandular "head" consists of a multi-seriated interior with elongated cells, which are the continuation of stalk. A palisade secretory epidermis is also present, as well as verified for some species analyzed here.

Killip (1938) highlights that the sections *Dysosmia* (DC.) Killip and *Dysosmioides* Killip have a petiole without a "true gland", although they often have gland-tipped hairs. On the other hand, Cusset (1965), in an extensive work on extrafloral nectars in Passifloraceae, names the structures found in *P. foetida* as glandular pseudo-hairs ("pseudo-poils glanduleux"). Roth (1968), when working with the gland development of this same species, concludes that they are extrafloral nectaries. Although the author doesn't mention any carbohydrate test, the presence of lipid droplets was observed in the secretory epidermis with a Sudan III test.

Durkee *et al.* (1984), when analyzing *P. foetida* cytologically and chemically treat the glands of this species as resin glands. During the chemical tests, the authors did not find the presence of carbohydrates and amino acids being secreted by it, however it reacts strongly with OsO₄ *in situ*, the secretion also being insoluble in water, but completely soluble in a 95% ethanol and xylene solution. The authors conclude that the glands present in *P. foetida* may represent a transition from true extrafloral nectaries to lipid-secreting glands, denominating them as resin glands. Among the species analyzed in the present study, besides

Passiflora foetida which had already been described to have resin glands, *P. arida*, *P. sublanceolata* and *P. villosa* show secretory glands with very similar characteristics, thus being described here as resin glands as well.

The glands described in the present work as resin glands are petiolar and laminar ones, that small and elongated, with a cylindrical stalk, which in a superficial analysis can be confused with trichomes. This glandular type has been named by many authors as "glandular hairs" (Solereder 1908, Killip 1938, Cusset 1965, Vanderplank 2000, Ulmer & MacDougal 2004, Vanderplank 2013). However, Roth (1968) has shown that it forms as sub-epidermal protuberances, being called "emergencies" by the author.

The anatomical structure of the resin glands is very similar among the species, usually having a single layer of secretory epidermal cells. Durkee *et al.* (1984) describe the resin glands of *P. foetida* as having a layer of elongated epidermal secretory cells with lipids inside them, a chlorenchymatic tissue internally of the epidermis, and vascular tissue occupying the central position, constituted of both xylem and phloem, but with only phloem terminations. The development of these glands in *P. foetida* begins as small protuberances formed by sub-epidermal tissue, which develops by numerous anticinal and periclinal divisions, with the central region forming tracheids and the epidermal cells of the gland's head widening itself (Roth 1968).

Species that show only resin glands belong to the section *Dysosmia* DC. This section is characterized by the presence of gland-tipped hairs, and *P. foetida* is coated by small sticky glands and sticky hairs (Ulmer & MacDougal 2004, Vanderplank 2013). The absence of nectaries in the species of *Dysosmia* may be related to the presence of resin glands, a probable evolutionary novelty – this hypothesis needs to be verified in a phylogenetic context. A similar situation was reported by Conceição *et al.* (2009), who verified that the extrafloral

nectaries were replaced by sticky glandular hairs in a group within the *Chamaecrista* (Leguminosae). In the Bignonieae (Bignoniaceae) tribe, Nogueira *et al.* (2012) verified that the evolution of glandular trichomes with viscous secretion contributes to the reduction of extrafloral nectaries, i.e., species with glandular trichomes have fewer extrafloral nectaries. The authors relate this substitution of EFN by glandular trichomes with the colonization of more arid environments, which would make the maintenance of EFN very costly for the plant, especially when considering the water availability.

In summary, in this first stage of the extensive study of the extrafloral secretory glands of *Passiflora* that has been carried out in our laboratory, the combined analysis of the morphology, anatomy and preliminary tests for the presence of carbohydrates in the exudate in different *Passiflora* subgenera suggests the occurrence of at least two types of glands, nectaries and resin glands. The next challenges are related to checking the histochemical, ultrastructure and the chemical nature of the exudate. Once the hypothesis of resin glands has been corroborated only in species of the *Dysosmia* section, we can think of a new interpretation of the evolution of the secretory glands in the group.

REFERENCES

- 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.
- CASPARY, J.R. 1848. De nectariis. Adolphum Marcum. Botanische Zeitung 6:628–630.
- CERVI, A. C. 2006. **O gênero Passiflora L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950.** Fontqueria XLV. Madri.

- CONCEIÇÃO, A. S.; QUEIROZ, L. P.; LEWIS, G. P.; ANDRADE, M. J. G.; ALMEIDA, SCHNADELBACH, A. S.; VAN DE BERG C. 2009. Phylogeny of *Chamaecrista* Moench (Leguminosae-Caesalpinoideae) based on nuclear and chloroplast DNA regions. **Taxon** 58: 1168-180.
- CUSSET, M. G. 1965. Les nectaries extra-floraux et la valeur de la feuille des Passifloracees. **Revue Générale Botanique** 72: 145-219.
- DURKEE, L. T. 1982. The floral and extrafloral nectarines of *Passiflora*. II. The extra-floral nectar. **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.
- 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.
- 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.
- FAHN, A. 1979. **Secretory tissues in plants.** Academic Press Inc, London.
- FEUILLET, C. P.; MACDOUGAL, J. M. 2004. A new infrageneric classification of *Passiflora*. **Passiflora** 13: 34-38.
- GERLACH, D. 1984. Botanische Mikrotechnik: eine Einführung. Thieme, Stuttgart.
- GONZALEZ, A. M.; OCANTOS M. N. 2006. Nectarios Extraflorales en Piriiqueta y Turnera (Turneraceae). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica** 41(3): 269-284.

JÁUREGUI, D.; GARCIA, M.; PÉREZ, D. 2002. Morfoanatomía de las glándulas en cuatro especies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) de Venezuela. **Caldasi** 24(1): 33-40.

JOHANSEN, D. A. 1940. **Plant Mycrotechnique**. New York: McGraw-Hill Book.

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.

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.

MEZZONATO-PIRES, A. C.; SALIMENA, F. R. G.; BERNACCI, L. C. 2013. Passifloraceae na Serra Negra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia** 64: 123–136.

NEPI, M. 2007. Nectary structure and ultrastructure. In: NICOLSON, S. W.; NEPI, M. & PACINI, E. 2007. **Nectaries and nectar**. Spring-Verlag, The Netherlans.

NOGUEIRA, A.; REY, P. J.; LOHMANN, L. G. 2012. Evolution of extrafloral nectaries: adaptive process and selective regime changes from forest to savanna. **Journal of Evolutionary Biology** 25: 2325–2340.

- PACINI, E.; NICOLSON, S. W. 2007. Introduction. In: NICOLSON, S. W.; NEPI, M. & PACINI, E. **Nectaries and nectar**. Spring-Verlag, The Netherlans.
- RADFORD, A. E; DICKISON, W. C; MASSEY, J. R.; BELL, C. R. 1974. **Vascular Plant Systematics**. Harper & Row Publishers, New York.
- ROCHA, D. I.; 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: 619-626.
- ROTH, I. 1968. Desarrollo de los nectarios extraflorares en *Passiflora foetida* L. **Acta Biologica Venezuelica** 6: 44-49.
- ROTH, I. 1974. Morfologia, anatomia y desarrollo de la hoja pinnada y de las glandulas laminales en *Passiflora* (Passifloraceae). **Acta Botanica Venezuelica** 9: 363-380.
- RUZIN, S. E. 1999. **Plant Microtechnique and Microscopy**. Oxford University Press, New York.
- SCHMID, R. 1988. Reproductive Versus Extra-reproductive Nectaries – Historical Perspective and Terminological Recommendations. **The Botanical Review** 54: 179-232.
- SILVA, E. O.; FEIO, A. C.; CARDOSO-GUSTAVSON, P.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; SANTOS, J. U. M.; DIAS, A. C. A. A. 2016. Extrafloral nectaries and plant-insect interactions in *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Brazilian Journal of Botany**. Published online.
- 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.

SOLEREDER, H. 1908. **Systematic Anatomy of the Dicotyledons.** vol. 1. Oxford, Claredon Press.

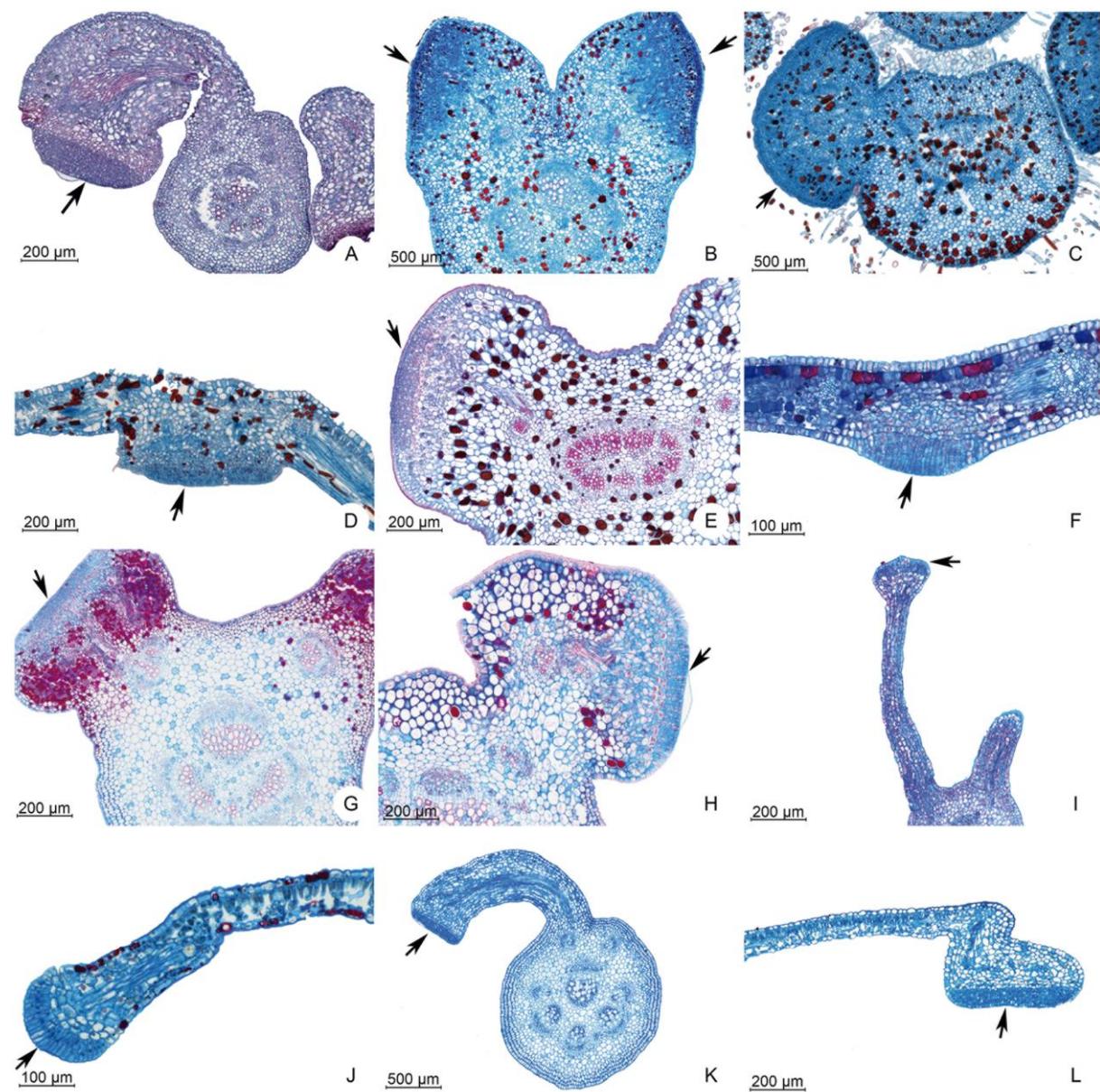
SOUZA, V. C.; LORENZI, H. 2012. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III.** Ed. 3. Instituto Plantarum, Nova Odessa.

ULMER, T.; MACDOUGAL, M. J. 2004. ***Passiflora: Passionflowers of the world.*** Timber Press, Inc., Portland.

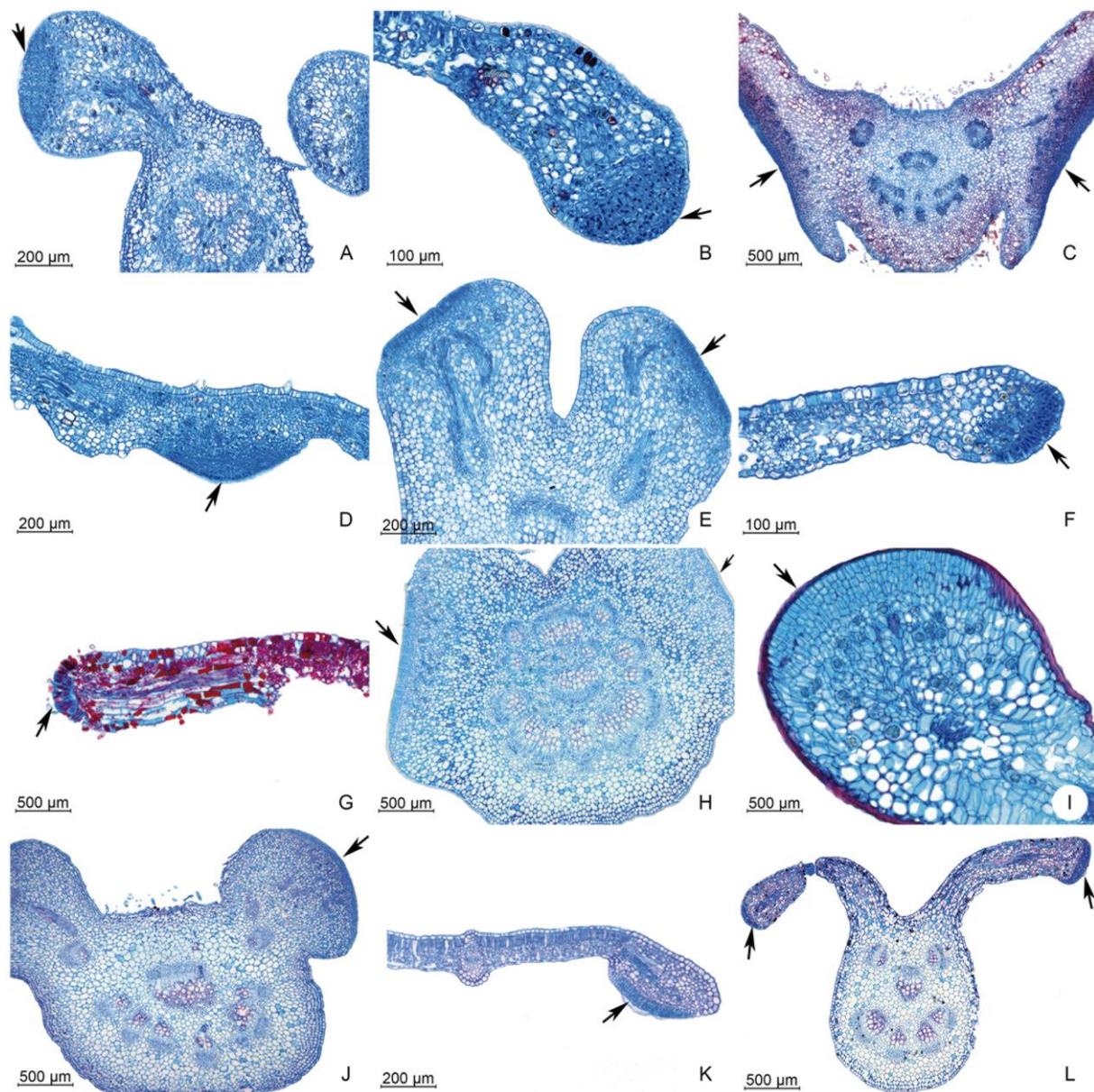
VANDERPLANK, J. 2000. **Passion Flowers.** 3rd edition The MIT Press, Cambridge, Massachusetts.

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

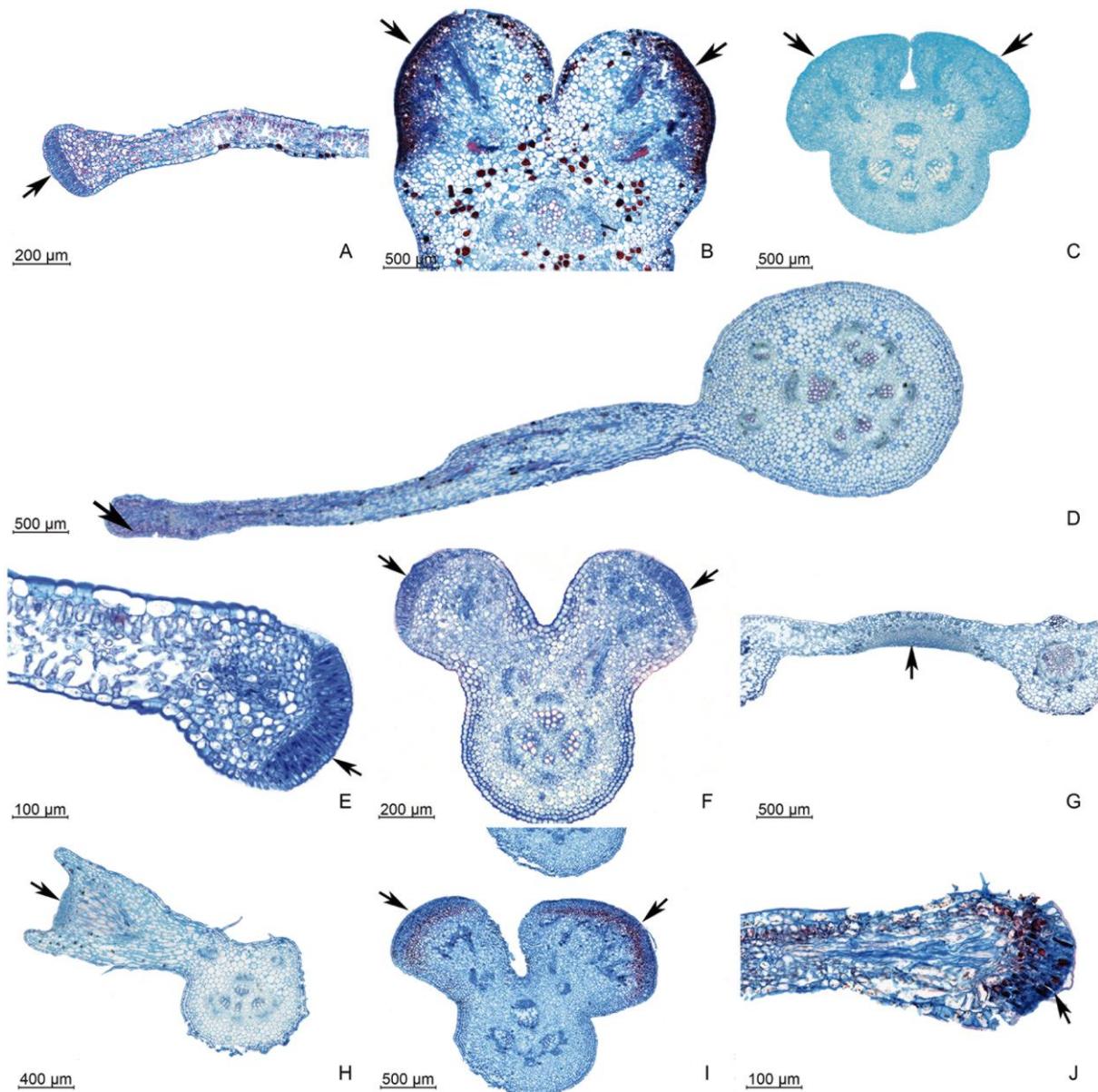
ZIMMERMAN, J. G. 1932. Über die extrafloralen nektarien der Angiospermen. **Beihefte zum Botanischen Centralblatt** 49: 99-196.

SUPPORTING INFORMATION

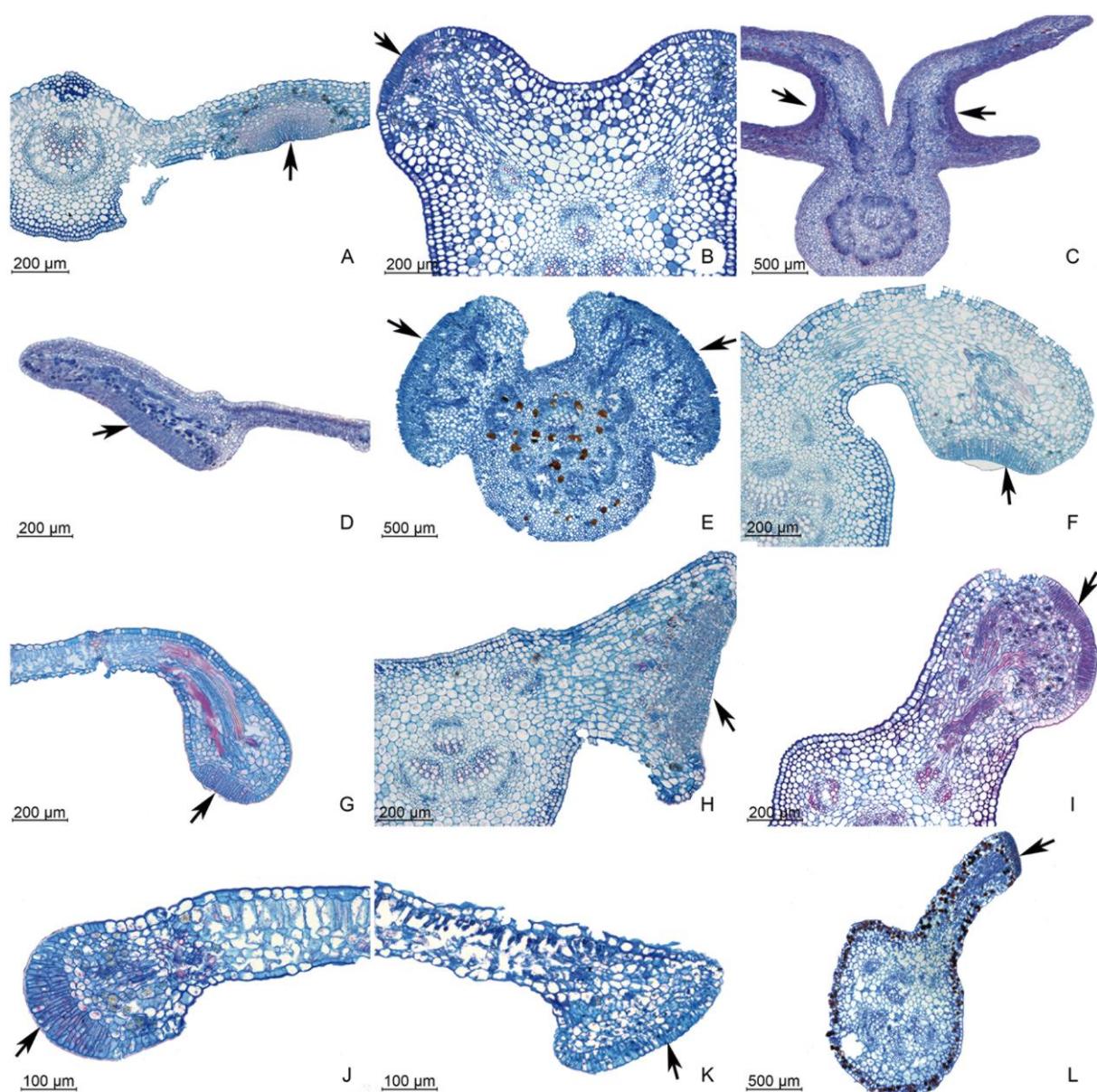
S1 Figure. Structural diversity of extrafloral nectaries (EFN) in *Passiflora* species, showing secretory region (arrow) in longitudinal section of glands. (A-C) Petiolar glands in *P. actinia* Hook, *P. ambigua* Hemsl. and *P. coccinea* Aubl., respectively. (D) Gland of *P. coccinea* Aubl. on abaxial surface of leaf blade. (E-F) Glands of *P. contracta* Vitta on petiole (E) and on abaxial surface of leaf blade (F). (G-H) Glands of *P. deidamiooides* Harms on petiole (G) and petiolule (H). (I-J) Glands of *P. edmundoi* Sacco on petiole (I) and at the margin of leaf blade (J). (K-L) Glands of *P. eichleriana* Mast. on petiole (K) and at the margin of leaf blade (L).



