

Morfo-anatomía de nectarios extraflorales de *Passiflora cincinnata* Mast. y *Passiflora tricuspis* Mast. (Passifloraceae)

Morpho-anatomy of extrafloral nectaries of *Passiflora cincinnata* Mast. and *Passiflora tricuspis* Mast. (Passifloraceae)

Vania M. Vargas-Silva¹, Mercy Yaneth López-Meruvia² y Ana Waleska Quevedo²

¹Estudiante de Posgrado, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, Santa Cruz, Bolivia. E-mail: vania_vargas_silva@hotmail.com

²Laboratorio de Botánica, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, Santa Cruz, Bolivia.

Resumen

Los nectarios extraflorales (NEF) son una característica típica del género *Passiflora*; actúan como mecanismo de defensa para la planta, brindando alimento a los organismos ladrones de néctar floral como las hormigas, y a su vez ayudan a disuadir a los herbívoros e insectos que desean ovopositar en estas plantas. Además, la estructura y distribución de los mismos son importantes en la delimitación de las especies del género. Se estudió la morfología y anatomía de los nectarios extraflorales de *Passiflora cincinnata* Mast. y *P. tricuspis* Mast., con la finalidad de aportar información de valor diagnóstico que ayude a la identificación de estas especies y apoye a la taxonomía del género. Las muestras foliares se procesaron siguiendo técnicas convencionales tanto para microscopía óptica como microscopía electrónica de barrido. Los resultados muestran que morfológicamente los NEFs de *P. cincinnata* son elevados y ubicados en par en la base del pecíolo; mientras que en *P. tricuspis* son hundidos, situados próximos al margen de la lámina foliar y en par en la base de ésta. Anatómicamente están conformados por una epidermis modificada en empalizada, parénquima glandular y subglandular, ricos en drusas y haces vasculares asociados. Las características morfo-anatómicas de los NEFs estudiados son de valor diagnóstico en la delimitación taxonómica de las dos especies estudiadas.

Palabras clave: anatomía, morfología, nectarios extraflorales, *Passiflora*.

Abstract

Extrafloral nectaries (EFNs) are a typical characteristic of the genus *Passiflora*; they act as a defense mechanism for the plant, providing food for nectar robbing organisms such as ants and, in turn, help deter herbivores and insects that wish to oviposit in these plants. In addition, the structure and distribution of these EFNs are important in the delimitation of the species of the genus. We studied the morphology and anatomy of the extrafloral nectaries of *Passiflora cincinnata* Mast. and *P. tricuspis* Mast., to provide information of diagnostic value to help in the identification of these species and support the taxonomy of the genus. Leaves

were processed following conventional techniques for both light and scanning electron microscopy. The results show that EFNs of *P. cincinnata* are morphologically elevated and located at the base of the petiole; while in *P. tricuspis*, they are hollow and located near the margin of the leaf and in a pair at the base of the leaf. Anatomically they are made up of a palisade-modified epidermis, glandular and subglandular parenchyma, rich in drusen and associated vascular bundles. The morpho-anatomic characteristics of the EFNs studied are of diagnostic value in the taxonomic delimitation of the two species studied.

Key words: anatomy, morphology, extrafloral nectaries, *Passiflora*

INTRODUCCIÓN

Los nectarios son estructuras secretoras de néctar que presentan diversa morfología y anatomía; su ubicación en la planta determina su clasificación en florales (NF) o extraflorales (NEF), y según su relación con la polinización en nupciales y extranupciales (Elias & Gelband 1976). Específicamente, los nectarios extraflorales actúan como mecanismo de defensa para la planta, brindando alimento a los organismos ladrones de néctar floral como las hormigas (Nicolson 2007), a su vez ayudan a disuadir a los herbívoros e insectos que desean ovopositar en estas plantas (Cardoso-Gustavson *et al.* 2013, Mongiello 2014) y son característica presente en varias familias como Bignoniaceae, Balsaminaceae, Leguminosae y Passifloraceae (Elias 1983).

Dentro de Passifloraceae un género importante es *Passiflora* L., que se encuentra ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, con más de 500 especies identificadas, la mayoría concentrada en Sudamérica y Centro América (Ulmer & MacDonald 2004). En este género, es común la presencia de nectarios extraflorales en sus hojas (Metcalf & Chalk 1979), ubicadas en el pecíolo, frecuentemente en par o sobre la cara inferior de la lámina foliar (Metcalf & Chalk 1983), aunque también pueden hallarse en las brácteas o estípulas (Ulmer & MacDonald 2004).