S2 Figure. Structural diversity of extrafloral nectaries (EFN) in *Passiflora* species, showing secretory region (arrow) in longitudinal section of glands. (A-B) Glands of *P. elegans* Mast. on petiole (A) and at the margin of leaf blade (B). Glands of *P. ferruginea* Mast. on petiole (C) and on abaxial surface of leaf blade (D). (E-F) Glands of *P. galbana* Mast. on petiole (E) and at the margin of leaf blade (F). (G) Gland of *P. gardneri* Mast. at the margin of leaf blade. (H-I) Glands of *P. haematostigma* Mart. ex Mast. on petiole (H) and at the margin of leaf blade (I). (J-K) Glands of *P. incarnata* L. on petiole (J) and at the margin of leaf blade (K). (L) Gland of *P. kermesina* Link & Otto on petiole.



S3 Figure. Structural diversity of extrafloral nectaries (EFN) in *Passiflora* species, showing secretory region (arrow) in longitudinal section of glands. (A) Gland of *P. kermesina* Link & Otto at the margin of leaf blade. (B-C) Petiolar gland of *P. laurifolia* L. and *P. maliformis* L. respectively. (D) Petiolar gland of *P. ligularis* Juss. (E-F) Glands of *P. miersii* Mart. at the margin of leaf blade (E) and petiole (F). (G) Gland of *P. misera* Kunth on the abaxial surface of leaf blade. (H) Petiolar gland of *P. morifolia* Mast. (I-J) Glands of *P. odontophyllum* Harms ex Glaz on petiole (I) and at the margin of leaf blade (J).



S4 Fig. Structural diversity of extrafloral nectaries (EFN) in *Passiflora* species, showing secretory region (arrow) in longitudinal section of glands. (A) Gland of *P. organensis* Gardner on abaxial surface of leaf blade. (B) Petiolar gland of *P. racemosa* Brot (C-D) Glands of *P. serratodigitata* L. on petiole (C) and at the margin of leaf blade (D). (E) Petiolar gland of *P. setacea* DC. (F-G) Glands of *P. sidifolia* M. Roem. on petiole (F) and at the margin of leaf blade (G). (H) Petiolar gland of *P. suberosa* L. (I-J) Glands of *P. subrotunda* Mast. on petiole (I) and at the margin of leaf blade (J). (K) Gland of *P. umblicata* (Griseb.) Harms at the margin of leaf blade. (L) Petiolar gland of *P. watsoniana* Mast.

S1 Table. Anatomical features of foliar glands in the analyzed species.

Species	Distribution of glands	Secretory epidermis	Secretory parenchyma	Distribution of druses
Subgenus Astrophea				
<i>P. haematostigma</i> Mart. ex Mast.	Petiole	4-6 layers of elongated cells, and occurrence of trichomes	2 layers of cells	Non-secretory parenchyma
	Margins of leaf blade	3-4 layers of elongated cells, and occurrence of trichomes	1-2 layers of cells	
Subgenus Decaloba				
<i>P. ferruginea</i> Mast.	Petiole	4-6 layers of short cells	8-10 layers of cells	Secretory and non-secretory parenchyma
	Abaxial surface of leaf blade	6-10 layers of short cells	3-5 layers of cells	
<i>P. misera</i> Kunth	Abaxial surface of leaf blade	4-8 layers of short cells	2-4 layers of cells	Non-secretory parenchyma
<i>P. morifolia</i> Mast.	Petiole	6-8 layers of short cells	4-6 layers of cells	Secretory and non-secretory parenchyma
<i>P. organensis</i> Gardner	Abaxial surface of leaf blade	4-6 layers of short cells	2-4 layers of cells	Non-secretory parenchyma
<i>P. suberosa</i> L.	Petiole	6-8 layers of short cells	2-6 layers of cells	Non-secretory parenchyma
Subgenus Deidamiooides				
<i>P. contracta</i> Vitta	Petiole	4-6 layers of elongated cells	2-3 layers of cells	Non-secretory parenchyma Secretory and non-secretory parenchyma
	Abaxial surface of leaf blade	3-4 layers of elongated cells		
<i>P. deidamiooides</i> Harms	Petiole	4 layers of short cells	2-3 layers of cells	Non-secretory parenchyma
	Petiolule	4-8 layers of short cells		
Subgenus Passiflora				
<i>Passiflora actinia</i> Hook	Petiole	4-6 layers of short to elongated cells	2-3 layers of cells	Non-secretory parenchyma
<i>P. ambigua</i> Hemsl.	Petiole	1-2 layers of elongated cells	2-3 layers of cells	Non-secretory parenchyma
<i>P. arida</i> (Mast. & Rose) Killip	Petiole		-	Parenchyma
	Dispersed on both surfaces of leaf blade	1 layer of elongated cells		
<i>P. coccinea</i> Aubl.	Petiole			Non-secretory parenchyma
	Margins of leaf blade	2-3 layers of elongated cells, and occurrence of trichomes	1-2 layers of cells	
<i>P. edmundoi</i> Sacco	Petiole	1-3 layers of elongated cells	2-3 layers of cells	Non-secretory parenchyma
	Margins of leaf blade	1-2 layers of elongated cells		
<i>P. eichleriana</i> Mast.	Petiole	2 layers of elongated cells	2-3 layers of cells	Non-secretory parenchyma
	Margins of leaf blade	2-4 layers of elongated cells		
<i>P. elegans</i> Mast.	Petiole	4-8 layers of short to elongated cells	2-3 layers of cells	Non-secretory parenchyma
	Margins of leaf blade	6-8 layers of short cells		

	Petiole			
<i>P. foetida</i> L.	Dispersed on both surfaces of leaf blade	1 layer of elongated cells	-	Parenchyma
	Petiole			
<i>P. galbana</i> Mast.	Margins of leaf blade	1-2 layers of elongated cells	2 layers of cells	Non-secretory parenchyma
<i>P. gardneri</i> Mast.	Margins of leaf blade	1-2 layers of elongated cells	2 layers of cells	Non-secretory parenchyma
<i>P. setacea</i> DC.	Petiole	2-3 layers of elongated cells	2-5 layers of cells	Secretory and non-secretory parenchyma
<i>P. incarnata</i> L.	Petiole	2 layers of elongated cells	2-3 layers of cells	Secretory and non-secretory parenchyma
	Margins of leaf blade		1-2 layers of cells	Non-secretory parenchyma
<i>P. kermesina</i> Link & Otto	Petiole	1-3 layers of elongated cells	2-3 layers of cells	Non-secretory parenchyma
	Margins of leaf blade			
<i>P. laurifolia</i> L.	Petiole	1-2 layers of elongated cells	4-5 layers of cells	Secretory and non-secretory parenchyma
<i>P. ligularis</i> Juss.	Petiole	1-3 layers of elongated cells	1-3 layers of cells	Non-secretory parenchyma
<i>P. maliformis</i> L.	Petiole	2-4 layers of short cells	2-4 layers of cells	Secretory and non-secretory parenchyma
	Petiole	1-2 layers of elongated cells	2-4 layers of cells	Non-secretory parenchyma
<i>P. miersii</i> Mart.	Margins of leaf blade	1-2 layers of elongated cells	1-2 layers of cells	
	Petiole			
<i>P. odontophylla</i> Harms ex Glaz	Petiole	3-4 layers of elongated cells	3-4 layers of cells	Secretory and non-secretory parenchyma
	Margins of leaf blade	2-4 layers of elongated cells	1-2 layers of cells	Non-secretory parenchyma
	Petiole			
<i>P. sublanceolata</i> (Killip) MacDougal	Dispersed on both surfaces of leaf blade	1 layer of elongated cells	-	Parenchyma
	Margins of leaf blade			
<i>P. racemosa</i> Brot.	Petiole	1 -2 layers of elongated cells	1-3 layers of cells	Secretory and non-secretory parenchyma
	Petiole	1-2 layers of elongated cells		
<i>P. serratodigitata</i> L.	Margins of leaf blade	3-4 layers of short cells	2-3 layers of cells	Non-secretory parenchyma
	Petiole			
<i>P. sidifolia</i> M. Roem.	Margins of leaf blade	2-4 layers of short cells	2 layers of cells	Non-secretory parenchyma
	Petiole			
<i>P. subrotunda</i> Mast.	Petiole	1-2 layers of elongated cells	2 layers of cells	Non-secretory parenchyma
	Margins of leaf blade	1-3 layers of elongated cells		

<i>P. umbilicata</i> (Griseb.) Harms	Margins of leaf blade	1-2 layers of elongated cells	2 layers of cells	Non-secretory parenchyma
<i>P. villosa</i> Vell.	Petiole Dispersed on both surfaces of leaf blade	1 layer of elongated cells	-	Parenchyma
<i>P. watsoniana</i> Mast.	Petiole Margins of leaf blade	2-3 layers of elongated cells 1-2 layers of elongated cells	2 layers of cells 1 layer of cells	Non-secretory parenchyma

(-) No differentiation into secretory parenchyma

Capítulo 2

Histochemical and ultrastructural approach of secretory cells on extrafloral nectaries and resin glands in *Passiflora* L. (Passifloraceae)

Renata CC Lemos¹, Diego Demarco¹, Delmira C Silva² and Gladys FA Melo-de-Pinna¹

1 Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, CEP
05508-090, São Paulo, Brazil.

2 Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, CEP
45662-900, Bahia, Brazil.

ABSTRACT

The presence of extrafloral glands is a hallmark of *Passiflora* L. species. extrafloral nectaries (EFN) are the most common glandular type in species of this genus, and the occurrence of resin glands has also been reported. The presence of resin glands, however, requires chemical and ultrastructural evidence to corroborate its classification. In the present study histochemical and ultrastructural data of the secretory cells in EFN and resin glands are reported, with new evidence regarding the nature of these structures and the exudate release mode. Nine *Passiflora* species representing the subgenera *Decaloba*, *Deidamiooides* and *Passiflora* were analyzed for the storage of carbohydrates, phenolic compounds, lipids and proteins in glandular secretory cells. Six species were selected for transmission electron microscopy analysis of the secretory cells. The combined analyzes in the secretory glands proved to be important tools in the delimitation between extrafloral nectaries and resin glands present in the leaves of *Passiflora* species, as well as to detect the different modes of exudate secretion. We also report indications of granulocrine secretion in some extrafloral nectaries of *Passiflora*, a secretion mode not yet described for this glandular type in species of the group. The detection of carbohydrates in the secretory cells of the epidermis and secretory parenchyma of seven species corroborates the classification of the glands present in the leaves of these species as extrafloral nectaries. As well as the positive reaction to different lipid compounds, especially the presence of terpenoids, this result indicates the resin nature of the secretion present in the secretory structures, therefore defined as resin glands. In addition, with the ultrastructure data it was possible to detect the likely presence of lipophilic compounds in the nectar secreting cells, leading to a sharing of compounds present in the exudate of the two glandular types.

INTRODUCTION

Passifloraceae comprises 16-25 genera and approximately 700 species of tropical and subtropical distribution that can be vines, occasionally herbs and, less frequently, shrubs or trees (Feuillet 2004, Souza & Lorenzi 2012, Judd *et al.* 2008, Simpson 2010). In Brazil, five genera and about 120 species occur (Souza & Lorenzi 2012).

Passiflora L. (Passifloreae) is the most representative genus of the family, with more than 500 species subdivided into the subgenera *Astrophea*, *Decaloba*, *Deidamiooides*, *Tetrapathea* and *Passiflora*, the latter being the most abundant in South America (Feuillet & MacDougal 2003, Ulmer & MacDougal 2004, Krosnick *et al.*, 2009).

The presence of extrafloral glands is a hallmark of *Passiflora* species, with extrafloral nectaries (EFN) being the most reported gland type among the species of the genus (Killip 1938, López-Meruvia *et al.* 1993a, Lopez-Meruvia *et al.* 1993b, Vanderplank 2000, Ulmer & MacDougal 2004, Cervi 2006, Souza & Lorenzi 2012, Krosnick *et al.* 2009, Krosnick *et al.* 2013, Mezzonato-Pires *et al.* 2013, Chapter 1). According to some authors (Killip 1938, Ulmer & MacDougal 2004, Souza & Lorenzi 2012, Cervi 2006) the occurrence and the form of the EFN are characteristics used in the diagnosis of *Passiflora* species.

Nectaries are characterized by secreting nectar, which is composed mainly of sucrose, glucose, fructose and traces of other components (Fahn 1979, Elias 1983, Nicolson & Thornburg 2007). In addition to the presence of sugars (Durkee 1982, Rocha *et al.* 2009, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013), other compounds, such as amino acids, flavonoids and alkaloids (Baker *et al.* 1978, Durkee 1982, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013) have been described in the extrafloral nectar of *Passiflora* species.

The chemical analysis of the glands in *Passiflora*, generally described as EFN, became more relevant after the study carried out by Durkee *et al.* (1984) analyzing *P. foetida* L. In

this work, the authors reported that the exudate has no sugars, being insoluble in water, poorly soluble in acetone and completely soluble in 95% ethanol and xylene, besides reacting strongly with lipid dyes. According to the authors, these results indicate that such structures are actually resin glands.

Ultrastructural features of secretory cells in extrafloral nectaries of *Passiflora*, such as large vacuoles, high concentration of mitochondria, and conspicuous rough endoplasmic reticulum (ER) are described by Durkee (1982). According to the author, some ultrastructural features suggest the probable secretion release mode to be the eccrine mode.

In a recent work on the morphological and anatomical diversity of extrafloral secretory glands of 34 species of *Passiflora*, Lemos *et al.* (Chapter 1) conclude that the morpho-anatomical differences plus the results of the glucose test-strips suggest two categories of secretory structures in the group: 1) extrafloral nectaries, which may be elevated or flat; and 2) resin glands. According to the authors, the resin glands are morphologically and anatomically distinct from the EFN, in addition to showing a negative result for the detection of sugars from the glucose test-strips. The authors further suggest that resin glands should be better studied, and that they are most likely occur to in a group of species of the *Dysosmia* section.

However, although the detection of sugars in the glandular secretion with the use of glucose test-strips indicates the nectariferous nature of the secretion, it does not reveal the possible chemical complexity and the sites of production, storage and release of the secreted compounds. The lack of positive results for carbohydrates is also not a defining characteristic for resin glands, and chemical evidences are necessary in order to corroborate this classification. In the present study, histochemical and ultrastructural data of the secretory cells present in the extrafloral glands in *Passiflora* are reported, including the elevated and

flattened nectaries, besides the resin glands described by Lemos *et al.* (Chapter I), with new evidence of the nature of these structures and the release mode of the exudates.

MATERIAL AND METHODS

Plant material – Foliar glands of nine *Passiflora* species were analyzed. The selected species represented the subgenera *Decaloba*, *Deidamioides* and *Passiflora* (Fig. 1A-I, Table 1). The material was obtained from plants cultivated at the greenhouse of the Institute of Biosciences of the University of São Paulo (IB-USP), and also at the greenhouse of the State University of Santa Cruz (UESC - Ilhéus - BA) - BAG Passifloras.

Table 1. Selected species, localization of the analyzed foliar glands, and voucher number.

Sub-genus	Species	Gland position	Voucher no.
<i>Decaloba</i>	<i>P. misera</i> Kunth (Fig. 1A)	Abaxial face of the foliar blade	R.C.C. Lemos 57 ¹
	<i>P. morifolia</i> Mast. (Fig. 1B)	Petiole	R.C.C. Lemos 62 ¹
	<i>P. suberosa</i> L. (Fig. 1C)	Petiole	R.C.C. Lemos 59 ¹
<i>Deidamioides</i>	<i>P. contracta</i> Vitta (Fig. 1D)	Petiole	R.C.C. Lemos 61 ¹
	<i>P. deidamiooides</i> Harms (Fig. 1E)	Petiole and petiolule	R.C.C. Lemos 31
<i>Passiflora</i>	<i>P. actinia</i> Hook. (Fig. 1F)	Petiole	R.C.C. Lemos 55 ¹
	<i>P. foetida</i> L. (Fig. 1G)	Petiole and foliar blade	R.C.C. Lemos 48 ¹
	<i>P. ligularis</i> Juss. (Fig. 1H)	Petiole	R.C.C. Lemos 56 ¹
	<i>P. sublanceolata</i> (Killip) MacDougal (Fig. 1I)	Petiole and foliar blade	R.C.C. Lemos 41 ²

¹ cultivated at the greenhouse of the Institute of Biosciences of the University of São Paulo, and ² cultivated at the greenhouse of the State University of Santa Cruz (UESC - Ilhéus - BA) - BAG Passifloras.

Histochemical analysis – In order to verify the total composition of the secretion from the different gland types the analyses were carried out following Demarco (2017). The following histochemical tests were performed: the PAS reaction (Periodic-Acid-Schiffs reagent; pararosaniline) (McManus 1948) was applied for the detection of polysaccharides; alcian blue

(Pearse 1985) and tannic acid x ferric chloride (Pizzolato 1977), for mucilage, while ruthenium red (Gregory & Baas 1989) was applied for the detection of acid mucilage; Lugol's reagent (Johansen 1940) was applied for starch detection; Nadi's reagent, for terpenoids (David & Carde 1964); Nile blue sulfate (Cain 1947), for acid and neutral lipids; copper acetate x rubeanic acid (Ganter & Jollés, 1969, 1970), for fatty acids; sudan IV (Pearse 1985), sudan black B (Pearse 1985), and neutral red, for total lipids (Kirk 1970); and aniline blue black (Fisher 1968), for the detection of proteins. Additionally, formalin ferric chloride (Johansen, 1940) was applied as previous fixator in order to highlight phenolic compounds.

Images were captures using a Leica DMLB light microscope coupled with a Leica DFC 310FX digital camera.

Results were considered to be positive when the reactions were observed to occur in cells related with the secretion. Therefore, we considered the nectaries secretory epidermis and nectariferous parenchyma, and only the secretory epidermis of the resin glands.

Transmission Electron Microscopy – The ultrastructure analysis was carried out for glands isolated from *Passiflora misera* and *P. morifolia* (subgenus *Decaloba*); *P. contracta* (subgenus *Deidamiooides*); and *P. actinia*, *P. ligularis*, and *P. sublanceolata* (subgenus *Passiflora*), thus representing the main morpho-types described in Chapter 1. The material was fixated in a solution of 4% paraformaldehyde (v/v) and 1% glutaraldehyde (v/v) in 0.1M 7.2pH phosphate buffer (Karnovsky 1965), post-fixed in 1% osmium tetroxide (OsO_4) in the same buffer, dehydrated in a gradual acetone series, and embedded in Spurr resin. Semi-thin sections were obtained with a Leica UC6 ultra-microtome, and then stained with 0.05% toluidine blue (O'Brien *et al.* 1965) in order to allow the selection of the area to be analyzed, which included the secretory epidermis of extrafloral nectaries and resin glands. The ultra-thin

sections were stained with uranyl acetate (Watson 1958) and lead citrate (Reynolds 1963).

Images were acquired by using a Zeiss EM900 Transmission Electron Microscope.

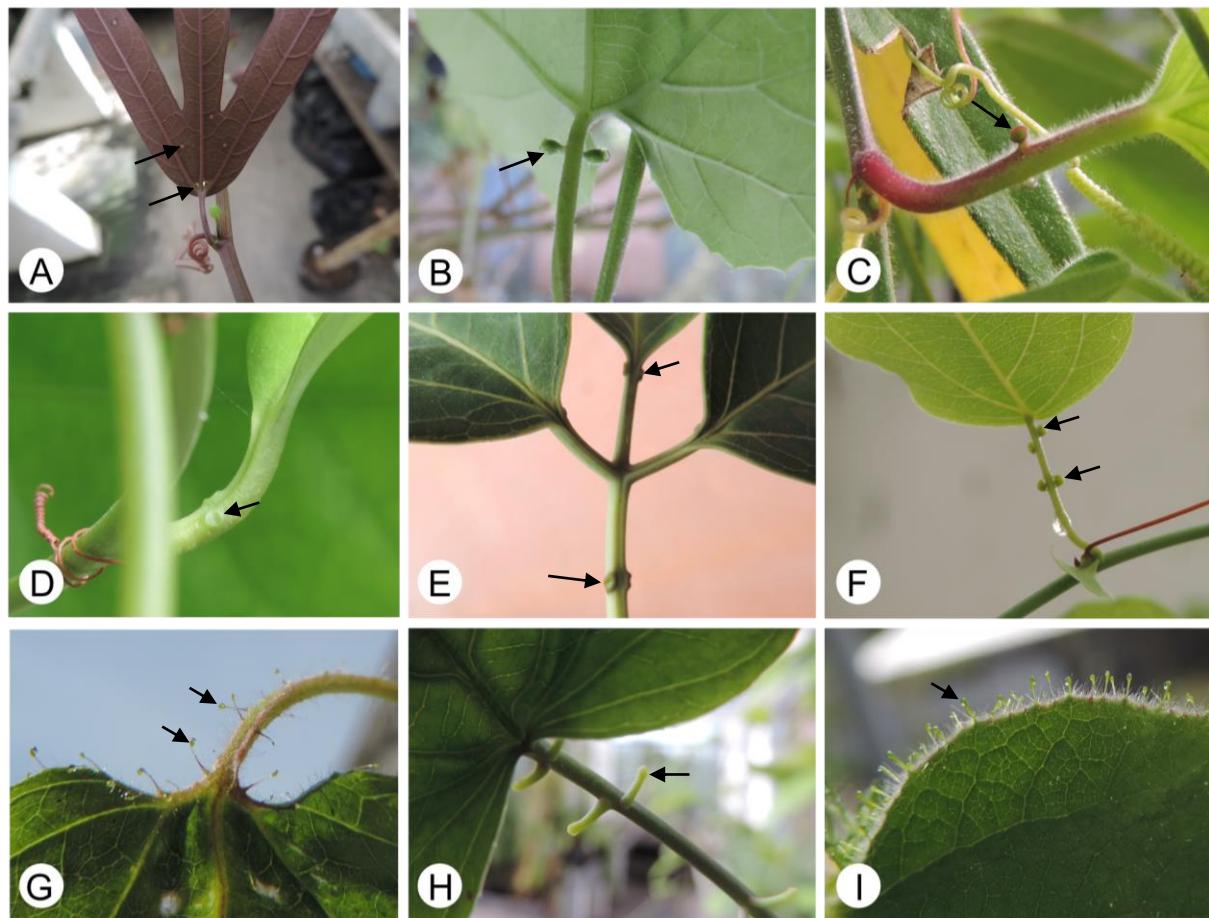


Figure 1. Morphological aspect of foliar glands in *Passiflora* L. species. **A.** Flattened nectaries, ocellus shaped, in the abaxial face of the foliar blade of *P. misera* Kunth. **B-F.** Elevated nectaries. **B.** Cotyliform shaped nectaries in the petiole of *P. morifolia* Mast. **C.** Crateriform shaped nectary in the petiole of *P. suberosa* L. **D.** Depressed ovoid shaped nectary in the petiole of *P. contracta* Vitta. **E.** Elliptic-patelliform shaped nectaries in the petiolule and patelliform shaped nectaries in the petiole of *P. deidamoides* Harms. **F.** Obconic shaped nectaries in the petiole of *P. actinia* Hook. **G.** Pyriforme long-stipated shaped resin gland in the petiole and leaf blade of *P. foetida* L. **H.** Elevated nectaries, obconic asymmetric long-stipated shaped, in the petiole of *P. ligularis* Juss. **I.** Capitate long-stipated shaped resin gland in the leaf blade of *P. sublanceolata* (Killip) MacDougal.

RESULTS

Histochemical analysis – The results of the histochemical analysis of the secretory tissue in extrafloral nectars and resin glands are summarized in Table 2.

Generally speaking, the two glandular types showed very contrasting results (Table 2). Similarities between them were verified only by the presence of proteins (Fig. 2A-D) and the absence of fatty acids (Fig. 2E) in their secretion. The positive reaction for protein was not verified only for the secretory cells of the extrafloral nectaries of *P. morifolia*. On the other hand, it was possible to record proteins directly present in the extrafloral nectar of *P. ligulares* (Fig. 2A).

The presence of polysaccharides and mucilage in the secretory parenchyma and secretory epidermis (Fig. 2F-L) was detected only in extrafloral nectaries. These substances were also recorded directly on the nectar of some species (Fig. 2H, 2K-L). A positive reaction to starch (Fig. 3A), phenolic compounds (Fig. 3B), lipids (Fig. 3C-I) and terpenoids (Fig. 3J) was observed in the resin glands of the epidermal secretory cells. (Fig 3K-L). These compounds were not found in extrafloral nectaries (Fig. 3K-L).

Ultrastructure of the secretory epidermal cells - The cuticle in the EFN cells has prominent cuticular flanges (Fig. 4A). Plastids were observed scattered in the cytoplasm. These plastids sometimes have well developed thylakoids, but the formation of evident grana was not observed (Fig. 4B). Plastids with more sparsely-distributed thylakoids were also recorded (Fig. 4C). Plastids also showed plastoglobules of varying sizes (Fig. 4B-F). In *P. ligularis* it was also possible to verify the occurrence of starch within some plastids (Fig. 4E). Close to the plastids there was a frequent higher concentration of mitochondria (Fig. 4D and 4F).

The occurrence of smooth and rough endoplasmic reticulum in extrafloral nectaries was generally more concentrated in the regions near the plasma membrane (Fig. 4G-H). The

Table 2. Results of the histochemical tests of the secretory tissue in extrafloral nectars and resin glands of *Passiflora* L.

<i>Histochemical test</i>	<i>Chemical compound class</i>	<i>P. actinia</i>	<i>P. foetida</i>	<i>P. ligularis</i>	<i>P. sublanceolata</i>	<i>P. morifolia</i>	<i>P. misera</i>	<i>P. suberosa</i>	<i>P. contracta</i>	<i>P. deidamiooides</i>
Aniline blue black	Proteins	+	+	+	+	-	+	+	+	+
PAS reaction		+	-	+	-	+	+	+	+	+
Tannic acid x Ferric chloride		+	-	+	-	+	+	+	+	+
Alcian blue	Carbohydrates	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ruthenium red		+	-	+	-	+	+	+	+	+
Lugol's reagent		-	+	-	+	-	-	-	-	-
Formalin ferric chloride	Phenolic Compounds	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Sudan black B		-	+	-	+	-	-	-	-	-
Sudan IV		-	+	-	+	-	-	-	-	-
Neutral red		-	+	-	?	-	-	-	-	?
Copper acetate x Rubeanic acid	Lipids	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nile blue sulfate		-	+	-	+	-	-	-	-	-
Nadi's reagent		-	+	-	?	-	-	-	-	?

* (+) = presence, (-) = absence, (?) = test not performed.

Figure 2. Histochemical analyses from longitudinal sections of foliar glands in *Passiflora* L. species. **A-D.** Aniline blue black test for protein. **A.** Petiolar nectary of *P. ligularis* Juss, showing protein in secretory epidermis and nectariferous parenchyma cells (white arrows), observe proteins present in the nectar (*). **B.** Petiolar nectary of *P. deidamiooides* Harms, showing protein in secretory epidermis and nectariferous parenchyma cells (white arrows). **C.** Petiolar nectary of *P. morifolia* Mast. no positive reaction for protein in secretory cell, protein show in expanded central cells of the nectary. **D.** Resin gland of *P. sublanceolata* (Killip) MacDougal, showing protein in secretory epidermal cells. **E.** Copper acetate x rubeanic acid test, showing absence of fatty acids in the nectary of *P. misera* Kunth. **F-H.** PAS test for polysaccharides. **F-G.** Petiolar nectary of *P. deidamiooides*, showing polysaccharides (arrows) in secretory epidermal cells (A-B) and nectariferous parenchyma cells (B). **H.** Polysaccharides (arrows) in the exudate (nectar) of *P. suberosa* L. **I-J.** Ruthenium red test for carbohydrates (acid mucilage). **I.** Petiolar nectary of *P. deidamiooides* Harms, showing carbohydrates in secretory epidermis and nectariferous parenchyma cells (arrows). **J.** Negative results for carbohydrates in *P. foetida* L. resin gland. **K-L.** Tannic acid x ferric chloride test for carbohydrates (mucilage), showing positive results in the nectary secretory epidermis, nectariferous parenchyma cells and exudate (nectar) of petiolar nectary of *P. actinia* Hook. and *P. ligularis*, respectively.

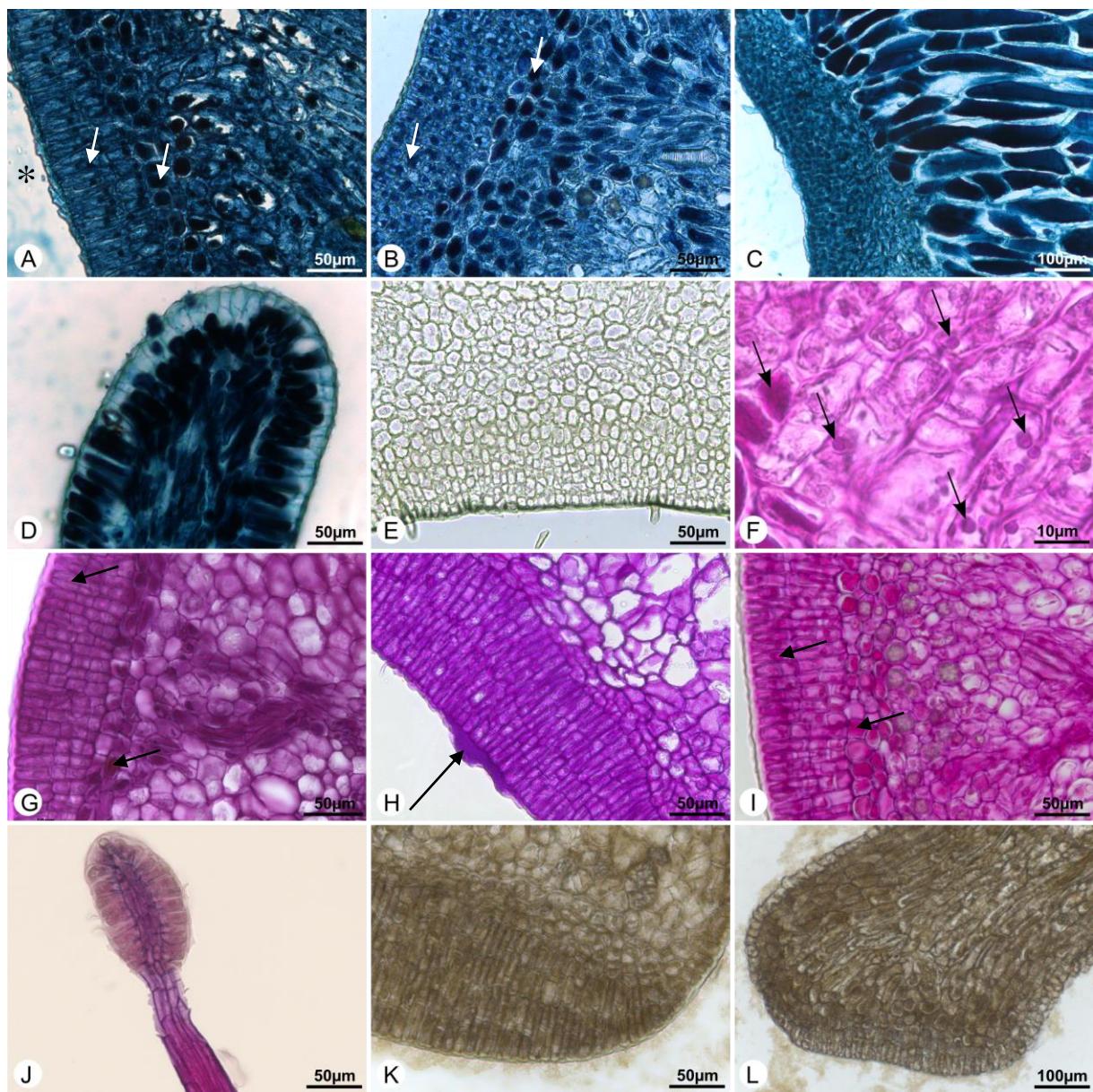


Figure 3. Histochemical tests in foliar glands of *Passiflora* L. species. **A-F.** Longitudinal sections of resin glands. **A.** Lugol's reagente test for starch, showing positive reaction (arrows) in secretory epidermal cells of *P. sublanceolata* (Killip) MacDougal. **B.** Formalin ferric chloride fixator, showing phenolic compounds (arrows) in secretory epidermal cells of *P. foetida* L. **C-D.** Sudan black B test for lipids, showing positive results in secretory epidermal cells of *P. foetida* (**C**) and *P. sublanceolata* (**D**). **E-F.** Sudan IV test for lipids, showing positive results (arrows) in secretory epidermal cells of *P. foetida* (**E**) and *P. sublanceolata* (**F**). **G.** Resin gland of *P. foetida* showing positive reaction to neutral red test for lipids in apical secretory epidermal cells (white arrow). **H-I.** Nile blue sulfate test for acid and neutral lipids, positive results for acid lipids in secretory epidermal cells of *P. foetida* (**H**) and *P. sublanceolata* (**I**) from longitudinal section of resin glands. **J.** Nadi's reagent for terpenoids, showing positive result in the exudate of *P. foetida* resin glands. **K-L.** Longitudinal sections of extrafloral nectaries. **K.** Negative result for phenolic compounds in *P. suberosa* L., with Formalin ferric chloride fixator. **L.** Negative result for lipids in *P. contracta* Vitta, with Sudan black B test.

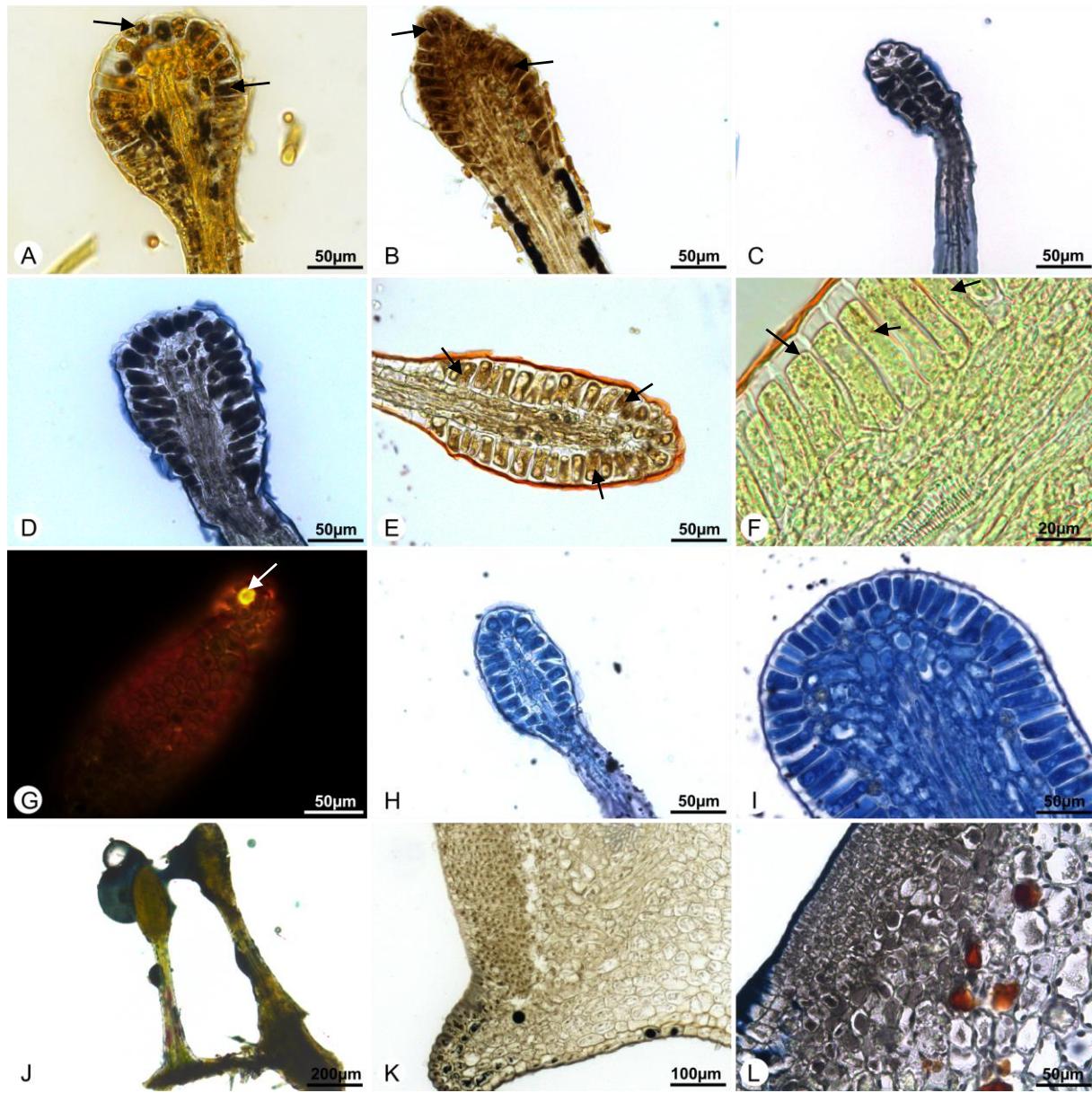
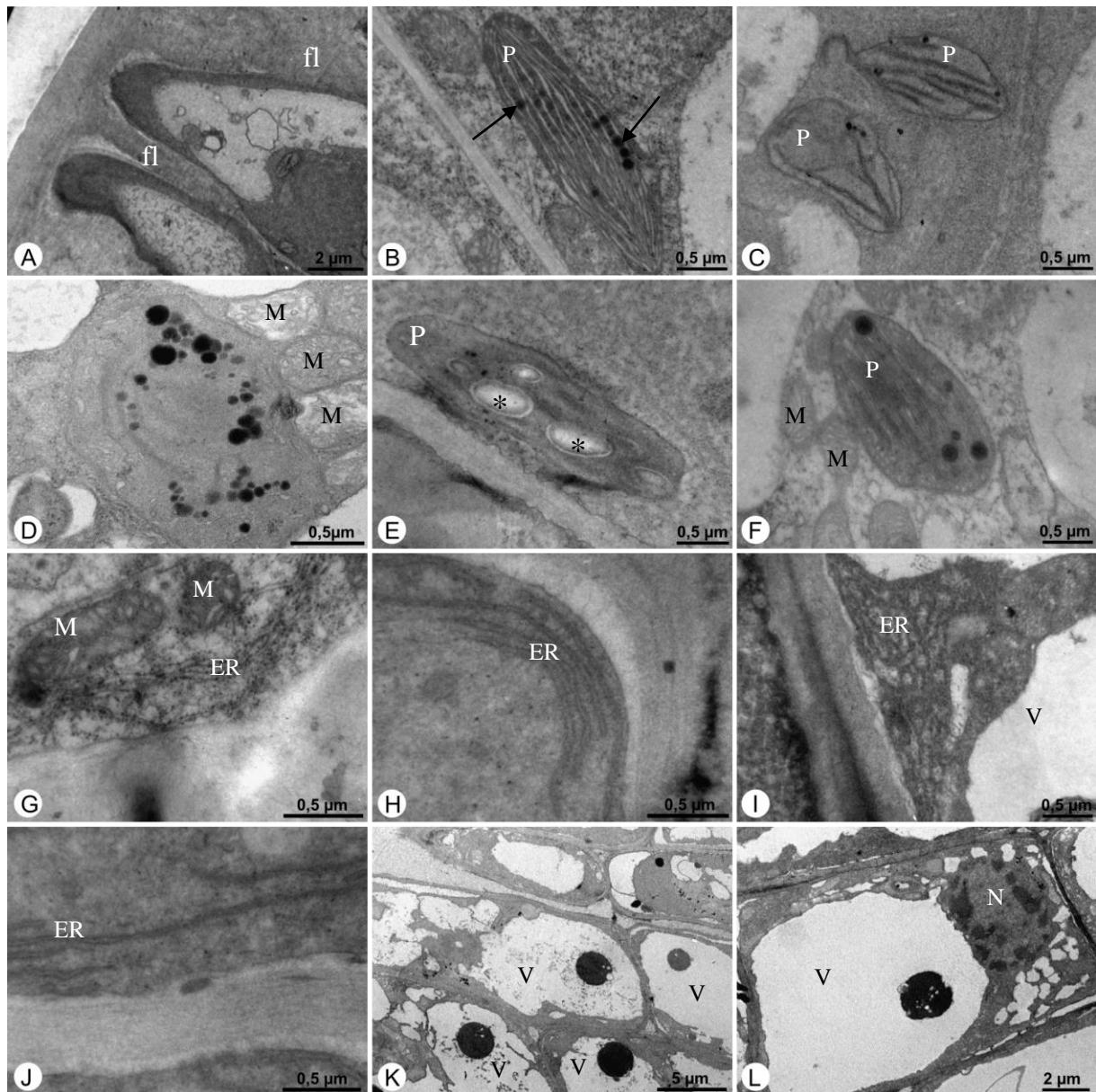


Figure 4. Transmission electron micrographs (TEM) of the secretory epidermal cells of extrafloral nectaries (EFN) of *Passiflora* L. species. **A.** Prominent cuticular flanges (fl) in *P. misera* Kunth. **B.** *P. morifolia* Mast. showing plastids with well developed thylakoids and plastoglobules (arrows). **C.** *P. misera* showing plastids with sparsely-distributed thylakoids and small plastoglobules. **D.** Plastid with sparsely-distributed thylakoids and plastoglobules of varying sizes in *P. actinia* Hook. **E.** Plastid with starch (*) in *P. ligularis* Juss. **F.** Plastids surrounded by mitochondria in *P. morifolia* Mast. **G.** Rough endoplasmic reticulum near the plasma membrane of external epidermal cell of *P. morifolia*. **H.** Smooth endoplasmic reticulum near the plasma membrane of external epidermal cell of *P. contracta* Vitta. **I.** Stacked and dilated endoplasmic reticulum near the plasma membrane of *P. actinia*. **J.** Smooth endoplasmic reticulum touching the membrane of epidermal cell of *P. contracta*. **K-L.** Vacuolar system of the secretory epidermal cells of *P. actinia* composed of a large vacuole, with droplets shaped electron-dense masses in their interior, and numerous small vacuoles. ER = endoplasmic reticulum; M = mitochondria; N = nucleus; P = plastid; V = vacuole.



reticulum was usually observed to be stacked and very dilated (Fig. 4I), except in *P. contracta* (Fig. 4H e 4J) and *P. misera*, in which the dilation of the reticulum was not observed.

The vacuolar system of the secretory epidermal cells of the studied EFN was usually composed of a large vacuole that may occupy more than half of the cell, in addition to small vacuoles dispersed or grouped in a certain region (Fig. 4K-L). The vacuoles of *P. actinia*, *P. ligularis* and *P. morifolia* may have electron-dense masses in their interior, which were either droplets shaped or amorphous (Fig. 4K-L and 5A-B). This characteristic was not observed in *P. contracta*, nor in *P. misera*.

In the secretory epidermal cells of the EFN that show dilations of the endoplasmic reticulum (*P. actinia*, *P. ligularis* and *P. morifolia*), it was possible to observe small vacuoles and vesicles near the plasma membrane (Fig. 4I and 5C-F). In *P. actinia* it was also possible to verify the occurrence of secretion within the endoplasmic reticulum (Fig. 5G). The two species in which the endoplasmic reticulum is not dilated were not observed to have vesicles close to the membrane.