Diversos autores consideran que la ubicación, forma e histología de los nectarios extraflorales en *Passiflora* son de importancia para la delimitación taxonómica de especies y/o categorías taxonómicas superiores (Killip 1938, Lawrence 1960, Cusset 1965, De Wilde 1972, Durkee 1982, Elias 1983, Durke *et al.* 1984, Vanderplank 1996, Jáuregui *et al.* 2001, 2002, Ulmer & MacDonald 2004, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013, Silva *et al.* 2016). Por tanto, el presente trabajo tiene por objetivo identificar las características morfoanatómicas de los nectarios extraflorales de *P. cincinnata* Mast. y *P. tricuspis* Mast. que puedan ser útiles en la delimitación taxonómica de estas especies y apoyo a la taxonomía del género.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras foliares provenientes de cinco individuos de *P. cincinnata* y *P. tricuspis* fueron colectadas de plantas presentes en el Jardín Botánico Municipal de Santa Cruz de la Sierra, ubicado sobre la carretera a Cotoca, a 8 ½ km de la ciudad capital. También fueron fijadas en FAA (Johansen 1940) y conservadas en alcohol etílico al 70% para su análisis en laboratorio. Se conservan exsiccatas en el Herbario del Oriente Boliviano de Santa Cruz (USZ).

El análisis morfológico y anatómico se realizó en el Laboratorio de Botánica de la carrera de Biología, de la Facultad de Ciencias Agrícolas, UAGRM. Para la descripción morfológica y toma de microfotografías, se observaron muestras de hojas en microscopio estereoscópico trinocular, marca Olympus SZ X7, equipado con cámara fotográfica digital DP21-SAL, así como en microscopio electrónico de barrido (MEB) Jeol 5800 LV, del Servicio de Microscopia Electrónica de Barrido de la Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes-Argentina. Las variables morfológicas de los NEFs que se tomaron en cuenta fueron: posición, cantidad y forma; y para su clasificación se siguió el criterio de Zimmermann (1932).

Para la descripción anatómica se utilizaron pequeños fragmentos de la lámina y peciolo, cortados con criostato marca SLEE MEV, a 20 µm de grosor. Las secciones obtenidas fueron depositadas en cajas petri con agua destilada y clarificadas con hipoclorito de sodio al 10%. Para la tinción se usó coloración diferencial con Safranina – Azul de Astra (Luque *et al.* 1996). Por último, las muestras se montaron en porta y cubreobjeto, con gelatina glicerizada para su conservación. Las observaciones anatómicas y el registro fotográfico se efectuaron en microscopio trinocular marca Olympus BX53, dotado de cámara fotográfica digital DP21-SAL. Los cristales de oxalato de calcio se pusieron en evidencia con luz polarizada con el mismo equipo. Para verificar la ocurrencia de azúcar en la secreción producida por los nectarios, se aplicaron tiras de glucosa (PRODIGY) directamente sobre el exudado.

RESULTADOS

Ubicación de los nectarios extraflorales

Los NEFs en *P. cincinnata* se encuentran únicamente ubicados en par sobre la base del peciolo (Figuras 1A y 3A); mientras que en *P. tricuspis* se encuentran en el haz de la lámina foliar (Figura 1B), ubicados en par en la base donde irradian las nervaduras (Figuras 1C y 1F) y solitarios en el margen de la lámina foliar, encontrándose generalmente de 7 a 10, excepto en la región cercana a la base foliar (Figuras 1B y 1E). En ambas especies los NEFs secretan una sustancia azucarada, comprobada mediante prueba de glucosa.