The majority of the species showed a high concentration of plasmodesmata in the secretory epidermal cells (Fig. 5H-K), except for *P. actinia* (Fig. 5C).

Subcuticular space was found only in *P. actinia* (Fig. 5L-N), this area being filled with secretion (Fig. 5L), as well as in intercellular region (Fig. 5O). There was no cuticle rupture in any of the analyzed EFN.

In the resin gland of *Passiflora sublanceolata* the secretory epidermis was observed to be usually uniseriate. Its cells had smooth endoplasmic reticulum in great quantity, which was dispersed throughout the cell (Fig. 6A-D). The reticulum was also dilated in some regions (Fig. 6D). Mitochondria (Fig. 6A) and several plastids (Fig. 6E) were observed in between the

reticulum. Plastids, proportionally smaller than those present in extrafloral nectaries, had small plastoglobules in their interior (Fig. 6E).

Inside the reticulum there were portions with an electron-dense content, indicating the presence of secretion (Fig. 6C). Electron-dense droplets were also seen scattered through the cytoplasm (Fig. 6B-C and 6F). A large number of vesicles were observed throughout the cell (Fig. 6D-E). Plasmodesmata were not observed in large number in secretory epidermal cells.

DISCUSSION

The histochemical and ultrastructural analyses of the secretory glands have shown to be important tools in the delimitation between extrafloral nectaries and resin glands present in the leaves of *Passiflora*, as well as allowing the detection of different modes of exudate release.

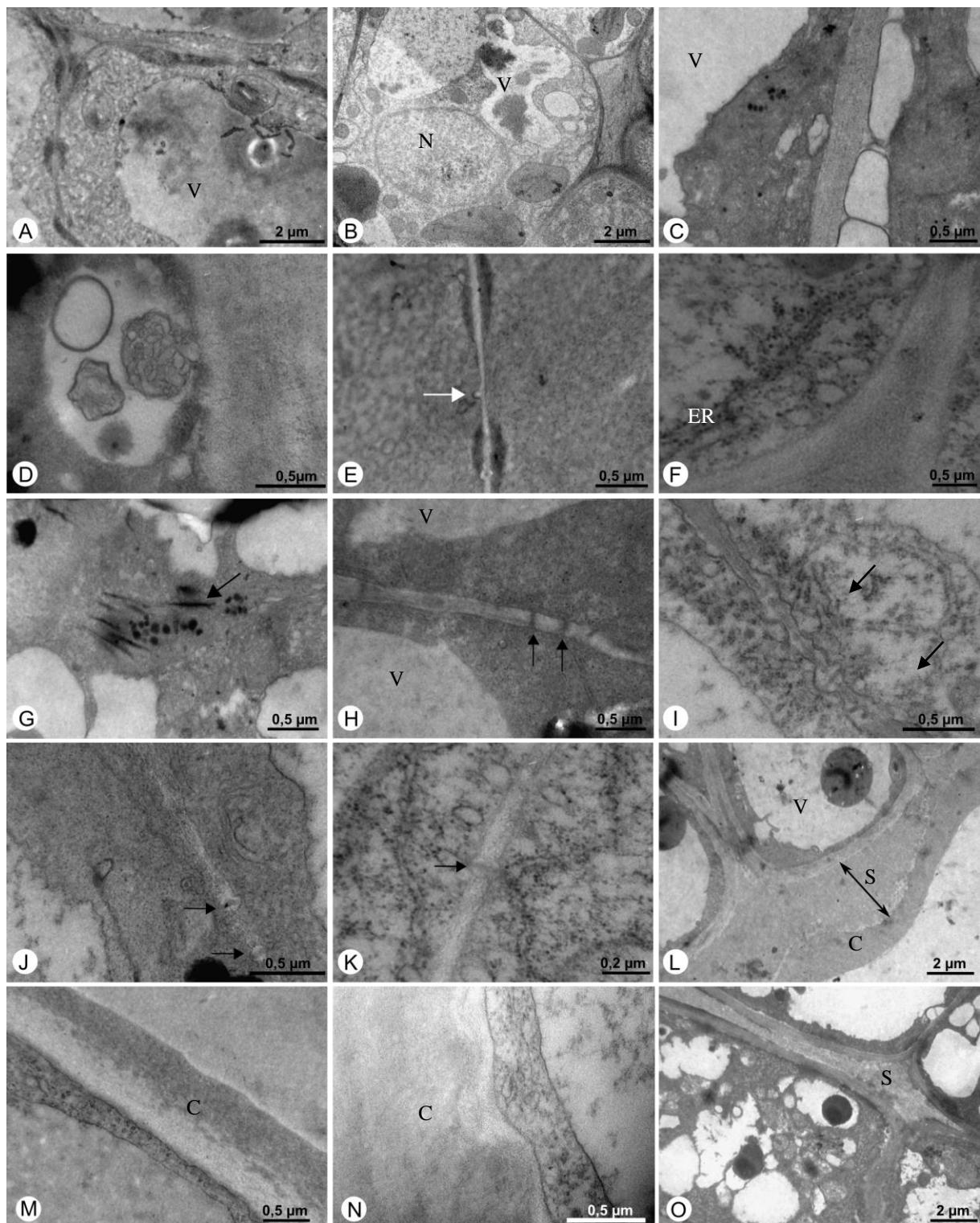
Generally speaking, the resin is a mixture of volatile and non-volatile terpenoids and/or phenolic compounds (Langenheim 2003). In addition, nectar has sugars (sucrose, glucose and fructose) as its main constituents, as well as minor components such as inorganic ions, amino acids and proteins, lipids, organic acids, phenolic substances and alkaloids (Fahn 1988, Elias 1983, Nicolson & Thornburg 2007).

The detection of carbohydrates in the epidermal secretory cells and the secretory parenchyma of *P. actinia*, *P. contracta*, *P. deidamiooides*, *P. ligularis*, *P. misera*, *P. morifolia*, and *P. suberosa* corroborates the classification of the glands present in the leaves of these species as extrafloral nectaries. As well as the positive reaction to different lipid compounds in *P. foetida* and *P. sublanceolata*, these results indicate the resin nature of these species' secretion, especially the presence of terpenoids in the secretion of *P. foetida*.

Cardoso-Gustavson *et al.* (2013) when analyzing extrafloral nectaries of *P. alata* and *P. edulis* also verified the presence of polysaccharides in the secretory cells of both species. In the extrafloral nectaries of the seven species analyzed here, we did not find lipids stored in the secretory cells, different from what was reported by Cardoso-Gustavson *et al.* (2013) for *P. alata*. These authors also report the presence of terpenoids, phenolic compounds, flavonoids and alkaloids in the secretory tissue.

Phenolic compounds produced by plants have with different functions, such as pigmentation, growth, reproduction, attraction and repulsion of different organisms, resistance to different pathogens, among others (Lattanzio *et al.* 2006, Bhattacharya *et al.* 2010). Phenolics can be stored in strategic locations where they act as signals, or with direct defense purposes. In general, these purposes include defense as an antibiotic, or by providing unpalatable properties (Lattanzio *et al.* 2006), and they may also include a role in the defense of nectar against predators (Baker & Baker 1983).

Figure 5. Transmission electron micrographs (TEM) of the secretory epidermal cells of extrafloral nectaries (EFN) of *Passiflora* L. species. **A-B.** Vacuoles of *P. ligularis* Juss (**A**) and *P. morifolia* Mast. (**B**) with amorphous electron-dense masses in their interior. **C.** Small vacuoles near the plasma membrane in *P. actinia* Hook. **D.** Vesicle, with complexe content, in contact with the plasma membrane in *P. actinia*. **E.** Small vesicle in contact with the plasma membrane in *P. ligularis*. **F.** Vesicles near the plasma membrane in *P. morifolia* Mast. **G.** Secretion within the endoplasmic reticulum (arrow) in *P. actinia*. **H-K.** *P. contracta* Vitta (**H**), *P. ligularis* (**I**), *P. misera* Kunth (**J**) and *P. morifolia* (**K**) showing plasmodesmata connections (arrows). **L.** Subcuticular space filled with secretion in *P. actinia*. **M-N.** Cuticular region in *P. ligularis* (**M**) and *P. morifolia* (**N**), no subcuticular space. **O.** Intercellular region filled with secretion in *P. actinia*. C = cuticle; ER = endoplasmic reticulum; N = nucleus; V = vacuole, S = secretion.



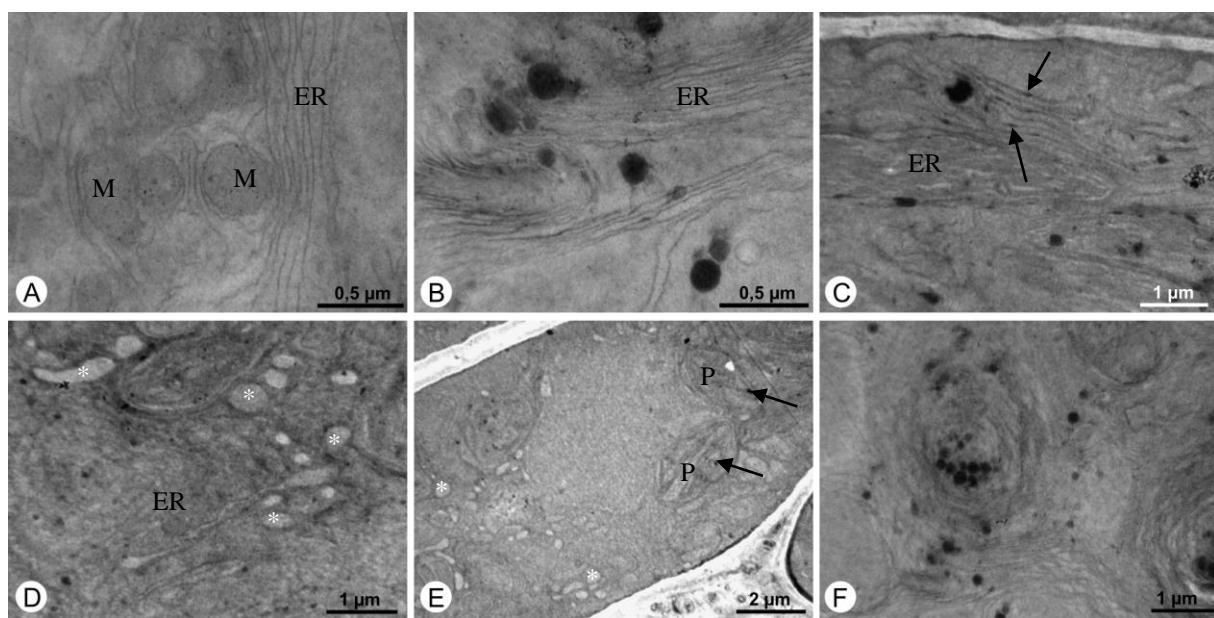


Figure 6. Transmission electron micrographs (TEM) of the secretory epidermal cells of resin glands of *P. sublanceolata* (Killip) MacDougal. **A-C.** Smooth endoplasmic reticulum dispersed throughout the cell. **A.** Several mitochondria between the reticulum. **B-C.** Electron-dense droplets scattered through the cytoplasm. **C.** Presence of electron-dense content inside the reticulum (arrow). **D-E.** Vesicles scattered through the cytoplasm (*). **E.** Plastids with small plastoglobules in their interior (arrows). **F.** Electron-dense droplets scattered through the cytoplasm. ER = endoplasmic reticulum; M = mitochondria; P = plastid.

Cardoso-Gustavson *et al.* (2013) have related the presence and retention of phenolic compounds in the extrafloral nectaries of *Passiflora alata*, with the reduction of herbivory of the glands. In the species analyzed here, phenolic compounds, although not detected in the secretory cells of extrafloral nectaries, may also occur in non-secretory epidermal cells and in the non-secretory parenchyma, suggesting a possible ecological role in the reduction of herbivory of extrafloral nectaries as proposed by Cardoso-Gustavson *et al.* (2013).

The presence of electron-dense content inside the vacuole has already been related to the presence of phenolic compounds in extrafloral nectaries of some species (Paiva & Machado 2006, Plachno *et al.* 2007). With the onset of secretion, the vacuoles present in the cells of the nectary epithelium become more prominent (Durkee 1982), as observed for all of

the five species analyzed here, in which large and small vacuoles showed electron-dense contents. However, histochemical analyses did not detect the presence of these substances in the nectary epithelium, which may occur in an amount that is not detectable by the reagents used. Alternatively, the electron-dense content of the vacuoles could be another substance other than phenolic compounds.

Lipophilic compounds are generally combined with terpenoids in the resin of Angiosperms, especially those occurring on the surface of young organs (Langenheim 2003). Mono and sesquiterpenes are generally volatile, giving fluidity to the resin and providing more flexibility in a medium with viscous components (Langenheim 2003). In the resin glands of *Passiflora foetida*, in addition to the lipid compounds that were also verified for *P. sublanceolata*, we observed a positive blue colored reaction with the use of Nadi reagent, indicating the presence of mono- and/or sesquiterpenes. The secretion present in these two species is viscous and does not become rigid at any time, a property that can be given by the presence of mono and/or sesquiterpenes. Langenheim (2003) points out that monoterpenes are predominant in conifer resin, while sesquiterpenes generally dominate the composition of flowering plants, giving an indication of the presence of sesquiterpenes in *Passiflora* resin, thus directing the future chemical analyzes of this exudate.

Osmophilic globules in plastids, which are termed “plastoglobules”, are lipid droplets reported for floral and extrafloral nectaries of several species (Bory & Clair-Maczulajtys 1990, Hamzah & Atim 1991, Stpiczynska *et al.* 2003, Stpiczynska *et al.* 2005, Wist & Davis 2006). The presence of lipids in the nectar composition is common and has already been cited for nectaries of several species (Baker & Baker 1975, Fahn 1979; Fahn 1988). Although the presence of electron-dense content in the plastids of secretory cell was detected, the

histochemical analyzes did not detect lipids in the analyzed extrafloral nectaries of *Passiflora*, which indicates that they should be present in small amounts.

Regarding the exudate release mode in *Passiflora* species, according to Durkee (1982) the nectar is secreted into the apoplast of the secretory tissue, apparently being accumulated below the cuticle, which ruptures with the onset of secretion. Among the studied species, it was only possible to verify the accumulation of secretion below the cuticle only for *P. actinia*. In none of the analyzed samples it was possible to verify cuticle rupture. Cardoso-Gustavson *et al.* (2013) did not observe cuticle disruption when studying the development of extrafloral nectaries of *P. alata*. Such disruption was reported only for *P. edulis*, which was related to the behavior of nectar collecting ants. Although Lemos *et al.* (Chapter 1) have observed a rupture in the cuticle of some species, the authors consider it unlikely to be the nectar release mode, given that the nectar production extends for several days and few samples have shown this feature. The analyses also do not indicate the rupture of the cuticle as a way of releasing the nectar, being more likely that the cuticle is permeable to the nectar, especially considering that there were no signs of canaliculi or pores.

The foliar glands of *Passiflora sublanceolata* show characteristics that are very similar to those reported by Durkee *et al.* (1984) for the resin glands present in leaves, stipules and bracts of two *P. foetida* varieties.

In *P. foetida*, the immature resin glands show an abundance of rough endoplasmic reticulum, presence of lipid droplets in the cytoplasm, chloroplasts with well-developed lamellae and with starch in them, vacuoles with osmiophilic material, and vesicles close to the plasma membrane (Durkee *et al.* 1984). On the other hand, during the secretory phase of these glands, the rough endoplasmic reticulum becomes smooth reticulum, lipid droplets dispersed

in the cytoplasm are absent, and there's a decrease in plastid stroma and starch content, additional to the eventual presence of lipid droplets (Durkee *et al.*, 1984).

In *P. sublanceolata* we observed that during their secretory phase, the glands also show a large amount of smooth endoplasmic reticulum, which in some points may be very dilated and form vesicles at the end of the cisterns, which should be involved in the release of secretion to the external environment, as suggested by Durkee *et al.* (1984). Thus, granulocrine secretion could also occur in this gland, in addition to the eccrine secretion type. Plastids also had little-developed stroma with electron-dense lipid droplets in its interior. However, unlike *P. foetida* (Durkee *et al.* 1984), *P. sublanceolata* was observed to have lipid droplets dispersed in the cytoplasm of its secretory epidermal cells, corroborating the histochemical analysis.

During the secretory period, the increase in the endoplasmic reticulum appears to be one of the most striking features, reported as one of the most conspicuous components for nectaries (Rachmilevitz & Fahn 1973, Baker *et al.* 1978, Fahn 1979, 1988, Durkee 1982, 1983, Paiva & Machado 2006, Nepi 2007). Durkee (1982) describes the increase in ER during the secretory phase of *Passiflora* extrafloral nectaries, while the cisterns may be stacked and positioned at the periphery of the cells, as well as distributed through the cytosol. According to the author, the cisterns are not dilated. Along with the lack of evidence of vesicle fusion with the plasma membrane, the observation regarding the cisterns has lead the author to postulate that ER would not be involved in the transport of nectar, which would be related to the occurrence of eccrine secretion in the studied *Passiflora* species (Durkee 1982).

However, among the analyzed species that have EFN, we observed dilations of endoplasmic reticulum cisternae in at least three species (*P. actinia*, *P. ligularis* and *P. morifolia*). These species also showed evidence of fusion of vesicles with the plasma

membrane. These vesicles must have originated from the dilations in the terminal portions of the cisternae of the endoplasmic reticulum. In the other two species, the ER was observed to be stacked in the region close to the membrane, and in *P. contracta* it appears to be in direct contact with the plasma membrane.

ER dilation is a common feature in nectary secreting cells, as well as the formation of vesicles in the cisterns' terminal portions, an observation often related to granulocrine mode of nectar secretion (Rachmilevitz & Fahn 1973, Fahn 1979, Fahn 1988, Paiva & Machado 2006). Therefore, there is evidence to consider the occurrence of granulocrine secretion in extrafloral nectaries of *Passiflora* species, which does not invalidate the occurrence of eccrine secretion in some of the species analyzed here (such as *P. contracta* and *P. misera*), as verified and postulated by Durkee (1982) for at least nine species. However, one of the species on which we verified the occurrence of ER dilation and fusion of vesicles with the plasma membrane, *P. ligularis*, was also analyzed by Durkee (1982), who found no evidence of granulocrine secretion. Thus, there is still the possibility of the two secretion modes occurring in the same species, either together or under different circumstances. Yet, it's possible that the analyzed glands with an absence of ER dilation and intense vesicle formation were not secreting nectar/resin at the time they were sampled, given that the same gland may not secrete substances every day.

In summary, the results obtained here corroborate the classification proposed by Lemos *et al.* (Chapter 1) for secretory glands in *Passiflora*, that is, the occurrence of nectaries and resin glands in this plant group. Beyond that, we highlight that the detection of what are likely to be lipophilic compounds in the nectar secreting cells was only possible due to the complementary analysis of ultrastructure data, leading to a greater sharing of compounds that are present in the exudate of the two glandular types. This observation reinforces the

possibility of a gradual change from extrafloral nectaries to resin glands, as proposed by Dukee *et al.* (1984).

Considering the structures described as "gland tipped segments" or "gland tipped hairs" present only in species of the *Dysosmia* section (Vanderplank 2013) to be defined as resin glands based on from morphological, ultrastructural and chemical studies, as it has been shown by the work of Lemos and collaborators (Chapters 1 and 3) in four of the 21 species of the group, resin glands can be considered an autapomorphic feature of the group, if its monophyly is confirmed in future phylogenetic studies.

REFERENCES

- BAKER, H. G.; BAKER, I. 1975. **Studies of nectar constitution and pollinator-plant coevolution.** In: GILBERT, L. E.; RAVEN, P. H. (eds.). Coevolution of animals and plants. University of Texas Press, Austin.
- BAKER, H. G.; BAKER, I. 1983. **A brief historical review of the chemistry of floral nectar.** In: BENTLEY, B.; ELIAS, T. (ed). The biology of nectaries. Columbia University Press, New York.
- BAKER, H. G.; OPLER, P. A.; BAKER, I. 1978. A comparison of the amino acid complement of floral and extrafloral nectars. **Botanical Gazette** 139 (3): 322-332.
- BHATTACHARYA, A.; SOOD, P.; CITOVSKY, V. 2010. The roles of plant phenolics in defense and communication during Agrobacterium and Rhizobium infection. **Molecular Plant Pathology** 11(5): 705–719.
- BORY, G.; CLAIR-MACZULAJTYS, D. 1990. Importance of foliar nectaries in the physiology of tree of heaven (*Ailanthus glandulosa* Desf., Simaroubaceae). Bulletin de la Société Botanique de France. **Lettres Botaniques** 137: 139-155.

CAIN, A. J. 1947. The use of nile blue in the examination of lipoids. **Journal of Cell Science** 88 (3):383-392.

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.

DAVID, R.; CARDE, J. P. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, Série D** 258: 1338–1340.

DEMARCO, D. 2017. **Histochemical Analysis of Plant Secretory Structures.** In: PELLICCIARI, C.; BIGGIOGERA. M. (eds). Methods in Molecular Biology. VI ed. Springer New York, New York.

DURKEE, L. T. 1982. The floral and extrafloral nectarines of *Passiflora*. II. The extra-floral nectar. **American Journal of Botany** 69 (9): 1420-1428.

DURKEE, L. T. 1983. **The ultrastructure of floral and extrafloral nectaries.** In: BENTLEY B., ELIAS T. (edis). 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** 71:596-602.

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.

- FAHN, A. 1979. **Secretory tissues in plants**. Academic Press Inc, London.
- FAHN, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. **New Phytologist** 108: 29-257.
- FEUILLET, C. 2004. **Passifloraceae (Passion Flower Family)**. In: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. (Eds.) *Flowering Plants of the Neotropics*. Princeton University Press & New York Botanical Garden, Oxford.
- FEUILLET, C. P.; MACDOUGAL, J. M. 2004. A new infrageneric classification of *Passiflora*. **Passiflora** 13: 34-38.
- GANTER, P.; JOLLES, G. 1969. **Histochemie Normale et Pathologique**. Vol. 1. Gauthier-Villars, Paris.
- GANTER, P.; JOLLES, G. 1970. **Histochemie Normale et Pathologique**. Vol. 2. Gauthier-Villars, Paris.
- GREGORY, M.; BAAS, P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of thdicotyledons. **Israel Journal of Botany** 38: 125–174.
- HAMZAH, S.; ATIM A. B. 1991. Ultrastructure of the principal extrafloral nectaries of *hevea brasiliensis*. **Journal of Natural Rubber Research** 6 (3): 172-183.
- FISHER, D. B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemistry** 16:92-96.
- 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.
- KARNOVSKY, M. J. 1965. A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy. **The Journal of Cell Biology** 27: 137-138.
- KILLIP, E. P. 1938. **The American species of Passifloraceae**. Publications of the Field Museum of Natural History 19: 1-613.

- KIRK, P. W. 1970. Neutral red as a lipid fluorochrome. **Stain Technology** 45: 1–4.
- 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.
- LANGENHEIM, J. H. 2003. **Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany.** Timber Press, Cambridge.
- LATTANZIO, V., LATTANZIO, V.M.T.; CARDINALI, A. 2006. **Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects.** In: Phytochemistry Advances in Research. Research Signpost, India.
- 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.
- MEZZONATO-PIRES, A. C.; SALIMENA, F. R. G.; BERNACCI, L. C. 2013. Passifloraceae na Serra Negra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia** 64: 123–136.
- NEPI, M. 2007. **Nectary structure and ultrastructure.** In: NICOLSON, S. W.; NEPI, M. & PACINI, E (eds.). Nectaries and nectar. Spring-Verlag, The Netherlands.
- NICOLSON, S. W., THORNBURG, R. W. 2007. **Nectar chemistry.** In: NICOLSON, S. W.; NEPI, M. & PACINI, E (eds.). Nectaries and nectar. Spring-Verlag, The Netherlands.

- McMANUS, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology** 23: 99–108.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma** 59: 367-373.
- PAIVA, E. A. S.; MACHADO, S. R. 2006. Ontogênese, anatomia e ultra-estrutura dos nectários extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae – Caesalpinioideae). **Acta Botanica Brasilica** 20 (2): 471-482.
- PEARSE, A. G. E. 1985. **Histochemistry - theoretical and applied: preparative and optical technology**. v. 1. 4.ed. Churchill Livingston, Edinburgh.
- PIZZOLATO, T. D. 1977. Staining of *Tilia* Mucilages with Mayer's Tannic Acid-Ferric Chloride. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** 104 (3): 277-279.
- PLACHNO, B. J.; SWIATEK, P.; WISTUBA, A. 2007. The giant extra-floral nectaries of carnivorous *Heliamphora* folliculate: architecture and ultrastructure. **Acta Biologica Cracoviensis Series Botanica** 49 (2): 91-104.
- RACHMILEVITZ, T.; FAHN, A. 1973. Ultrastructure of nectaries of *Vinca rosea* L., *Vinca major* L. and *Citrus sinensis* Osbeck cv. Valencia and its relation to the mechanism of nectar secretion. **Annals of Botany**, New Series 37 (149): 1-9.
- REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 17: 208–212.
- ROCHA, D. I.; 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: 619-626.
- SIMPSON, M. G. 2010. **Plant Systematics**. 2^a ed. Editora Elsevier.

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.

STPICZYNSKA, M.; K. L. DAVIES, K. L.; GREGG, A. 2003. Nectary structure and nectar secretion in *Maxillaria coccinea* (Jacq.) L.O. Williams ex Hodge (Orchidaceae). **Annals of Botany** 93: 87-95.

STPICZYNSKA, M.; K. L. DAVIES, K. L.; GREGG, A. 2005. Comparative account of nectary structure in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). **Annals of Botany** 95: 749–756.

ULMER, T.; MACDOUGAL, M. J. 2004. **Passiflora:** Passionflowers of the world. Timber Press, Inc., Portland.

VANDERPLANK, J. 2000. **Passion Flowers.** 3rd edition The MIT Press, Cambridge, Massachusetts.

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

WATSON, M. L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology** 4: 475–478.

WIST, T. J.; DAVIS, A. R. 2006. Floral nectar production and nectary anatomy and a ultrastructure of *Echinacea purpurea* (Asteraceae). **Annals of Botany** 97: 177–193.

Capítulo 3

Glândulas foliares em *Passiflora* L.: análise de lipídios e aminoácidos no exsudato dos nectários extraflorais e glândulas de resina

Renata CC Lemos, Déborah YAC SANTOS, Eny IS FLOH e Gladys FA Melo-de-Pinna

Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, CEP 05508-090, São Paulo, Brasil.

RESUMO

A grande maioria das espécies de *Passiflora* L. apresenta nectários extraflorais (NEF), que podem estar presentes no pecíolo, lâmina foliar, brácteas e estípulas. Glândulas de resina, ocorrendo nas mesmas regiões dos NEF, também foram descritas para espécies de *Passiflora* pertencentes à secção *Dysosmia* DC. Contudo, pouco se sabe sobre a composição química dos exsudados dos dois tipos glandulares. No presente estudo são descritos dados preliminares sobre a composição lipídica e de aminoácidos presentes no néctar extrafloral e resina de espécies de *Passiflora*, procurando uma maior diferenciação entre os dois tipos de exsudados. Para isso, a secreção coletada de plantas mantidas em casa de vegetação foi analisada por cromatografia em camada delgada, procurando diferenciar as classes lipídicas, e por cromatografia líquida de alta eficiência, para identificar os aminoácidos presentes em cada amostra. As análises realizadas demonstraram a presença de mais de uma classe lipídica no néctar e na resina extrafloral de *Passiflora*. Foram identificados ácidos graxos no néctar de todas as espécies e na resina de *Passiflora foetida* L., e triglicerídeo no néctar de *P. morifolia* Mast. e na resina de *P. sublanceolata* (Killip) MacDougal. Para as amostras de resina também foi confirmada a presença de terpenoides, aparentemente com composição muito diferente entre as duas espécies. Em relação aos aminoácidos, há uma grande variedade de aminoácidos presentes nas amostras, tendo sido encontrados no néctar e na resina os 21 aminoácidos utilizados como padrão. Os resultados para resina de *Passiflora*, que demonstraram variações nítidas na composição lipídica das duas espécies, indicam a necessidade de se conhecer mais sobre a composição química e estrutura de outras espécies do gênero que podem apresentar esse tipo de secreção.

INTRODUÇÃO

A grande maioria das espécies de *Passiflora* L. apresenta nectários extraflorais (NEF), que podem estar presentes no pecíolo, lâmina foliar, brácteas e estípulas (Feuillet & MacDougal 2003, Ulmer & MacDougal 2004), sendo esta uma das características utilizadas como diagnóstica para espécies do grupo (Killip 1938, Cervi 2006, Ulmer & MacDougal 2004, Souza & Lorenzi 2012). Além de nectários extraflorais, glândulas de resina também foram descritas para espécies de *Passiflora*, ocorrendo no pecíolo, lâmina foliar, brácteas e estípulas de espécies pertencentes à secção *Dysosmia* DC. (Durkee *et al.* 1984, capítulo 1).

Os nectários são estruturas especializadas que secretam uma substância conhecida como néctar (Elias 1983, Pacini & Nicolson 2007), que tem como principais constituintes sacarose, glicose e frutose (Fahn 1979, Elias 1983). A composição do néctar entre os diferentes táxons apresenta grande variação, tanto quantitativa quanto qualitativamente, ocorrendo: **água**, cuja origem pode ser do floema ou xilema, com uma concentração menor sendo encontrada em nectários cuja terminação vascular é composta apenas de floema; **carboidratos**, o principal soluto do néctar, podendo estar na forma de sacarose, glicose ou frutose, com demais formas, como mono e dissacarídeos, ocorrendo em menor proporção; **aminoácidos**, o segundo maior soluto constituinte do néctar, inclui uma grande variedade de aminoácidos essenciais e não essenciais; **proteínas**, incluindo enzimas, parecem possuir funções homeostáticas e regulatória; **íons**, derivados do xilema e/ou floema; **lipídios**, fonte altamente energética, geralmente ocorrem apenas traços, pode ocorrer na forma de terpenoides; **metabólitos secundários**, como fenóis e alcaloides (Pacini & Nicolson 2007).

Em *Passiflora*, os poucos estudos químicos realizados com NEF focam especialmente na concentração de açúcares, demonstrando grande concentração de

glicose, frutose e sacarose, podendo variar entre as espécies e entre os diferentes nectários de uma mesma espécie (Durkee 1982, Rocha *et al.* 2009, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013). Em *P. amethystina* J.C. Mikan, por exemplo, a concentração de açúcares nas glândulas peciolares (52,82%) é maior que nas glândulas laminares (39,67%), sendo que, nas peciolares, 1,75% desses açúcares corresponde à frutose, 3,76% à glicose e 47,31% à sacarose (Rocha *et al.* 2009).

Alguns trabalhos relatam a ocorrência de outras substâncias no néctar extrafloral de algumas espécies de *Passiflora*, como aminoácidos, flavonoides e alcaloides (Baker *et al.* 1978, Durkee 1982, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013).

A análise química dos componentes do exsudato das glândulas em *Passiflora*, a grande maioria descritas como NEF, tornou-se mais relevante a partir do estudo de Durkee e colaboradores (1984) com *P. foetida* L., espécie que era descrita por Roth (1969) como apresentando nectários extraflorais. Durkee e colaboradores (1984) relataram que o exsudato das glândulas de *P. foetida* não apresentam açúcares nem aminoácidos, sendo insolúvel em água, pouco solúvel em acetona e completamente solúvel em etanol 95% e xileno, além de reagirem fortemente com tetróxido de ósmio, utilizado para revelar a presença de lipídios. Dessa forma, os autores definem as glândulas de *P. foetida* como glândulas de resina.

A resina presente em *P. foetida* já foi analisada quanto à presença de uma variedade de substâncias químicas, tendo sido verificada a presença de flavonoides (Echeverri *et al.* 1991) e lactonas, nomeadas genericamente de passifloricinas (Echeverri *et al.* 2001, Cardona *et al.* 2004). Sendo que ao menos um dos flavonoides presentes, ermanina, é capaz de diminuir a herbivoria por larvas de borboleta (Echeverri *et al.* 1991). Também já foi relatado que as glândulas presentes nas brácteas de *Passiflora foetida* estão envolvidas na captura e digestão de insetos, tendo essa espécie

sido considerada carnívora (Radhamani *et al.* 1995), no entanto as glândulas presentes nas folhas dessa espécie não foram analisadas quanto à possibilidade de carnivoria.

No presente estudo, apresentamos dados obtidos a partir de análises químicas realizadas para verificar e identificar lipídios e aminoácidos presentes no exsudato de espécies de *Passiflora* que apresentam nectários extraflorais e glândulas de resina. Procuramos iniciar uma coleta de informações que futuramente poderão ajudar na compreensão da evolução das estruturas secretoras presentes no gênero, bem como elucidar a possível presença de lipídios nos néctares extraflorais, como indicado em análises ultraestruturais (Capítulo 2).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de secreção de glândulas foliares presentes em 10 espécies de *Passiflora* L., pertencentes à aos subgêneros *Decaloba* (DC.) Rchb., *Deidamiooides* (Harms) Killip e *Passiflora* (Tabela 1), foram analisadas quanto à presença de lipídios e aminoácidos em sua composição química. Oito espécies analisadas apresentam nectários extraflorais, enquanto duas espécies apresentam glândulas de resina. As espécies analisadas e a localização das glândulas nas quais foram coletadas as amostras de néctar ou resina estão resumidas na Tabela 1. Todas as amostras foram coletadas em plantas mantidas em casa de vegetação no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e BAG Passifloras da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC - Ilhéus - BA).

As coletas de néctar e resina foram conduzidas no período da manhã (7-11h), em dias alternados, entre novembro de 2015 e novembro de 2016. A amostragem realizada foi de três a cinco indivíduos por espécie. As amostras de néctar foram retiradas de ramos jovens, nos quais os nectários extraflorais são mais ativos, tomando o cuidado

para não utilizar secreção de nectários que apresentavam fungos. O néctar foi coletado com auxílio de capilares de 1 e 5 µl, dependendo da disponibilidade de néctar em cada indivíduo. As amostras de resina foram coletadas de folhas totalmente expandidas, as quais apresentaram maior quantidade de resina disponível. Para a coleta de resina, capilares foram cuidadosamente encostados na superfície glandular, ficando a resina aderida à parte externa dos capilares. As amostras coletadas foram armazenadas à -20°C até serem processadas.

Tabela 1. Espécies de *Passiflora* L. analisadas, além de tipo e localização das glândulas de onde foram coletados os exsudatos.

Subgênero	Espécie	Tipo glandular	Localização das glândulas	Voucher
Decaloba	<i>P. misera</i> Kunth	Nectário extrafloral	Fase abaxial da lâmina foliar	R.C.C. Lemos 57 ¹
	<i>P. morifolia</i> Mast.	Nectário extrafloral	Pecíolo	R.C.C. Lemos 62 ¹
	<i>P. suberosa</i> L.	Nectário extrafloral	Pecíolo	R.C.C. Lemos 59 ¹
Passiflora	<i>P. contracta</i> Vitta	Nectário extrafloral	Pecíolo	R.C.C. Lemos 61 ¹
	<i>P. actinia</i> Hook.	Nectário extrafloral	Pecíolo	R.C.C. Lemos 55 ¹
	<i>P. edulis</i> Sims	Nectário extrafloral	Pecíolo	R.C.C. Lemos 63 ¹
	<i>P. incarnata</i> L.	Nectário extrafloral	Pecíolo	R.C.C. Lemos 53 ¹
	<i>P. foetida</i> L.	Glândula de resina	Pecíolo e lâmina foliar	R.C.C. Lemos 48 ¹
	<i>P. ligularis</i> Juss.	Nectário extrafloral	Pecíolo	R.C.C. Lemos 56 ¹
	<i>P. sublanceolata</i> (Killip) MacDougal	Glândula de resina	Pecíolo e lâmina foliar	R.C.C. Lemos 41 ²

¹ cultivada em casa de vegetação no Instituto de Biociências da USP e ² cultivada, BAG Passifloras, UESC (Ilhéus - BA).

Para as análises da presença de lipídios e aminoácidos as amostras foram agrupadas por espécie, visto que a quantidade de secreção coletada por indivíduo foi, em alguns casos, inferior ao necessário para realização das análises. A porção lipídica

Lipídios e aminoácidos em glândulas foliares de *Passiflora* L. Capítulo 3

do néctar ($50\mu\text{l}$) foi obtida pela lavagem da amostra com $50\mu\text{l}$ de solução de hexano:éter (1:1). A fase apolar foi transferida para novo frasco e ao resíduo aquoso foram acrescentados $50\mu\text{l}$ de água destilada. As amostras com resina foram solubilizadas em $150\mu\text{l}$ de butanol e particionadas com $150\mu\text{l}$ de água destilada por três vezes. A cada partição, a fase aquosa foi transferida para novo frasco. As fases aquosas, tanto do néctar como da resina, foram utilizadas para a análise de aminoácidos

As fases apolares obtidas das amostras foram analisadas quanto a presença de lipídios. Para isso foram secas sob fluxo de nitrogênio e ressuspendidas em $50\mu\text{l}$ de solução de hexano:éter (1:1) para as amostras de néctar e $50\mu\text{l}$ de butanol para as amostras de resina. As amostras foram submetidas a cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas de sílica gel de 0,25mm (Whatman®) ao lado de substâncias padrões de ácido graxo livre (ácido oleico), monoglicerídeo (1-Oleoyl-rac-glycerol - Sigma®), diglicerídio (1,3 Dolein - Sigma®) e triglicerídio (Glyceryl trioleate - Sigma®). A cromatografia foi desenvolvida utilizando hexano:éter:ácido acético (80:20:1) como fase móvel. As placas cromatográficas foram reveladas com vapor de iodo (Olsson 1991) e as manchas dos padrões e dos componentes das amostras foram determinadas. O registro fotográfico foi feito imediatamente após a retirada das placas da cuba com iodo.

Sabendo que a resina de *P. foetida* apresentou reação para terpenoide em teste histoquímico (Capítulo 2), as fases apolares das duas amostras de resina também foram analisadas em CCD para detecção de terpenoides. A cromatografia foi desenvolvida utilizando como fase móvel tolueno:diclorometano:acetato de etila (4:3:3). Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi revelada com nebulização com solução etanólica de vanilina 1%, seguida de nebulização com solução etanólica de ácido

sulfúrico 10% e aquecimento a 100°C por 5 min (Harborne 1984). Lupeol (um triterpenoide) foi utilizado como referência.

As fases aquosas utilizadas para detecção de aminoácidos foram diluídas para as amostras de néctar, cada amostra foi diluída conforme pré-determinado em análise teste, variando de quatro à 40 vezes (Tabela 2). Para as amostras de resina foi utilizada a diluição inicial realizada durante a separação da fração aquosa. Os aminoácidos de cada amostra foram derivatizados em pré-coluna com *o*-ftaldialdeído (OPA) (Santa-Catarina *et al.* 2006) e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Utilizou-se coluna C18 em fase reversa, com tamanho da partícula de 5- μm e comprimento de 25 cm x 4,6 mm (Supelco-Supelcosil), mantida a 40 °C. A fase móvel foi composta pelo solvente 1 (0,1M de acetato de sódio, pH 7,2) e o solvente 2 (metanol 100%) combinados no seguinte gradiente baseado na porcentagem do solvente 2: 14% (0 – 15 min), 14 – 30% (15 – 20 min), 30 – 35% (20 – 24 min), 35 – 47% (24 – 26 min), 47 – 50% (26 – 34 min), 50 – 70% (34 – 38 min), 70 – 100% (38 – 40 min), 100% (40 – 42 min), 100 – 14% (42 – 42,1 min) e 14% (42,1 – 49 min), a uma taxa de fluxo de 1,1 mL min⁻¹ (Wu & Meininger 2008). O detector de fluorescência foi ajustado em 250 nm (excitação) e 480 nm (emissão). Picos e tempos de retenção foram comparados qualitativamente com padrões conhecidos de aminoácidos: ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), ácido γ -aminobutírico (Gaba), alanina (Ala), arginina (Arg), asparaginas (Asn), cisteina (Cys), fenilalanina (Phe), glicina (Gly), glutamina (Gln), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), ornitina (Orn), serina (Ser), tirosina (Tyr), treonina (Thr), triptofano (Trp) e valina (Val). Não foi possível separar aminoácidos ácido γ -aminobutírico (Gaba) e tirosina (Tyr), sendo esses tratados como dupla (Gaba + Tyr) no momento das descrições. Por se tratar de um estudo preliminar, e devido à disponibilidade de amostra, dados quantitativos não foram

utilizados, contudo foi possível realizar uma análise qualitativa quanto aos aminoácidos presentes ou ausentes (Tabela 3).

Uma análise semiquantitativa também foi realizada, sendo apresentada na forma de material suplementar (Anexo 1), indicando uma provável relação entre os aminoácidos mais ou menos representativos de cada amostra. Essa análise foi realizada com a medição das áreas dos picos que foram comparadas com os padrões. Contudo, esse tipo de análise necessita de repetições para verificar se a preparação inicial das amostras, com separação das frações lipídicas, pode ter influenciado na quantificação. Ou seja, se a parte dos aminoácidos presentes na secreções pode ter ficado retido na fase apolar de hexano:éter.

Tabela 2. Diluições utilizadas para as análises de aminoácidos no néctar extrafloral de *Passiflora* L.

Espécies	Diluição do néctar
<i>P. actinia</i> Hook.	20x
<i>P. contracta</i> Vitta	40x
<i>P. edulis</i> Sims	4x
<i>P. incarnata</i> L.	20x
<i>P. ligularis</i> Juss.	4x
<i>P. misera</i> Kunth	40x
<i>P. morifolia</i> Mast.	20x
<i>P. suberosa</i> L.	20x

RESULTADOS

Lipídios- As análises por CCD feitas com a fase de partição hexano:éter obtidas das amostras de néctar coletadas dos nectários extraflorais de espécies de *Passiflora* demonstram seguir um mesmo padrão de presença de classes lipídicas (Fig. 1A-B). Baseado nos padrões utilizados foi possível identificar a presença de ácidos graxos

livres em todas as oito espécies analisadas. Em *Passiflora morifolia* também foi detectada a presença de triglicerídios. Tanto os ácidos graxos livres como os triglicerídios estão presentes em quantidade inferior à outras três manchas de identidade incerta. O padrão para monoglycerídio apresentou pouca migração em relação ao ponto de origem, dessa forma as manchas presentes próximas ao ponto de origem podem tanto ter identidade de monoglycerídio como de lipídios mais complexos, como fosfolipídios, não sendo possível identificar na placa cromatográfica realizada. A segunda mancha detectada, nomeada como A na figura 1, apresentou migração entre os padrões de monoglycerídio e diglycerídio, não sendo possível determinar a identidade da classe lipídica, contudo a migração foi mais próxima ao padrão de monoglycerídio. Uma terceira mancha também não pode ser identificada, nomeada com B na figura 1, esta apresentou migração além de todos os padrões utilizados.

As amostras de resina das duas espécies de *Passiflora* analisadas apresentam aparência diferentes, notadas durante a coleta e manipulação da secreção. Enquanto a resina de *Passiflora foetida* é viscosa e amarela, a resina de *P. sublanceolata* parece ser mais fluida e incolor.

As frações de butanol das amostras de resina foram analisadas por CCD com a mesma fase móvel e padrões lipídicos utilizados para as amostras de néctar, revelando um padrão geral diferente das amostras de néctar, e também diferentes entre as duas espécies que secretam resina (Fig. 2A). Nas duas espécies, *Passiflora foetida* e *P. sublanceolata*, grande parte dos lipídios não apresenta migração do ponto de origem, não sendo possível determinar a classe, ou classes, lipídica ao qual se encaixa a maior parte dos lipídios presentes na resina (Fig. 2A). Uma outra mancha detectada que não pode ser identificada apresentou migração além de todos os padrões utilizados, nomeada como B na figura 2A, de maneira semelhante ao que foi verificado nas amostras de

néctar. Nas duas espécies também foi verificada outra mancha que não pode ser identificada, nomeada com A na figura 2A, esta apresentou migração entre o padrão de ácidos graxos livres e triglicerídos, sendo a migração levemente diferente entre as duas espécies, fator que pode ainda significar lipídios com identidades diferentes. Em *P. foetida* foi possível identificar a presença de ácidos graxos livres na composição de sua resina, classe que não está presente em quantidade detectável para a resina de *P. sublanceolata*. Já a presença de triglicerídos foi verificada apenas na resina de *P. sublanceolata*.