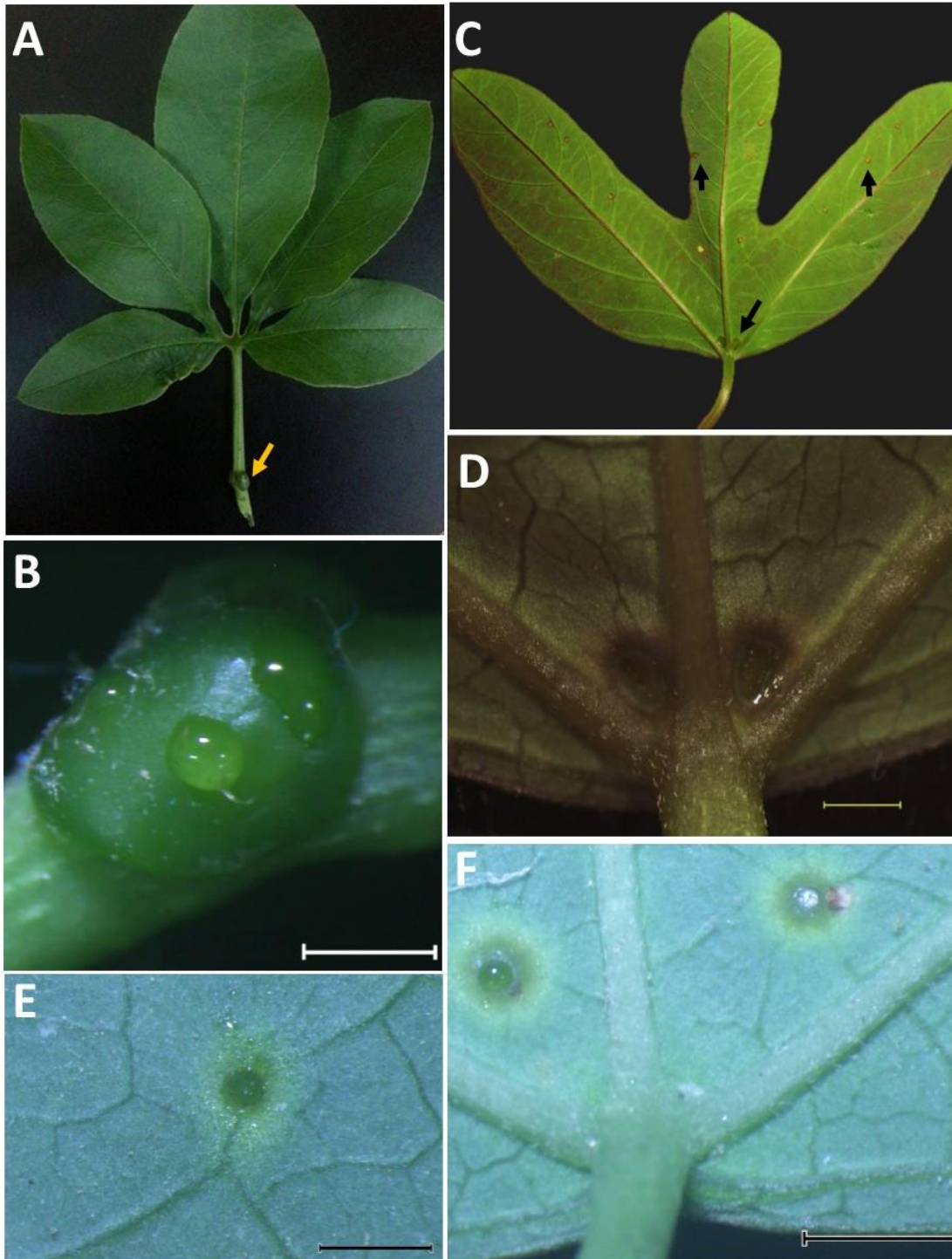


Figura 1. A-B. *P. cincinnata* A) Aspecto general de la hoja, exhibiendo los NEF en la base del pecíolo. B) Detalle de los NEF secretando néctar. C-F *P. tricuspis*. C) Aspecto general de la hoja, exhibiendo NEF en la cara abaxial de la lámina foliar en *P. tricuspis* D) NEF en la base de la lámina foliar, NEF al mismo nivel. E) NEF en la base de la lámina foliar, con cierto desnivel y distancia, secretando néctar. F) detalle del NEF en el margen de la lámina. Barras de 1 mm (B, D y E) y de 2 mm (F).

Caracteres morfológicos de los nectarios extraflorales

En *P. cincinnata* los NEFS tienen forma protuberante, de contorno más o menos redondo a levemente elíptico (Figura 2A); la superficie secretora está ubicada en la parte media superior, presentando elevaciones cuticulares (Figura 2B), la cual se rompe una vez secreta el exudado (Figura 2C). La asincronía de los NEFs se puede observar en la Figura 2A.

En *P. tricuspis*, las NEFs son hundidos, en forma de ocelos, de contorno circular (Figuras 2D y 2F), con la región central un poco abultada debido a las elevaciones cuticulares por el acúmulo de néctar que se rompen durante la secreción (Figura 2E y 2F). En toda la superficie del NEF se hallan tricomas protectores unicelulares (Figuras 2F y 4B).

Aunque los NEFs en ambas especies difieren morfológicamente, en su anatomía presentan semejanzas, caracterizándose por presentar, en corte transversal, una epidermis secretora, abundante parénquima glandular y subglandular, así como haces vasculares asociados.

En *P. cincinnata* la epidermis secretora está constituida por una o dos capas de células alargadas, dispuestas en empalizada, con paredes y cutícula delgada (Figuras 3B y 3C). La salida del exudado a través de la epidermis secretora produce el desprendimiento de la cutícula de las paredes periclinales externas, formando un espacio subcuticular, donde se almacena hasta antes de su liberación al medio (Figuras 3B y 3C). En posición subepidérmica se encuentra el parénquima glandular seguido del subglandular, formado por varias capas de células isodiamétricas, de paredes delgadas (Figura 3C). En el parénquima subglandular se presentan cristales de oxalato de calcio en forma de drusas (Figura 3B) al igual que haces vasculares formados por xilema y floema que separa ambos parénquimas y donde únicamente las terminaciones del floema llegan al parénquima glandular (Figura 3D).

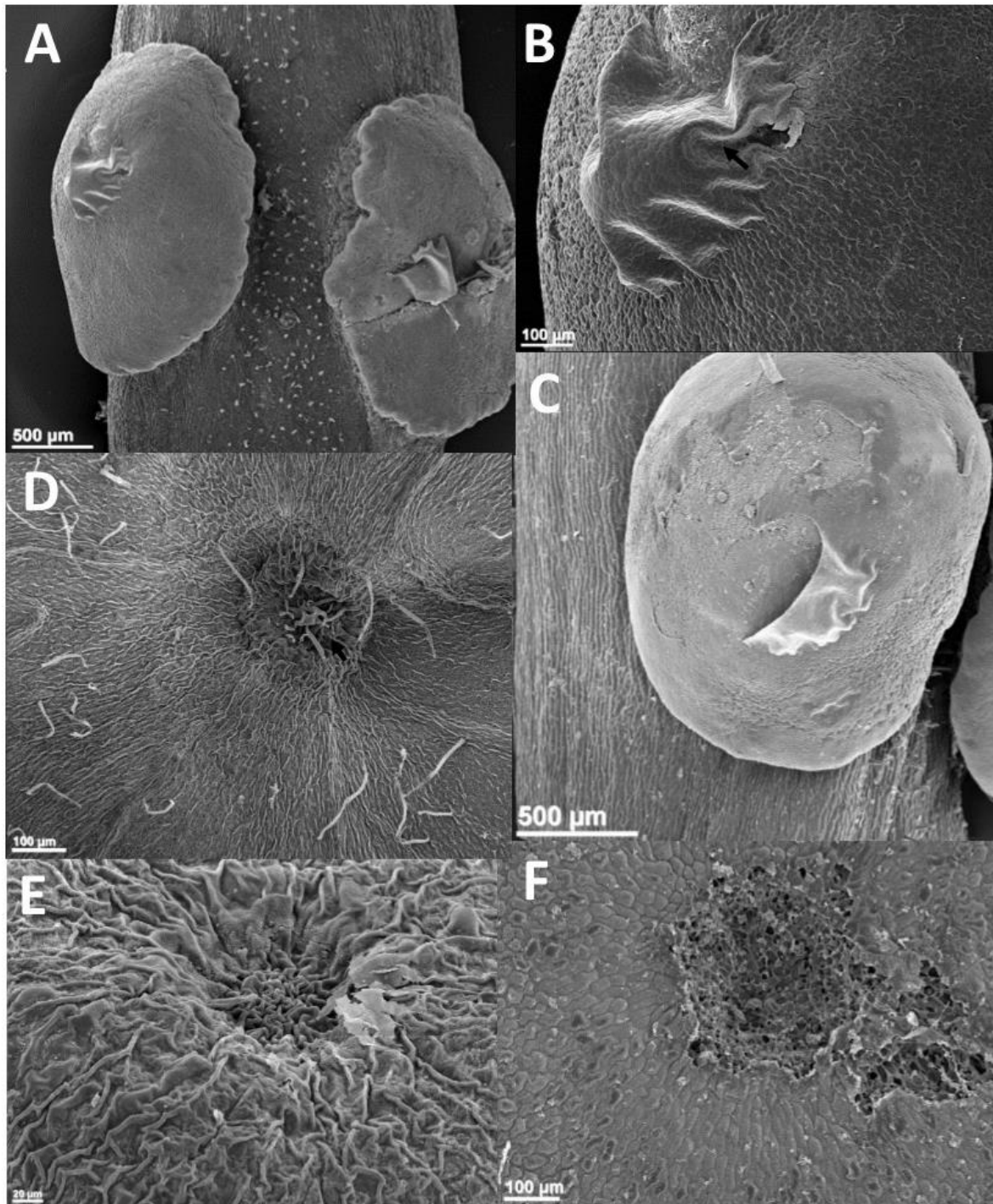


Figura 2. Micromorfología de los NEF. A-C. *P. cincinnata*. A) Asincronía de los nectarios, NEF en fase secretora (izq.) y pos-secretora (der.). A y B) Nectarios elíptico-globulares. B) NEF con cutícula elevada, fase secretora. C) NEF en fase pos-secretora, ruptura de cutícula. D-F. *P. tricuspis* D) NEF con cutícula elevada (flecha), fase secretora y con tricomas protectores. E) Rotura de la cutícula F) NEF destruido, fase pos-secretora.

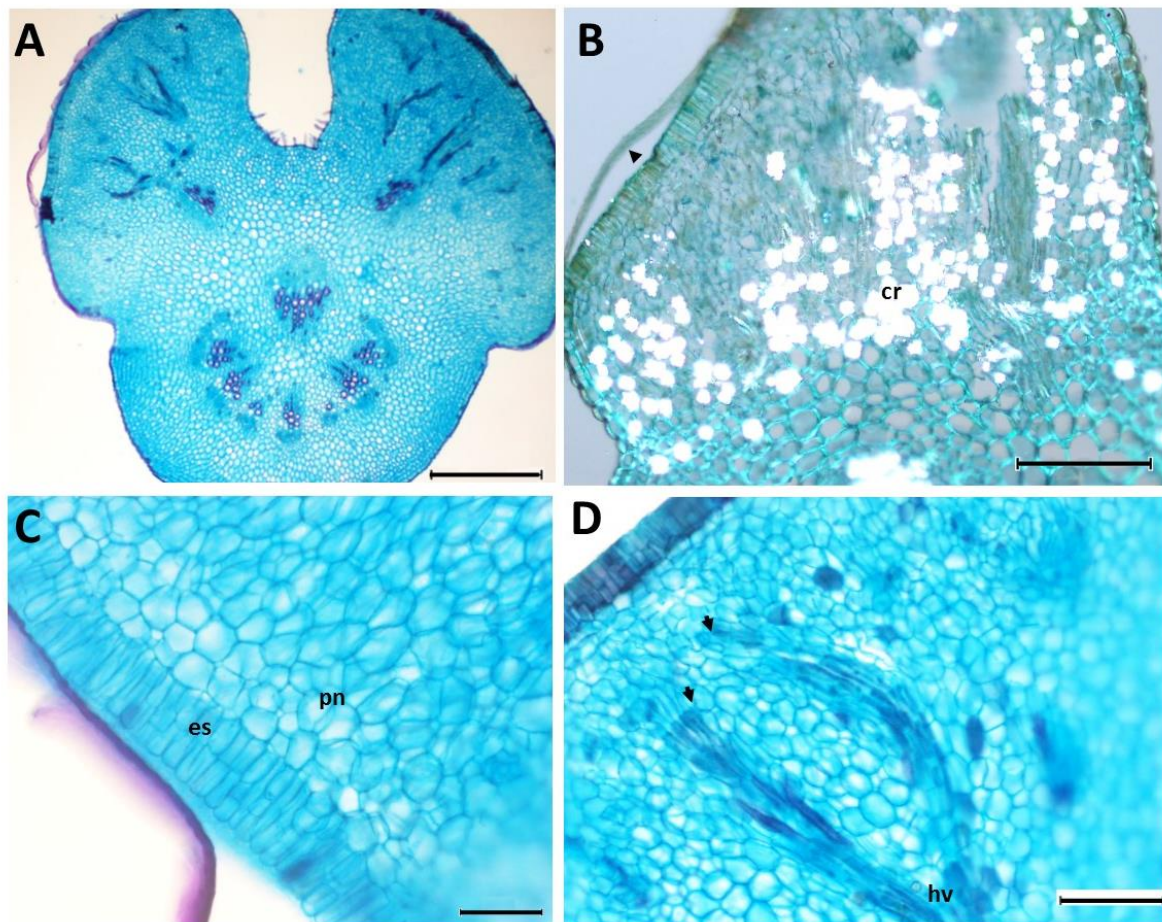
Caracteres anatómicos de los nectarios extraflorales

Figura 3. NEF peciolar en transcorte *P. cincinnata*: A) Vista general de los nectarios. B) Detalle mostrando la cutícula elevada (flecha), cristales (cr) vistos con luz polarizada. C) Detalles de la epidermis secretora (es) en empalizada y parénquima nectarífero (pn). D) Detalles de los haces vasculares (hv), con terminaciones de floema (flecha). Barra de 500 μm (A), 200 μm (B), 50 μm (C), 100 μm (D).