Ao menos parte dos lipídios que não apesentaram migração do ponto de origem na primeira análise de CCD realizada, pode ter como identidade terpenoides, como verificado pela segunda placa de CCD analisada para as resinas (Fig. 2B). Nesta placa cromatográfica foi utilizado um padrão de terpenoide como controle positivo para a detecção de terpenos pelas soluções utilizadas para revelação da placa. Não foi possível identificar quais tipos de terpeno estão presentes nessas espécies, no entanto, as duas espécies parecem ser muito diferentes quanto à composição de terpenos presente em suas resinas, como é possível verificar no padrão de migração e coloração revelada em cada mancha.

Aminoácidos - A composição de aminoácidos presentes no néctar e na resina das 10 espécies de *Passiflora* analisadas está resumida na tabela 3, podendo também ser visualizada na figura 3, que indica os tempos de retenção de cada aminoácido em uma amostra de néctar extrafloral de *Passiflora edulis* comparado com um dos padrões utilizados (ver também Anexos 2-6). As análises demonstraram uma grande variedade de aminoácidos presentes no néctar e na resina das diferentes espécies.

No geral as amostras de néctar não apresentam ornitina em sua composição, com exceção do néctar de *Passiflora ligularis*. Cisteina também está ausente em cinco

das oito espécies nas quais o néctar foi analisado. Metionina está ausente em duas espécies e histidina em outras duas, as demais ausências são pontuais de cada espécie. Já as amostras de resina não apresentaram serina e cisteína em *P. foetida*, e ácido glutâmico e histidina em *P. sublanceolata*, todos os demais aminoácidos estão presentes nas resinas.

Mesmo não tendo sido realizada uma análise quantitativa com os dados obtidos, uma comparação semiquantitativa foi realizada para representar a provável abundância de cada aminoácido nas amostras de secreção analisadas (Anexo 1).

O néctar, no geral, parece apresentar uma abundância de glutamina em sua composição (Anexo 1). Para as espécies do subgênero *Passiflora*, com exceção de *P. ligularis*, a glutamina indica ser o aminoácido mais representativo da composição do néctar. O mesmo acontecendo para *P. contracta*, representante do subgênero *Deidamiooides*, e para *P. suberosa*, do subgênero *Decaloba*. As outras duas espécies de *Decaloba* aparentemente apresentam a fenilalanina como aminoácido mais representativo, sendo a abundância de glutamina também alta. A ornitina está geralmente ausente no néctar de *Passiflora*, no entanto, em *P. ligularis* a ornitina parece ser o aminoácido mais representativo, ficando a glutamina em segundo lugar. As análises com as resinas também indicam a ornitina como aminoácido mais representativo, seguido pela lisina, sendo a glutamina menos representativa.

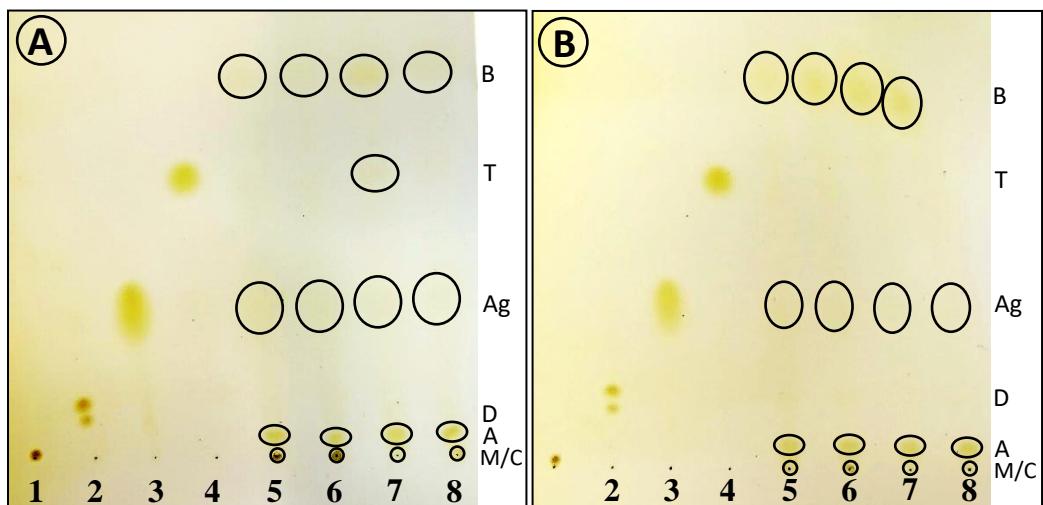


Figura 1. Placa cromatográfica em sílicagel com padrões de lipídios e amostras de néctar de *Passiflora* L. **A.** 1-Padrão de monoglicerídeo (1-Oleoyl-rac-glycerol). 2-Padrão de diglicerídeo (1,3 Diolein). 3 – Padrão de ácido graxo (Ácido oleico). 4 – Padrão de triglicerídeo (Glyceryl trioleate). 5 – *Passiflora contracta*. 6 – *Passiflora misera*. 7 – *Passiflora morifolia*. 8 – *Passiflora suberosa*. **B.** 1-Padrão de monoglicerídeo (1-Oleoyl-rac-glycerol). 2- Padrão de digicerídeo (1,3 Diolein). 3 – Padrão de ácido graxo (Ácido oleico). 4 – Padrão de trigicerídeo (Glyceryl trioleate). 5 – *Passiflora actinia*. 6 – *Passiflora edulis*. 7 – *Passiflora incarnata*. 8 – *Passiflora ligularis*. A = mancha A; Ag = ácidos graxos; B= mancha B; C = lipídios complexos; D = digicerídeos; M = monogicerídeos; T = trigicerídeos;

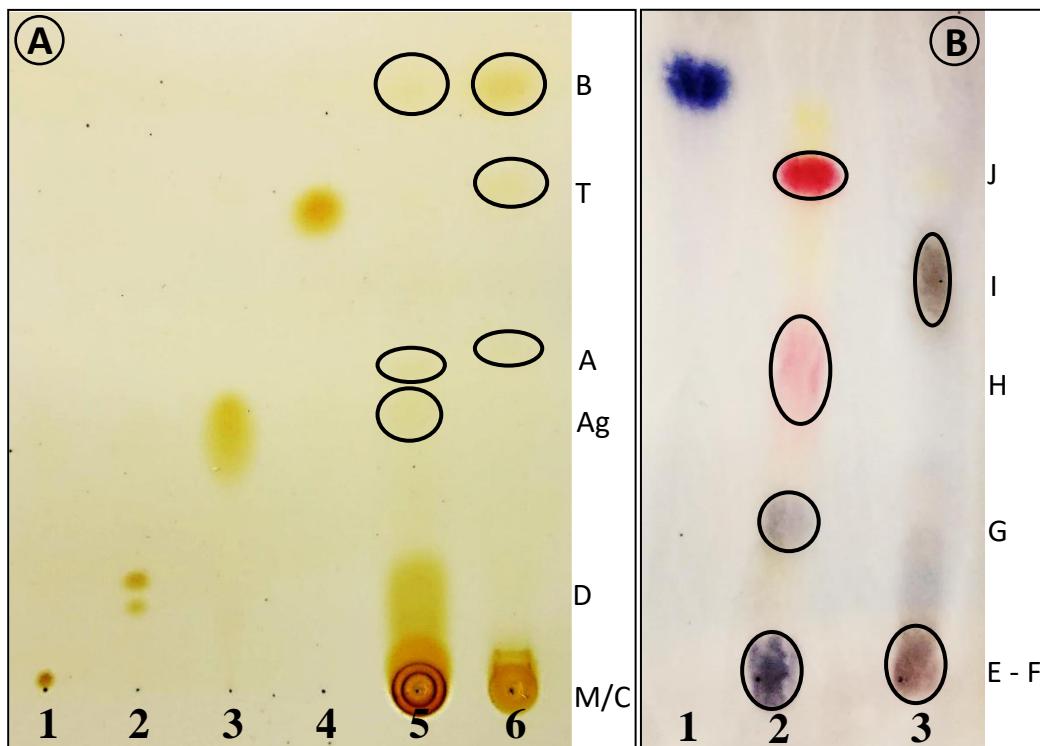


Figura 2. Placa cromatográfica em sílicagel. **A.** Padrões de lipídios e amostras de resina de *Passiflora* L. 1-Padrão de monoglicerídeo (1-Oleoyl-rac-glycerol). 2- Padrão de diglicerídeo (1,3 Diolein). 3 – Padrão de ácido graxo (Ácido oleico). 4 – Padrão de triglicerídeo (Glyceryl trioleate). 5 – *Passiflora foetida*. 6 – *Passiflora sublanceolata*. A = mancha A; Ag = ácidos graxos; B= mancha B; C = lipídios complexos; D = diglicerídeos; M = monoglicerídeos; T = triglicerídeos; **B.** Padrão de terpenoide e amostras de resina de *Passiflora* L. 1-Padrão de terpenoide (Lupeol). 2- *Passiflora foetida*. 3 – *Passiflora sublanceolata*. E-J = manchas representando diferentes terpernoides.

abela 3. Presença e ausência de aminoácidos em amostras de néctar e resina de espécies de *Passiflora* L. nos subgêneros *Decaloba*, *Deidamiooides* e *Passiflora*.

		Aminoácidos		
	Subgênero	Espécie	Presentes	Ausentes
Néctar	<i>Decaloba</i>	<i>P. misera</i>	Ala, Arg, Asn, Asp, Gaba/Tyr, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Val	Cys e Orn
		<i>P. morifolia</i>	Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gaba/Tyr, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Val	Orn
		<i>P. suberosa</i>	Ala, Arg, Asn, Asp, Gaba/Tyr, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Val	Cys e Orn
	<i>Deidamiooides</i>	<i>P. contracta</i>	Ala, Arg, Asn, Asp, Gaba/Tyr, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Val	Cys e Orn
	<i>Passiflora</i>	<i>P. actinia</i>	Arg, Asn, Asp, Gaba/Tyr, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Val	Ala, Cys, His e Orn
		<i>P. edulis</i>	Ala, Arg, Asn, Asp, Gaba/Tyr, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Val	Cys e Orn
		<i>P. incarnata</i>	Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gaba/Tyr, Gln, Glu, Ile, Leu, Lys, Phe, Ser, Thr, Trp, Val	Gly, His, Met e Orn
		<i>P. ligularis</i>	Ala, Arg, Asn, Asp, Gaba/Tyr, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Orn, Phe, Ser, Trp, Val	Cys, Met e Thr
		<i>P. foetida</i>	Ala, Arg, Asn, Asp, Gaba/Tyr, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Orn, Phe, Thr, Trp, Val	Cys e Ser
		<i>P. sublanceolata</i>	Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gaba/Tyr, Gln, Glu, Ile, Leu, Lys, Met, Orn, Phe, Ser, Thr, Trp, Val	Glu e His

* Ala = alanina, Arg = arginina, Asn = asparaginas, Asp = ácido aspártico, Cys = cisteina, Gaba = ácido y-aminobutírico, Gln = glutamina, Glu = ácido glutâmico, Gly = glicina, His = histidina, Ile = isoleucina, Leu = leucina, Lys = lisina, Met = metionina, Orn = ornitina, Phe = fenilalanina, Ser = serina, Thr = treonina, Trp = triptofano, Tyr = tirosina, Val = valina.

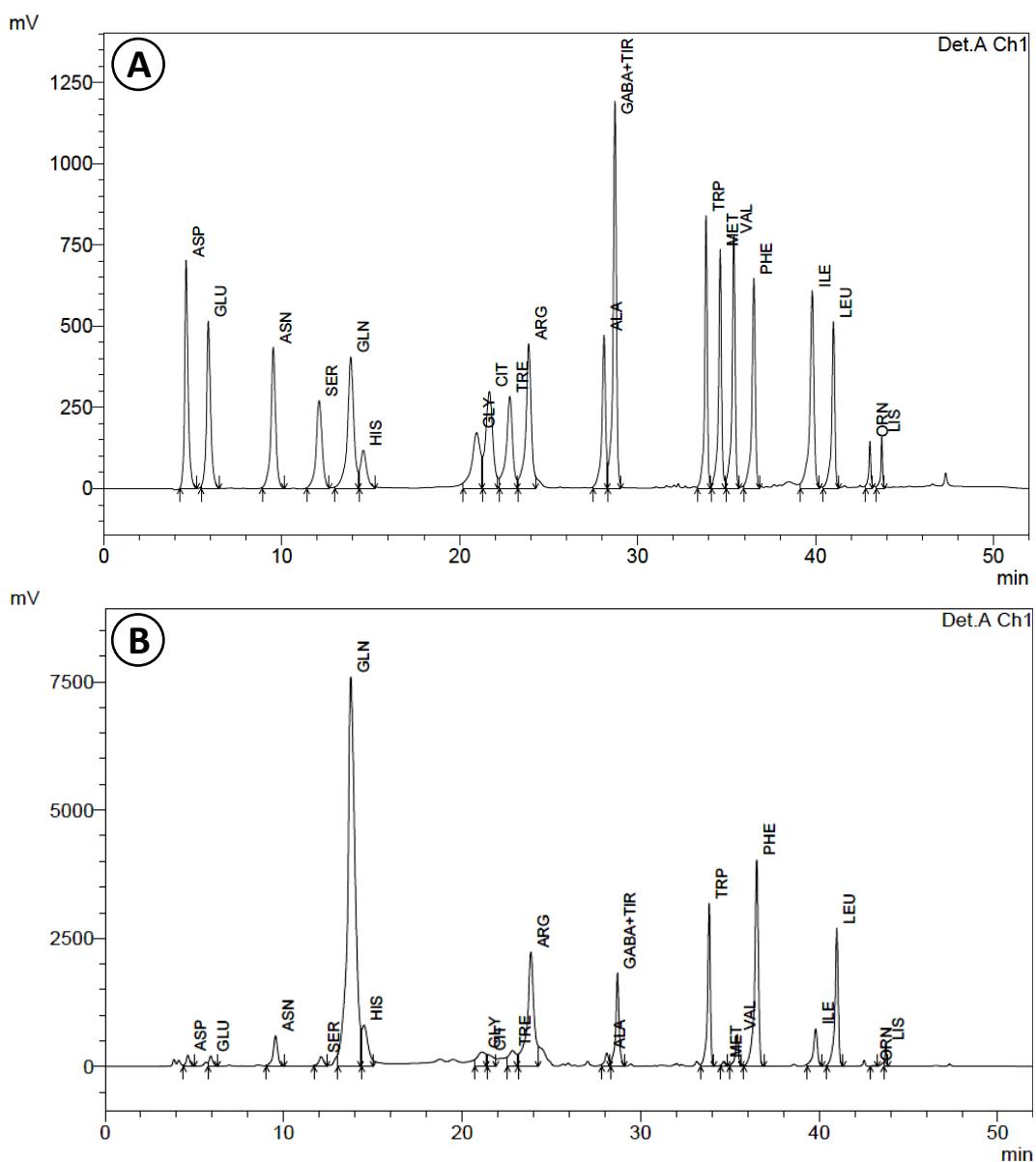


Figura 3. Gráfico com tempos de retenção de picos para aminoácidos. **A.** Padrão de aminoácidos com 200 nmol/ml. **B.** Amostra de néctar extrafloral de *Passiflora edulis*. Ala = alanina, Arg = arginina, Asn = asparaginas, Asp = ácido aspártico, Cys = cisteina, Gaba = ácido γ -aminobutírico, Gln = glutamina, Glu = ácido glutâmico, Gly = glicina, His = histidina, Ile = isoleucina, Leu = leucina, Lys = lisina, Met = metionina, Orn = ornitina, Phe = fenilalanina, Ser = serina, Thr = treonina, Trp = triptofano, Tyr = tirosina, Val = valina.

DISCUSSÃO

As análises realizadas demonstraram a presença de mais de uma classe lipídica no néctar e na resina extrafloral de *Passiflora*, tendo sido identificado ácidos graxos no néctar de todas as espécies e na resina de *Passiflora foetida*, e triglicerídeo no néctar de *P. morifolia* e na resina de *P. sublanceolata*. Tal resultado corrobora as análises ultraestruturais realizadas no capítulo 2, onde foi possível verificar a presença de lipídios nas células secretoras dos nectários extraflorais e das glândulas de resina, apesar do resultado negativo obtido nos nectários a partir dos testes histoquímicos.

A presença de lipídios no néctar tem sido relatada principalmente em nectários florais, como por exemplo nos trabalhos de Baker & Baker (1975), Baker (1977), Forcone *et al.* (1997), Bernadello *et al.* (1999) e Vesprini *et al.* (1999). No entanto, embora Baker & Baker (1975) e Bernadello e colaboradores (1999) tenham descrito a presença de lipídios em cerca de um terço das espécies estudadas por eles, o teste realizado foi baseado na reação ao tetróxido de ósmio, podendo não revelar todos os lipídios e, consequentemente, subestimando o número de néctar com lipídios em sua composição.

Já os relatos da presença de lipídios no néctar extrafloral são muito escassos. Stone e colaboradores (1985) encontraram dois ácidos graxos saturados e quatro ácidos graxos insaturados, além de seis fosfolipídios, no néctar extrafloral de algodão (*Gossypium hirsutum*, Malvaceae). Os autores relacionaram o impacto da presença de lipídios como fonte alimentar para insetos. Lipídios são os compostos mais energéticos disponíveis da natureza, podendo assim prover os polinizadores com uma fonte rica de energia (Nicolson & Thornburg 2007), e no caso do néctar extrafloral torna-se fonte de energia para insetos que se alimentam dessa secreção.

Assim como o encontrado para o néctar extrafloral de *Passiflora*, ácidos graxos livres parecem ser um dos componentes lipídicos mais comuns em néctar floral

Lipídios e aminoácidos em glândulas foliares de *Passiflora* L. Capítulo 3

(Nicolson & Thornburg 2007) e extrafloral (Stone *et al.* 1985). Já a presença de fosfolipídios relatada para o néctar extrafloral de algodão (Stone *et al.* 1985), pode ser uma indicação de outra classe lipídica presente no néctar extrafloral de *Passiflora*, podendo representar um dos componentes não identificados nessas espécies, especialmente os componentes que não migraram nas placas de CCD realizadas. Os demais componentes ainda não identificados para *Passiflora* podem representar componentes lipídicos não relatados até o momento para néctar extrafloral.

Já na resina, além da presença de ácidos graxos em *Passiflora foetida* e triglicerídios em *P. sublanceolata*, foi detectada uma classe lipídica comum às duas espécies e comum para o néctar extrafloral das outras espécies que não pode ser identificada, e uma classe lipídica diferente para cada uma das duas resinas que ainda não foram identificadas. Contudo a característica mais marcante nas resinas aqui analisadas é a presença de terpenoides, esses também muito diferentes entre as duas resinas.

Resinas são substâncias não voláteis produzidas pelas plantas, de onde elas exsudam naturalmente (resinas superficiais) ou são obtidas por incisão (resinas internas) (Dell & McComb 1978). Superficialmente podem ser caracterizadas como substâncias insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos (Dell & McComb 1978, Langenheim 2003). Quimicamente são misturas de substâncias lipossolúveis, sendo os componentes primários terpenoides voláteis e não voláteis e/ou substâncias fenólicas (Langenheim 2003). Nos casos em que as resinas são muito fluidas, tendo terpenos voláteis, referidos como óleos essenciais, predominando, essas podem ser chamadas de oleoresinas (Dell & McComb 1978, Langenheim 2003).

Em *Passiflora foetida* as glândulas que anteriormente eram consideradas nectários extraflorais, foram caracterizadas por Durkee e colaboradores (1984) como

glândulas de resina. Segundo os autores as glândulas de *P. foetida* apresentam exsudato insolúvel em água, pouco solúvel em acetona e completamente solúvel em etanol 95% e xileno. O exsudato também reage fortemente com corantes para lipídio e não apresentou açúcares nem aminoácidos, levando os autores a definirem como glândulas de resina.

No capítulo 2 foi descrito que o exsudato de *P. foetida* também reage com corantes para terpenoides, reforçando a ideia da caracterização dessas glândulas como de resina, visto que as resinas podem ser definidas como uma mistura lipossolúvel de compostos voláteis e não voláteis incluindo terpenoides e compostos fenólicos, que são secretados por estruturas especializadas (Dell & McComb 1978, Langenheim 2003). Nos capítulos 1 e 2 também consideramos outras espécies como possuindo glândulas de resina, baseado tanto na semelhança morfológica e anatômica como na caracterização histoquímica. Com as análises químicas já realizadas podemos reforçar a presença de glândulas de resina em outras espécies de *Passiflora*, visto que, ao menos *P. sublanceolata* também apresenta terpenoides na composição de seu exsudato.

Uma melhor e mais profunda caracterização do exsudato de *P. foetida* e *P. sublanceolata* quanto aos componentes lipídicos ainda precisa ser realizada, dado a nítida diferença encontrada nas classes lipídicas, evidenciado pelos métodos utilizados. Essas diferenças também reforçam a necessidade de um estudo mais abrangente envolvendo as espécies relacionadas à *P. foetida* e *P. sublanceolata*, pertencentes à seção *Dysosmia* DC., caracterizada pela presença de “gland-tipped hairs” ou “sticky glands” (Ulmer & MacDougal 2004, Vanderplank 2013).

Em relação aos aminoácidos, há uma grande variedade de aminoácidos presentes nas amostras, tendo sido encontrados no néctar e na resina os 21 aminoácidos utilizados como padrão. Segundo diversos autores há uma constância intraespecífica de aminoácidos no néctar, bem como de sua proporção relativa, incluindo os diferentes

nectários extraflorais de uma mesma espécie (Baker & Baker 1977, Baker *et al.* 1978, Smith *et al.* 1990, Gardener & Gillman 2001a), como para *Passiflora manicata* (Baker *et al.* 1978), ou de plantas coletadas em estufa e no campo (Hanny & Elmore 1974). Fato que nos permite fazer uma análise qualitativa utilizando amostras em “pool” por espécie, como utilizamos para as espécies de *Passiflora*. Contudo, a concentração dos aminoácidos no néctar de qualquer espécie pode ser muito variável (Nicolson & Thornburg 2007), podendo ser afetada por condições como fertilização (Gardener & Gillman 2001b), herbivoria ou evaporação (Smith *et al.* 1990). Fatores que colocam em dúvida a utilização de análises quantitativas para comparações entre muitas espécies, visto que dificilmente as condições de crescimento serão similares. Assim, a análise qualitativa, ou semiquantitativa de abundância relativa, parece ser mais viável quando se pretende realizar um estudo comparativo amplo ou mesmo na utilização de dados em um contexto evolutivo.

No geral, glutamina e fenilalanina parecem ser os aminoácidos mais abundantes no néctar extrafloral, e ornitina e lisina na resina das espécies estudadas de *Passiflora*. Vale destacar que a ornitina é um dos aminoácidos menos presente no néctar extrafloral. A presença de aminoácidos em resina é pouco relatada e, geralmente, relacionada à presença de insetos ou à quebra das células glandulares (Langenheim 2003). Durkee e colaboradores (1984) relataram não ter encontrado aminoácidos na resina de *Passiflora foetida*, contudo os testes realizados podem não ter detectado aminoácidos pela baixa sensibilidade, visto que a concentração de aminoácidos na resina dessa espécie parece ser muito baixa a partir dos resultados obtidos no presente trabalho.

Ao contrário dos lipídios, que são pouco estudados, a ocorrência de aminoácidos no néctar floral e extrafloral já foi relatada para muitas espécies (Baker & Baker 1973, 1975, 1977, Baker *et al.* 1978, Inouye & Inouye 1980, Lanza 1988, Smith *et al.* 1990,

Blüthgen *et al.* 2004, Carter *et al.* 2006). No geral o néctar floral é significativamente diferente do extrafloral, mesmo quando comparado na mesma espécie (Baker *et al.* 1978). O néctar extrafloral tem maior número de aminoácidos, sendo mais comum também a presença de aminoácidos não proteicos (Baker *et al.* 1978).

Baker e colaboradores (1978), em um extenso trabalho comparativo com néctar floral e extrafloral, analisaram duas espécies de *Passiflora*, *P. manicata* e *P. molissima*. Os autores encontraram como aminoácido mais abundante nas duas espécies a prolina, sendo a fenilalanina também representativa. No néctar floral de espécies do Mediterrâneo a fenilalanina é o aminoácido mais abundante, podendo representar mais de 47% dos aminoácidos detectados nas espécies de Lamiaceae (Petanidou *et al.* 2006). A glutamina, aparentemente o aminoácido mais abundante na maioria dos néctares extraflorais de *Passiflora* não aparece entre os mais representativos nas análises de Baker e colaboradores (1978). Já entre néctares florais de plantas crescendo na região sul do Reino Unido, a glutamina é o aminoácido mais representativo na maioria das 30 espécies analisadas por Gardener & Gillman (2001b). A prolina, apesar de não ter sido analisada no presente estudo, é um aminoácido relativamente comum em néctar floral e extrafloral, podendo em alguns casos ser o mais abundante (Baker *et al.* 1978, Gardener & Gillman 2001b, Blüthgen *et al.* 2004, Carter *et al.* 2006).

A presença de aminoácidos no néctar é um dos aspectos que modificam o sabor do mesmo, podendo contribuir para atração de insetos (Gardener & Gillman 2002, González-Teuber & Heil 2009). Prolina é o único aminoácido estimulante para as células de sal quimiorreceptoras da probóscide de alguns insetos alados (Hansen *et al.* 1998, Wacht *et al.* 2000), enquanto fenilalanina é capaz de inibir as células receptoras de água (Wacht *et al.* 2000). Assim, os aminoácidos no néctar têm o potencial para

modificar o comportamento dos insetos ao estimular seus quimiorreceptores (Nicolson & Thornburg 2007).

A composição de aminoácidos e sua concentração no néctar floral ajudam a determinar o “sabor” do néctar aos seus visitantes, em adição ao significado que possam ter para os visitantes (Baker *et al.* 1978). Aplicando as mesmas razões ao néctar extrafloral, espera-se que também haja um poder atrativo para animais que se alimentam do mesmo, e que, devido a esses néctares alimentarem uma gama diferente de animais, as contribuições químicas e as concentrações de néctar extrafloral sejam diferentes (Baker *et al.* 1978).

Em *Passiflora* foi relatado que a presença de aminoácidos no néctar extrafloral altera a resposta de visitantes, sendo que formigas preferem soluções contendo uma mistura complexa de aminoácidos ao invés de apenas açúcares (Lanza 1988). Tendo sido previamente relatado a redução de herbivoria por formigas se alimentando no néctar extrafloral em algumas espécies de *Passiflora* (McLain 1983, Smiley 1985). Dessa forma, assim como sugerido por Baker e colaboradores (1978), a presença e a composição de aminoácidos no néctar extrafloral também contribuem na atração de insetos com relação mutualística com as plantas. Sendo que a presença de animais que se alimentam de néctar pode ter agido como pressão seletiva nas plantas, favorecendo a incorporação de aminoácidos no néctar (Lanza 1988).

Na resina de *Passiflora*, no entanto, que parece ter uma mistura complexa de substâncias, incluindo aminoácidos, estes podem ou não ter uma função específica. A presença de aminoácidos em resina está geralmente associada à quebra de células glandulares ou aos insetos presos à resina (Langenheim 2003). Além da presença de lipídios, terpenoides e aminoácidos, verificados nas duas espécies de *Passiflora*, a presença de açúcares merece ser analisada, fato que poderia relacionar ainda mais esse

tipo glandular com os nectários extraflorais. Visto que Durkee e colaboradores (1984) sugerem que as glândulas de resina encontradas em *P. foetida* exibem características que podem representar uma transição de verdadeiros nectários extraflorais para glândulas secretoras de resina.

A função de glândulas de resina em espécies de *Passiflora* ainda não é totalmente compreendida, no entanto uma hipótese a ser considerada é antiherbivoria. Resinas que são secretadas nas superfícies foliares podem diminuir a herbivoria em algumas espécies (Langenheim 2003). Em *Passiflora foetida* já foi demonstrado que a presença de “ermanin”, um dos dez flavonoides identificados na resina dessa espécie, é capaz de diminuir a herbivoria por larvas de borboleta da espécie *Dione juno* (Echeverri *et al.* 1991). Na resina de *P. foetida* também já foram identificados a presença de diversas lactonas nomeadas genericamente de passifloricinas (Echeverri *et al.* 2001), sendo que atividade contra *Leishmania panamensis*, um dos causadores da leishmaniose, foi verificada para passifloricina A (Cardona *et al.* 2004).

Outra função relatada para resina na superfície dos órgãos é proteção em ambientes áridos, seja reduzindo a perda de água pela característica hidrofóbica da resina ou reduzindo a temperatura pela reflexão da radiação solar (Dell 1977, Dell & McComb 1978, Langenheim 2003). Algumas das espécies de *Passiflora* da seção *Dysosmia* crescem em ambientes áridos (Vanderplank 2013), podendo, nestes casos, a resina também atuar na proteção contra a dessecação, característica que precisa ser estudada nas espécies de *Passiflora*.

Os resultados obtidos com as análises de resina de *Passiflora*, com variações nítidas na composição química das duas espécies, indicam a necessidade de se conhecer mais sobre a composição química de outras espécies do gênero que podem apresentar esse tipo de secreção. Dessa forma um estudo com espécies pertencentes à seção

Dysosmia, onde algumas espécies são descritas por Vanderplank (2013) como possuindo nectários extraflorais, pode revelar diversidade ainda maior na secreção glandular dessas espécies. Possibilitando, futuramente, uma abordagem filogenética testando a hipótese de transição entre nectários e glândulas de resina proposta Durkee e colaboradores (1984).

REFERÊNCIAS

- BAKER, H. G. 1977. Non-sugar chemical constituents of nectar. **Apidologie** 8 (4): 349-356.
- BAKER, H. G.; BAKER, I. 1973. Amino-acids in nectar and their evolutionary significance. **Nature** 241: 543-545.
- BAKER, H. G.; BAKER, I. 1975. Studies of nectar-constituiton and pollinator-plant coevolution. In: Gilbert, L. E.; Raven, P. H. (eds). **Coevolution of animal and plants**. Austin, Texas: University of Texas Press.
- BAKER, H. G.; BAKER, I. 1977. Intraspecific constancy of floral nectar amino acid complements. **Botanical Gazette** 138: 183-1991.
- BAKER, H. G.; OPLER, P. A.; BAKER, I. 1978. A comparison of the amino acid complement of floral and extrafloral nectars. **Botanical Gazette** 139 (3): 322-332.
- BERNADELLO, L.; GALETTO, L.; FORCONE, A. 1999. Floral nectar chemical composition of some species from Patagonia II. **Biochemical Systematics and Ecology**, 27: 779-790.
- BLÜTHGEN, N.; GOTTSBERGER, G.; FIEDLER, K. 2004. Sugar and amino acid composition of ant-attended nectar and honeydew sources from an Australian rainforest. **Austral Ecology** 29: 418-429.

- CARDONA, W. G.; QUIÑONES W. F.; ECHEVERRI, F. L. 2004. Leishmanicidal activity of passifloricin A and derivatives. **Molecules** 9: 666-672.
- 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.
- CARTER, C.; SHAFIR, S.; YEKONATAN, L. PALMER, R. G.; THORNBURG, R. 2006. A novel role for proline in plant floral nectars. **Naturwissenschaften** 93: 72–79.
- CERVI, A. C. 2006. **O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950.** Madri.
- DELL, B. 1977. Distribution and function of resin and glandular hairs in Western Australian plants. **Journal of the Royal Society of Western Australia** 59 (4): 119-123.
- DELL, B.; MCCOMB, A. J. 1978. Plant resins: their formation, secretion and possible functions. **Advances in Botanical Research** 6: 277–316.
- DURKEE, L. T. 1982. The floral and extrafloral nectarines of *Passiflora*. II. The extrafloral nectar. **American Journal of Botany** 69(9): 1420-1428.
- 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.
- ECHEVERRI, F.; CARDONA, W.; TORRES, F.; PELAEZ, C.; QUIÑONES, W.; RENTERIA, E. 1991. Ermanin: na insect deterrent flavonoid from *Passiflora foetida* resin. **Phytochemistry** 30 (1): 153-155.

Lipídios e aminoácidos em glândulas foliares de *Passiflora* L. Capítulo 3

- ECHEVERRI, F.; ARANGO, V.; QUIÑONES, W.; TORRES, F.; ESCOBAR, G.; ROSERO, Y.; ARCHBOLD, R. 2001. Passifloricins, polyketides α-pyrones from *Passiflora foetida* resin. *Phytochemistry* 56: 881-885.
- 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.
- FAHN, A. 1979. **Secretory tissues in plants**. Academic Press Inc, London.
- FEUILLET, C. P.; MACDOUGAL, J. M. 2003. A new infrageneric classification of *Passiflora*. *Passiflora* 13: 34-38.
- FORCONE, A. GALETTO, L.; BERNADELLO, L. 1997. Floral nectar chemical composition of some species from Patagonia. **Biochemical Systematics and Ecology** 25: 395-402.
- GARDENER, M. C.; GILLMAN, M. P.; 2001a. Analyzing variability in nectar amino acids: composition is less variable than concentration. **Journal of Chemical Ecology** 27: 2545-2558.
- GARDENER, M. C.; GILLMAN, M. P.; 2001b. The effects of soil fertilizer on amino acids in the floral nectar of corncockle, *Agrostemma githago* (Caryophyllaceae). **Oikos** 92: 101-106.
- GARDENER, M. C.; GILLMAN, M. P.; 2002. The taste of nectar – a neglected area of pollination ecology. **Oikos** 98: 552-557.
- GONZÁLEZ-TEUBER, M.; HEIL M. 2009. The Role of Extrafloral Nectar Amino Acids for the Preferences of Facultative and Obligate Ant Mutualists. **Journal of Chemical Ecology** 35:459–468.
- HANNY, B.; ELMORE, C. D. 1974. Amino acid composition of cotton nectar. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 22 :99-104.

- HANSEN, K.; WACHT, S.; SEEBAUER, H.; SCHNUCH, M. 1998. New aspects of chemoreception in flies. **Annals New York Academy of Sciences** 855:143–147.
- HARBORNE, J. B. 1984. **Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis.** Springer Netherlands.
- INOUE, D. W.; INOUE, R. 1980. The amino acids of extrafloral nectar from *Helianthella quinquenervis* (Asteraceae). **American Journal of Botany** 67 (9): 1394-1396.
- KILLIP, E. P. 1938. The American species of Passifloraceae. **Publications of the Field Museum of Natural History** 19: 1-613.
- LANGENHEIM, J. H. 2003. **Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany.** Timber Press, Cambridge.
- LANZA, J. 1988. Ant Preferences for Passiflora Nectar Mimics That Contain Amino Acids. **Biotropica** 20 (4): 341-344.
- MCLAIN, D. K. 1983. Ants, Extrafloral Nectaries and Herbivory on the Passion Vine, *Passiflora incarnata*. **The American Midland Naturalist** 110: 433-439.
- NICOLSON, S. W.; THORNBURG, R. W. 2007. Nectar chemistry. In: NICOLSON, S. W.; NEPI, M. & PACINI, E. **Nectaries and nectar.** Spring-Verlag, The Netherlands.
- OLSSON, N. U. 1991. **Plant Lipids. Analysis and Characterization.** Stockholms Universitet, Institutionen för Analytisk Kemi, Stockholm.
- PACINI, E.; NICOLSON, S. W. 2007. Introduction. In: NICOLSON, S. W.; NEPI, M. & PACINI, E. **Nectaries and nectar.** Spring-Verlag, The Netherlands.

Lipídios e aminoácidos em glândulas foliares de *Passiflora* L. Capítulo 3

- PETANIDOU, T.; VAN LAERE, A. J.; ELLIS, W. N.; SMETS, E. 2006. What shapes amino acid and sugar composition in Mediterranean floral nectar? **Oikos** 115: 155-169.
- RADHAMANI, T. R.; SUDARSHANA, L.; KRISHNAN, R. 1995. Defense and carnivory: Dual role of bracts in *Passiflora foetida*. **Journal of Biosciences** 20: 657-664.
- ROCHA, D. I.; 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: 619-626.
- ROTH, I. 1969. Desarrollo de los nectarios extraflorares en *Passiflora foetida* L. **Acta Biologica Venezolica** 6: 44-49.
- SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; BALBUENA, T. S.; VIANA, A. M.; ESTELITA, M. E.; HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. 2006. IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. **Plant Growth Regulation** 49: 237-247.
- SMILEY, J. T. 1985. *Heliconius* caterpillar mortality during establishment on plants with and without attending ants. **Ecology** 66 (3): 845-849.
- SMITH, L. L.; LANZA, J.; SMITH, G. C. 1990. Amino acid concentrations in extrafloral nectar of *Impatiens sultan* increase after simulated herbivory. **Ecology** 71(1): 107-115.
- 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.

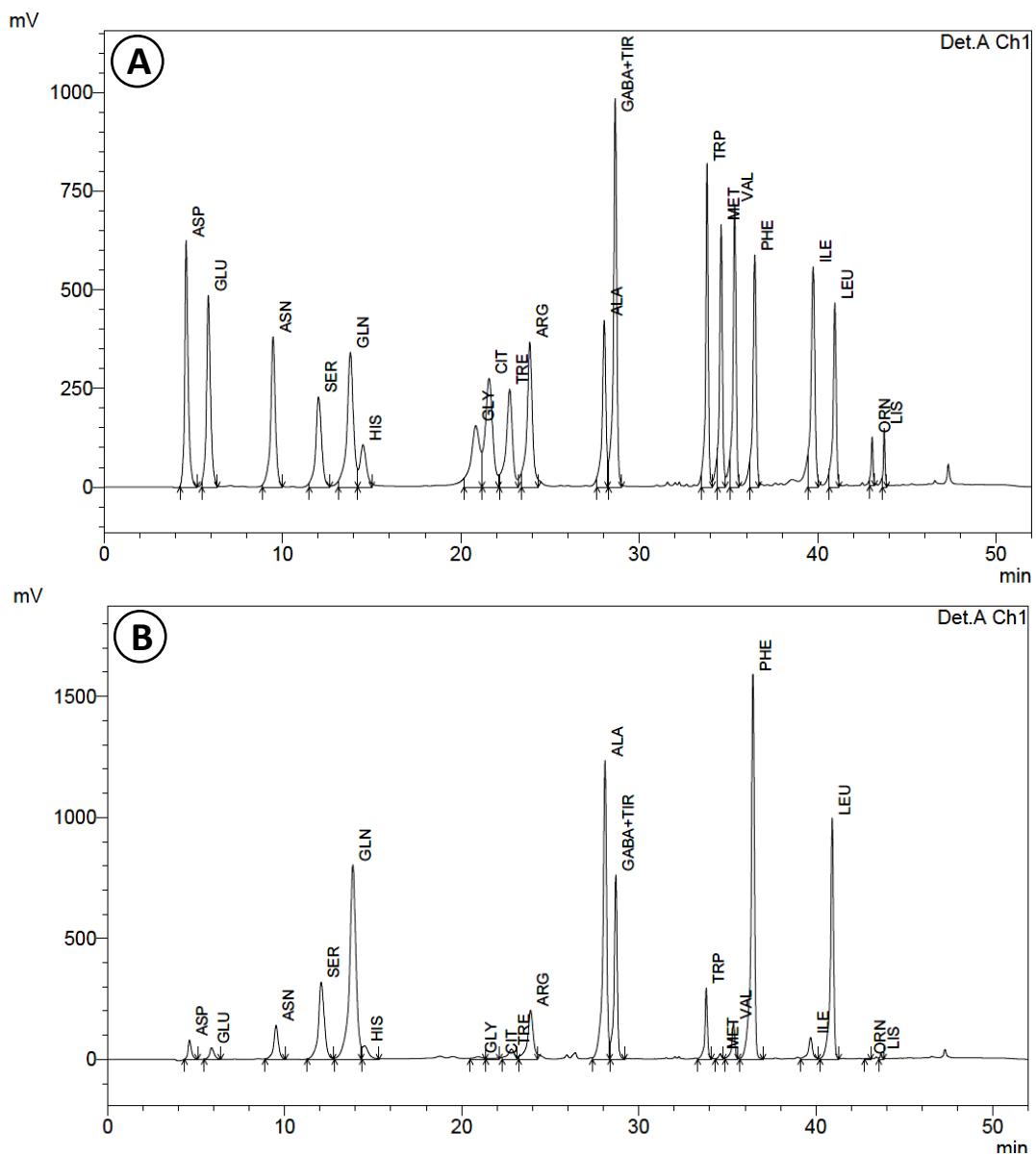
- STONE, T. B.; THOMPSON, A C.; PITRE, H. N. 1985. Analysis of lipids in cotton extrafloral nectar. **Journal of Entomological Science** 20:422-428.
- ULMER, T.; MACDOUGAL, M. J. 2004. **Passiflora: Passionflowers of the world.** Timber Press, Inc., Portland.
- VANDERPLANK, J. 2013. A revision of *Passiflora* section *Dysosmia* Passifloraceae. **Curtis's Botanical Magazine** 30 (4): 318-387.
- VESPRINI, J. L.; NEPI, M.; PACINI, E. 1999. Nectary structure, néctar secretion patterns and néctar composition em two *Helleborus* species. **Plant Biology** 1: 560-568.
- WACHT, S.; LUNAU, K.; HANSEN, K. 2000. Chemosensory control of pollen ingestion in the hoverfly *Eristalis tenax* by labellar taste hairs. **Journal of Comparative Physiology A** 186:193–203.
- WU, G.; MEININGER, C. J. 2008. Analysis of Citrulline, Arginine, and Methylarginines Using High-Performance Liquid Chromatography. **Methods in Enzymology** 440: 177-189.

ANEXOS

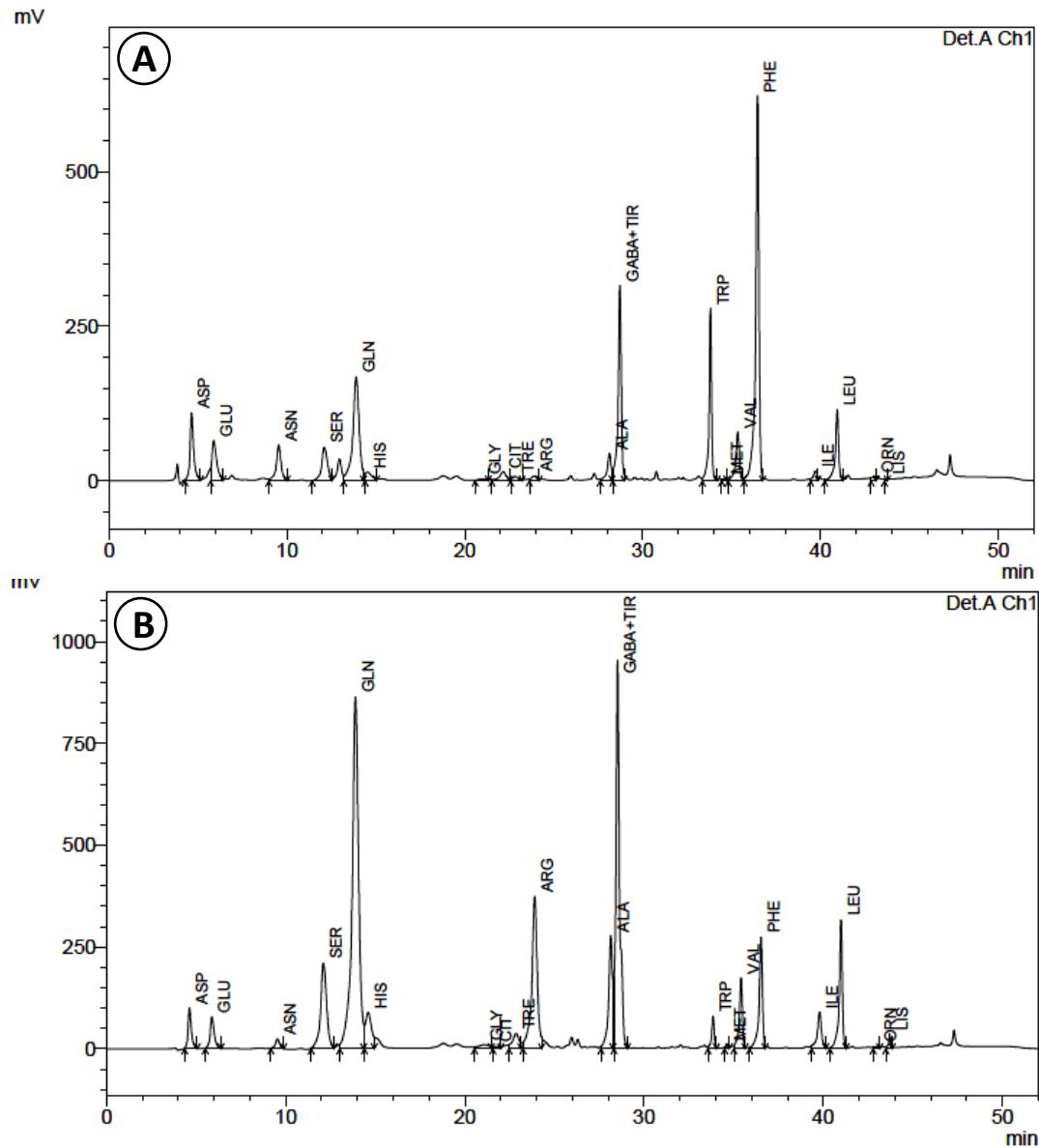
Anexo 1. Presença e abundância de aminoácidos, em ordem decrescente, em amostras de néctar e resina de espécies de *Passiflora* L. nos subgêneros *Decaloba*, *Deidamiooides* e *Passiflora*.