En *P. tricuspis* la epidermis secretora está constituida por cuatro a cinco capas celulares ligeramente modificadas en empalizada, con paredes delgadas y citoplasma denso (Figuras 4C – 4D), cubierta por una cutícula levemente engrosada, con flanges cuticulares en las paredes periclinales externas de la primera capa celular (Figura 4D). El parénquima glandular está compuesto por varias capas celulares, conteniendo abundantes cristales de oxalato de calcio en forma de drusas (Figuras 4B - 4E). Debajo de este tejido se halla el parénquima subglandular, donde se ubican haces vasculares, de los cuales sólo el floema llega hasta el parénquima glandular (Figura 4D).

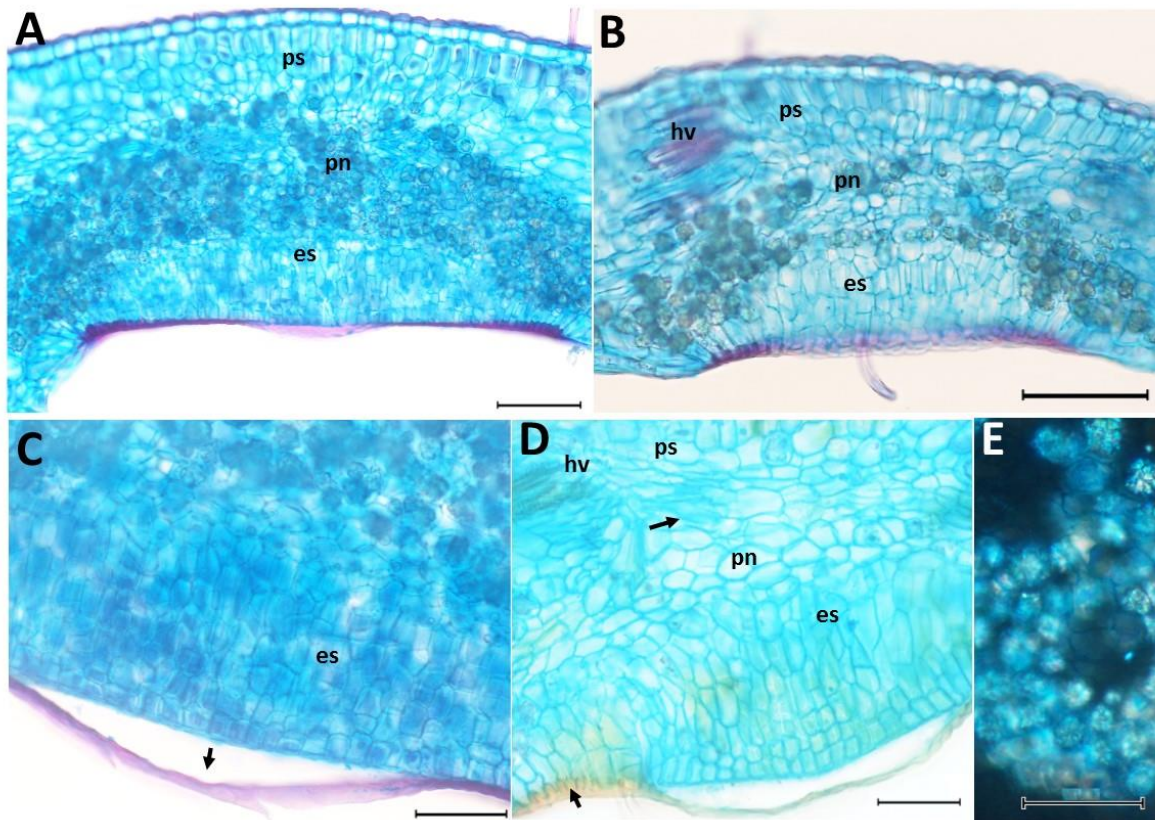


Figura 4. NEF laminares en transcorte *P. tricuspidis*: A) Vista general de los nectarios en la base de la hoja. B) Vista general de los nectarios en los bordes de la lámina. C) Detalle de la epidermis secretora (es) en empalizada, cutícula elevada (flecha). D) Detalle del parénquima nectarífero (pn), flanges cuticulares (flecha) y terminaciones de floema (flecha), haces vasculares (hv) y parénquima subglandular (ps). E) Detalle de cristales de oxalato de calcio, vistos con luz polarizada. Barra de 100 μm (A, B) y 50 μm (C, D, E).

DISCUSIÓN

Tanto en *Passiflora cincinnata* como en *P. tricuspidis*, los NEFs están conformados por tejidos especializados que de acuerdo con Wilkinson (1979) corresponden a NEFs de tipo estructurado. Anatómicamente ambas especies presentan el mismo arreglo histológico, constituido por epidermis secretora en empalizada, parénquima glandular y subglandular asociados a haces vasculares. Este arreglo es común en nectarios extraflorales de otras especies de *Passiflora* (Roth 1974, Durkee 1982, Jáuregui *et al.* 2001, 2002, Rocha *et al.* 2009, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013, Nascimento & Barbosa 2014, Silva *et al.* 2016), diferenciándose entre ellas en el espesor y número de capas celulares de los tejidos que los conforman, como también por la presencia de compuestos fenólicos y cristales de oxalato de calcio.

Los NEFs de *P. tricuspis* se caracterizan por presentar flanges cuticulares en la epidermis secretora, que ya han sido descritas en otras especies del género, (Durkee 1982, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013, Silva *et al.* 2016), los cuales tienen por función mantener la cutícula adherida a la zona periférica de la epidermis evitando que el néctar salga de los bordes del tejido secretor cuando la cutícula se distiende (Gonzalez & Ocantos 2006). En los nectarios de *P. cincinnata* y *P. tricuspis* se forma un espacio subcuticular al desprenderse la cutícula de la epidermis, que según Jáuregui *et al.* (2002), Cardoso-Gustavson *et al.* (2013) y Silva *et al.* (2016) ocurre debido a la acumulación del exudado en esta región y que su salida al medio podría ser a través de la ruptura de la cutícula, habiendo sido observado en los nectarios extraflorales de *P. edulis* después de la visita de hormigas (Cardoso-Gustavson *et al.* 2013).

Los cristales de oxalato de calcio en forma de drusas se encuentran en el parénquima glandular y subglandular junto a los haces vasculares; estos cristales también han sido reportados por Roth (1974), Durkee (1982), Jáuregui *et al.* (2002), Rocha (2009), Cardoso-Gustavson *et al.* (2013), Nascimento & Barbosa (2014) y Silva *et al.* (2016) en otras especies de *Passiflora*, los cuales pueden estar asociados al metabolismo del floema (Elias & Gelbart 1977).

La vascularización de los nectarios puede ser de tres tipos, exclusivamente por floema, por floema y xilema y predominantemente por xilema. En *P. cincinnata* como *P. tricuspis*, los haces vasculares presentes en el parénquima subglandular están conformados por xilema y floema, mientras que en el parénquima glandular sólo por terminaciones del floema; estos tipos de vascularización han sido referidos en otras especies del género (Durkee 1982, Rocha 2009, Jáuregui *et al.* 2001, Cardoso-Gustavson *et al.* 2013, Nascimento & Barbosa 2014, Silva *et al.* 2016).

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que morfológicamente los NEFs entre *P. cincinnata* y *P. tricuspis* son variables, tanto en forma, ubicación y cantidad. Los NEFs en *P. cincinnata* son de tipo elevado globular-elíptico, ubicados en par en la base del peciolo; mientras que en *P. tricuspis* son de tipo hundido-circular, situados sobre la base de la lámina y alrededor del margen foliar, en cantidad irregular.

Anatómicamente, ambas especies presentan similitudes en cuanto a la presencia de epidermis secretora en empalizada, parénquima glandular, parénquima subglandular, abundantes cristales y haces vasculares asociados; diferenciándose en el número de capas de la epidermis secretora y en la ubicación de los cristales.