		Aminoácidos		
	Subgênero	Espécie	Presentes	Ausentes
Néctar	<i>Decaloba</i>	<i>P. misera</i>	Phe>Gln>Leu>Ala>Gaba/Tyr>Ser>Arg>His>Trp>Asn>Lys>Val>Ile>Ter>Glu>Asp>Met>Gly	Cys e Orn
		<i>P. morifolia</i>	Phe>Gln>Trp>Leu>Gaba/Tyr>Ser>Asp>His>Glu>Asn>Val>Ala>Cys>Lys>Arg>Ile>Ter>Gly>Met	Orn
		<i>P. suberosa</i>	Gln>Arg>His>Gaba/Tyr>Ser>Leu>Phe>Ala>Lys>Val>Glu>Ile>Asp>Trp>Ter>Asn>Gly>Met	Cys e Orn
	<i>Deidamiooides</i>	<i>P. contracta</i>	Gln>Ala>Phe>Arg>Leu>Ser>His>Lys>Trp>Gaba/Tyr>Ile>Met>Val>Ter>Glu>Asn>Gly>Met	Cys e Orn
	<i>Passiflora</i>	<i>P. actinia</i>	Gln>Phe>Gaba/Tyr>Arg>Ser>Trp>Asp>Tre>Glu>Gly>Val>Asn>Ile>Lys>Leu>Met	Ala, Cys, His e Orn
		<i>P. edulis</i>	Gln>Arg>His>Phe>Leu>Trp>Lys>Asn>Gaba/Tyr>Ile>Tre>Val>Gly>Ser>Glu>Ala>Asp>Met	Cys e Orn
		<i>P. incarnata</i>	Gln>Arg>Phe>Gaba/Tyr>Asp>Cys>Lys>Trp>Gl>Leu>Ser>Asn>Val>Ile>Ter>Ala	Gly, His, Met e Orn
		<i>P. ligularis</i>	Orn>Gn>Val>glu>Lys>His>Arg>Phe>Ala>Gaba/Tyr>Asp>Leu>Ser>Ile>Gly>Trp>Asn	Cys, Met e Tre
		<i>P. foetida</i>	Orn>Lys>Ala>Val>His>Gln>Arg>Leu>Phe>Asp>Glu>Gaba/Tyr>Ile>Gly>Trp>Tre>Met>Asn	Cys e Ser
		<i>P. sublanceolata</i>	Orn>Lys>Val>Ala>Phe>Leu>Gln>Ile>Arg>Ser>Met>Asp>Gly>Gaba/Tyr>Trp>Tre>Cys>Asn	Glu e His

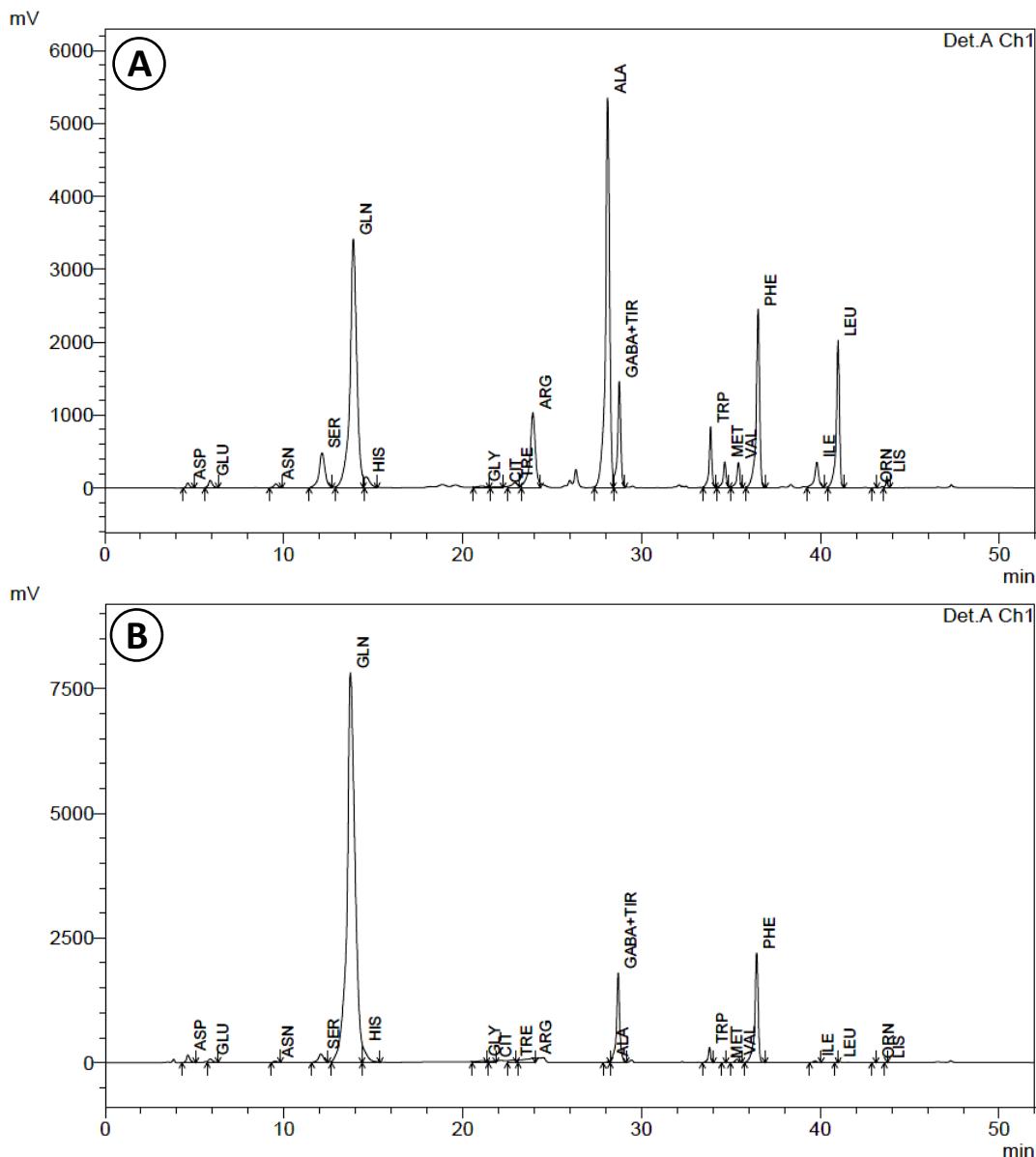
* Ala = alanina, Arg = arginina, Asn = asparaginas, Asp = ácido aspártico, Cys = cisteína, Gaba = ácido y-aminobutírico, Gln = glutamina, Glu = ácido glutâmico, Gly = glicina, His = histidina, Ile = isoleucina, Leu = leucina, Lys = lisina, Met = metionina, Orn = ornitina, Phe = fenilalanina, Ser = serina, Thr = treonina, Trp = triptofano, Tyr = tirosina, Val = valina.



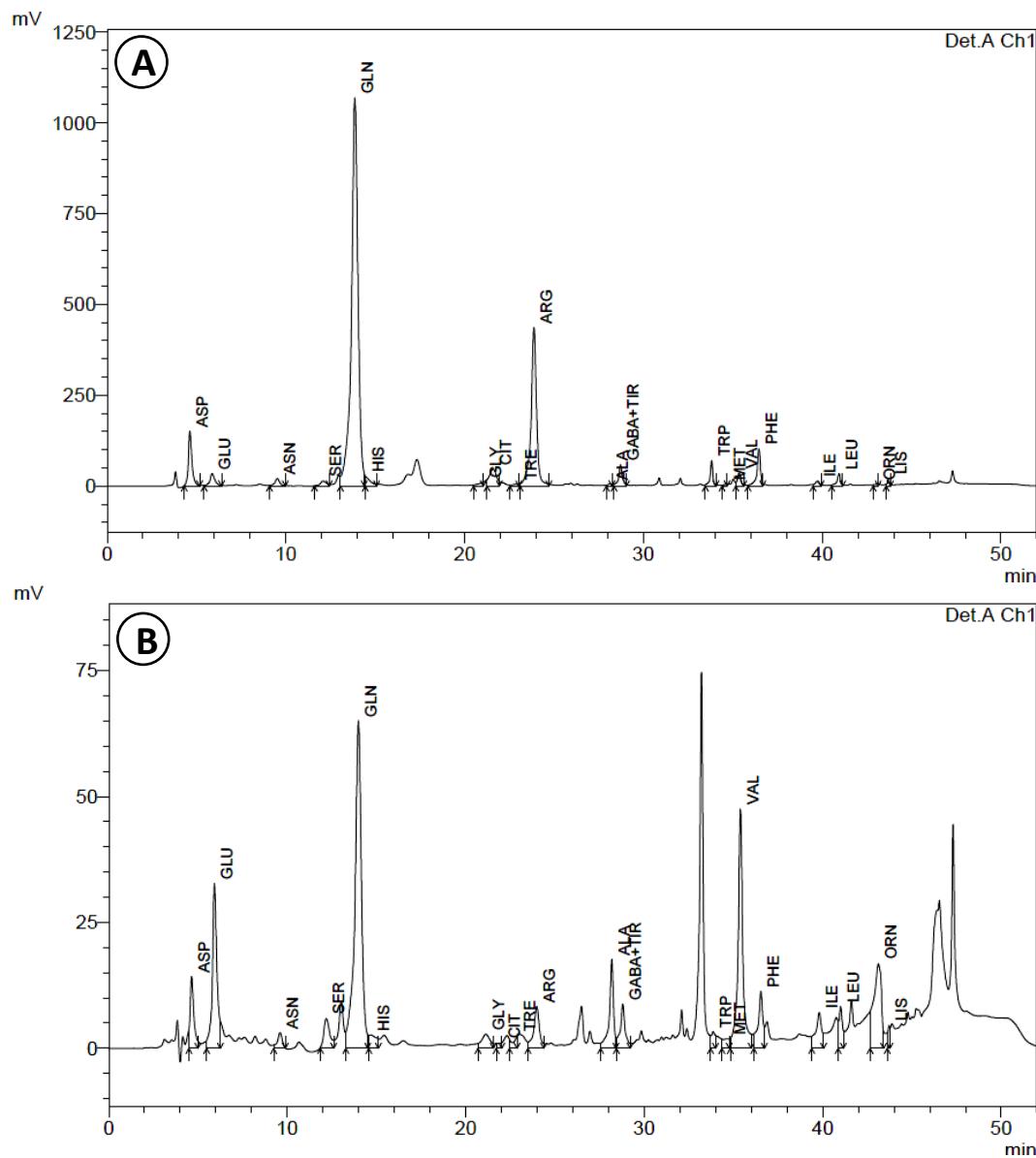
Anexo 2. Gráfico com tempos de retenção de picos aminoácidos. **A.** Padrão de aminoácidos com 100nmol/ml. **B.** Amostra de néctar extrafloral de *Passiflora misera*, subgênero *Decaloba*. Ala = alanina, Arg = arginina, Asn = asparaginas, Asp = ácido aspártico, Cys = cisteina, Gaba = ácido γ -aminobutírico, Gln = glutamina, Glu = ácido glutâmico, Gly = glicina, His = histidina, Ile = isoleucina, Leu = leucina, Lys = lisina, Met = metionina, Orn = ornitina, Phe = fenilalanina, Ser = serina, Thr = treonina, Trp = triptofano, Tyr = tirosina, Val = valina.



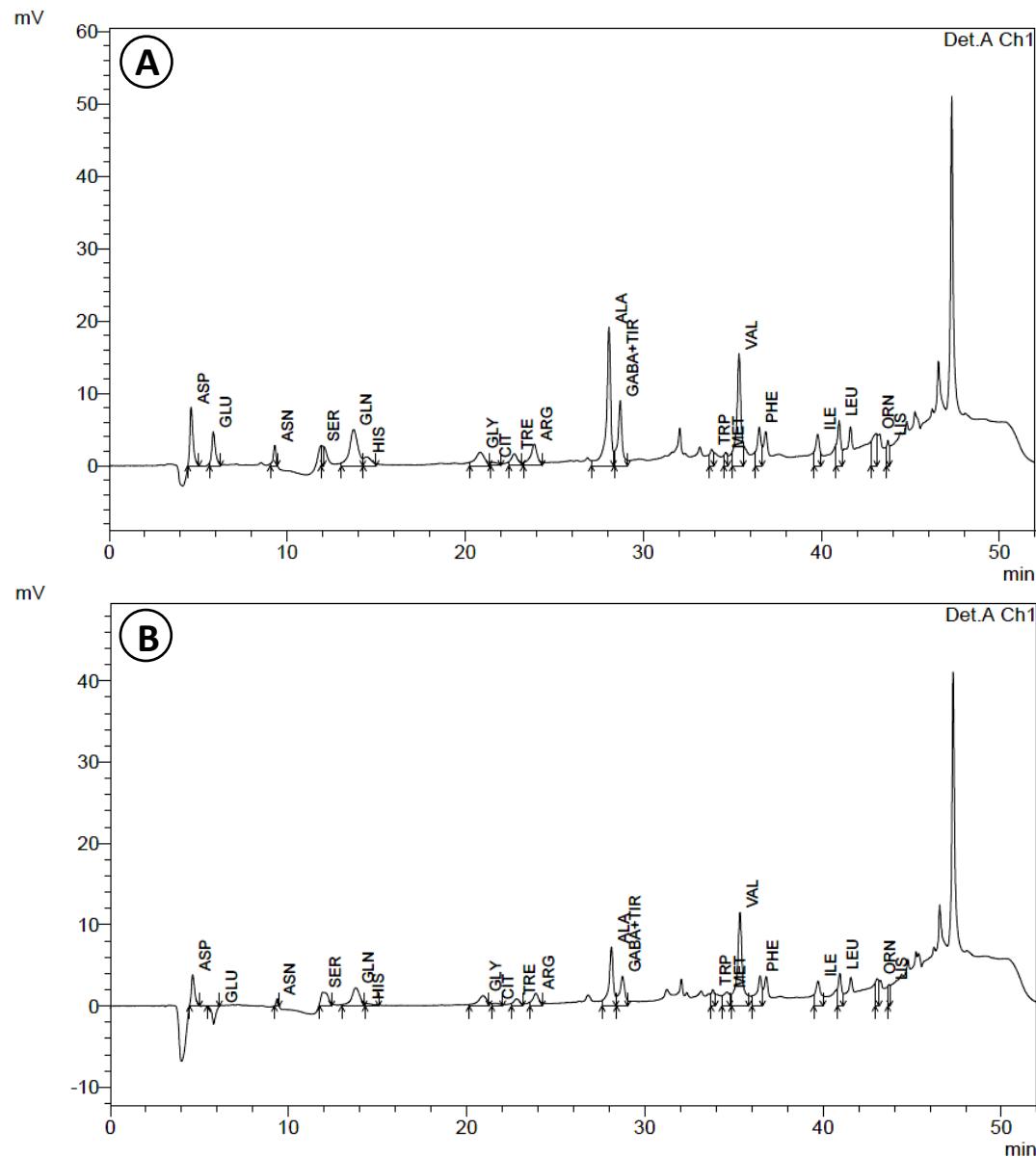
Anexo 3. Gráfico com tempos de retenção de picos para amostras de néctar extrafloral de *Passiflora* L., subgênero *Decaloba*. **A.** *Passiflora morifolia*. **B.** *Passiflora suberosa*. Ala = alanina, Arg = arginina, Asn = asparaginas, Asp = ácido aspártico, Cys = cisteina, Gaba = ácido y-aminobutírico, Gln = glutamina, Glu = ácido glutâmico, Gly = glicina, His = histidina, Ile = isoleucina, Leu = leucina, Lys = lisina, Met = metionina, Orn = ornitina, Phe = fenilalanina, Ser = serina, Thr = treonina, Trp = triptofano, Tyr = tirosina, Val = valina.



Anexo 4. Gráfico com tempos de retenção de picos para amostras de néctar extrafloral de *Passiflora* L. **A.** *Passiflora contracta*, subgênero *Deidamiooides*. **B.** *Passiflora actinia*, subgênero *Passiflora*. Ala = alanina, Arg = arginina, Asn = asparaginas, Asp = ácido aspártico, Cys = cisteina, Gaba = ácido γ -aminobutírico, Gln = glutamina, Glu = ácido glutâmico, Gly = glicina, His = histidina, Ile = isoleucina, Leu = leucina, Lys = lisina, Met = metionina, Orn = ornitina, Phe = fenilalanina, Ser = serina, Thr = treonina, Trp = triptofano, Tyr = tirosina, Val = valina.



Anexo 5. Gráfico com tempos de retenção de picos para amostras de néctar extrafloral de *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **A.** *Passiflora incarnata*. **B.** *Passiflora ligularis*. Ala = alanina, Arg = arginina, Asn = asparaginas, Asp = ácido aspártico, Cys = cisteina, Gaba = ácido γ -aminobutírico, Gln = glutamina, Glu = ácido glutâmico, Gly = glicina, His = histidina, Ile = isoleucina, Leu = leucina, Lys = lisina, Met = metionina, Orn = ornitina, Phe = fenilalanina, Ser = serina, Thr = treonina, Trp = triptofano, Tyr = tirosina, Val = valina.



Anexo 6. Gráfico com tempos de retenção de picos para amostras de resina de *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **A.** *Passiflora foetida*. **B.** *Passiflora sublanceolata*. Ala = alanina, Arg = arginina, Asn = asparaginas, Asp = ácido aspártico, Cys = cisteina, Gaba = ácido γ -aminobutírico, Gln = glutamina, Glu = ácido glutâmico, Gly = glicina, His = histidina, Ile = isoleucina, Leu = leucina, Lys = lisina, Met = metionina, Orn = ornitina, Phe = fenilalanina, Ser = serina, Thr = treonina, Trp = triptofano, Tyr = tirosina, Val = valina.

Conclusões Gerais

Neste trabalho, a presença de glândulas foliares em espécies do gênero *Passiflora* L. foi analisada utilizando como principais ferramentas a morfologia (incluindo anatomia e ultraestrutura) e a química (incluindo histoquímica) dos exsudados gerados por essas estruturas. A integração das técnicas utilizadas nos permitiu responder aos questionamentos iniciais sobre a diversidade e definições de tipos glandulares, bem como gerar novas hipóteses e perguntas sobre a evolução dessas estruturas no grupo.

As glândulas extraflorais presentes nas folhas de espécies do gênero *Passiflora* L. demonstraram uma grande diversidade morfológica, com diferentes formas relatadas nos nectários extraflorais e nas glândulas de resina. Diante disto, e da falta de uma padronização terminológica na definição de cada forma, sugerimos seguir Radford e colaboradores (1974) facilitando os estudos comparativos dessas estruturas.

A presença de glândulas de resina em outras espécies de *Passiflora*, além de *Passiflora foetida*, revelou haver uma distribuição mais ampla desse tipo glandular, visto que nesse trabalho verificamos a ocorrência em quatro espécies pertencentes à seção *Dysosmia*.

A comparação dos dois tipos glandulares a partir das diferentes abordagens realizadas neste trabalho revela diferenças marcantes entre eles. Os nectários extraflorais podem ser diferenciados das glândulas de resina apenas com ferramentas morfológicas e anatômicas. As glândulas de resina são pequenas e alongadas com uma haste cilíndrica. Anatomicamente, tais glândulas apresentam apenas uma camada de epiderme secretora alongada, localizada na região mais apical, tecido clorenquimático e vascularização com xilema e floema chegando até a região secretora. Já os nectários extraflorais foram subdivididos em dois grupos: os nectários elevados, que apresentam maior diversidade de formas, e os planos, na forma de

ocelos. Anatomicamente, os nectários extraflorais são semelhantes, com epiderme secretora multiestratificada, seguida por duas (ou mais) camadas de células do parênquima nectarífero, essas mais achatadas e com conteúdo denso, internamente o parênquima subnectárfico apresenta feixes vasculares com terminação em floema.

Ultraestruturalmente as diferenças entre os dois tipos glandulares também são marcantes. Nas glândulas de resina o retículo endoplasmático liso é muito conspícuo e percorre toda a célula, que também apresentam gotículas lipídicas dispersas pelo citoplasma e no interior no retículo. Já os nectários extraflorais apresentam retículo liso e rugoso, mais concentrado na periferia das células epidérmicas secretoras.

Entre os nectários extraflorais identificamos espécies com diferentes modos transporte intercelular e liberação do exsudato. Sendo que alguns nectários apresentam modo de liberação granulócrina, além da écrina, que não tinha sido descrito para espécies do gênero. Além disso os plastídios dos nectários extraflorais apresentam inclusões lipídicas em todas as espécies analisadas.

A presença de lipídios no néctar, apesar de não ter sido identificada pelos testes histoquímicos, pode ser confirmada com as análises químicas. O néctar de *Passiflora* apresenta ácidos graxos livres, além de ao menos três outras classes lipídicas ainda não identificadas. Contudo os carboidratos são, como vistos pelas análises com glicofita e histoquímicas, as substâncias predominantes. Compondo o néctar também foi identificado uma grande variedade de aminoácidos, esses também presentes nas resinas.

Além de aminoácidos, a resina apresenta grande quantidade de substâncias lipídicas, como indicam os testes histoquímicos e as análises químicas. A variedade de substâncias lipídicas encontrada na resina é grande e diferente entre as espécies analisadas. Enquanto *P. foetida* apresenta ácidos graxos livres, *P. sublanceolata* apresenta triglicerídeos, além de

outras substâncias ainda não identificadas. Os terpenoides presentes, apesar de ainda não definidos, também aparentam ser diferentes entre as duas espécies.

Assim, as análises químicas revelaram diferenças significativas entre os dois tipos glandulares, reforçando a separação entre glândulas de resina e nectários. E também maior variação interespecífica entre as glândulas de resina do que entre os nectários extraflorais.

Algumas substâncias, no entanto, são compartilhadas entre o exsudato dos dois tipos glandulares. Reforçando a possibilidade de ter ocorrido uma mudança gradual de nectários extraflorais para glândulas de resina, como proposto por Dukee e colaboradores (1984). Hipótese que para ser testada precisa de estudos comparativos entre mais espécies que possam apresentar glândulas de resina, aparentemente presentes na secção *Dysosmia*. Estudos esse que, juntamente com os aqui realizados, podem possibilitar uma abordagem filogenética para o melhor entendimento da evolução das estruturas secretoras foliares.