En conclusión, las variaciones morfológicas y anatómicas son caracteres de valor diagnóstico que pueden ser tomados en cuenta para la delimitación taxonómica de las especies y como herramienta de apoyo a la taxonomía de este complejo género.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Jardín Botánico Municipal de Santa Cruz de la Sierra por la autorización para las colectas de las muestras y ayuda en la identificación de las especies y al Laboratorio de Botánica de la Carrera de Biología - UAGRM por el apoyo con el préstamo de los equipos y en los análisis del estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cusset, G. 1965. Les nectaires extra-floraux et la valeur de la feuille des Passifloracées. *Revue Générale de Botanique* 72:145–219.
- Cardoso-Gustavson, P., N. L. Andrezza, A. C. H. F. Sawaya, & M. de Moraes Castro. 2013. ¿Only attract ants? The versatility of petiolar extrafloral nectaries in *Passiflora*. *American Journal of Plant Sciences* 4: 460–469.
- De Wilde, W. 1972. The indigenous old world passifloras. *Blumea* 20: 227-250.
- Durkee, L. 1982. The floral and extrafloral nectaries of *Passiflora* II. The extrafloral nectary. *American Journal of Botany* 69: 1420–1428.
- Durkee, L. Baird & C. H. Cohen, P. 1984. Light and electron microscopy of the resin glands of *Passiflora foetida* (Passifloraceae). *American Journal of Botany* 71: 596–602.
- Elias, T. S. & H. Gelband. 1976. Morphology and anatomy of floral and extrafloral nectaries *Campsis* (Bignoniaceae) *American Journal of Botany* 63:1349–1353.
- Elias, T. S & H. Gelband. 1977. Morphology, anatomy and relationship of extrafloral nectaries and hydathodes in two species of *Impatiens* (Balsaminaceae). *Botanical Gazette*. 138(2): 206–212
- Elias, T. S. 1983. Extrafloral nectaries: their structure and distribution. In: B. Bentley & T. Elias, (Eds.). *The biology of nectaries*. Columbia University Press. New York, United States of America. Pp. 174–203.
- Gonzalez, A. M. & M. N. Ocantos. 2006. Nectarios extraflorales en *Piriqueta* y *Turnera* (Turneraceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 41(3–4): 269–284.
- Jáuregui, D., M. García & D. Pérez. 2002. Morfoanatomía de las glándulas en cuatro especies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) de Venezuela. *Caldasia* 24 (1): 33–40.
- Jáuregui, D., M. García & D. Pérez. 2001. Morfoanatomía de las glándulas secretoras de *Passiflora guazumaefolia* Juss. y *Passiflora* aff. *P. tiliaefolia* L. (Passifloraceae) presentes en Venezuela. *Phyton-Revista Internacional de Botánica Experimental* 70: 229–235.

- Johansen, D. A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co., Inc. New York, USA.
- Killip, E. P. 1938. The American species of Passifloraceae. Field Museum Natural History, Botanical Series 19: 1–613.
- Lawrence, G. 1960. Identification of the cultivated Passionflower. *Baileya* 8: 121–132.
- Luque, R., H. C. Sousa & J. E. Kraus. 1996. Métodos de coloração de Roese (1972) – modificado – e Kropop (1972) visando a substituzo do azul de astra por azul de alcito 8 GS ou 8 GX. *Acta botânica Brasileira* 10(2): 199–212.
- Mongiello, C. N. 2014. *Passiflora caerulea*: Nectarios, mariposas y coevolución. *Revista Boletín Biológica*. 32 (8): 5–8.
- Metcalfe, C. & L. Chalk. 1979. Anatomy of the Dicotyledons, Systematic Anatomy of the leaf and stem. Vol. I. 2nd Edition. Clarendon Press. Oxford, England.
- Metcalfe, C. & L. Chalk. 1983. Anatomy of the Dicotyledons. Vol. I. 2nd Edition. Clarendon Press, Oxford, England.
- Nascimento, K. C., & J. F Barbosa. 2014. Caracterização morfoanatômica de nectários extraflorais de *Passiflora alata*, Passifloraceae. *UNINGÁ Review*, 20(1): 45–55.
- Nicolson, S. W. 2007. Nectar consumers. In: S. Nicolson, M. Nepi, E. Pacini (Eds.). *Nectaries and nectar*. Springer. Dordrecht, The Netherlands. Pp. 289–342.
- Silva, E. O., A. C. Feio, P. Cardoso-Gustavson, M. A. Milward-De-Azevedo, J. U. M. Dos Santos & A. C. Dias. 2016. Extrafloral nectaries and plant–insect interactions in *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Brazilian Journal of Botany* 40(1): 331–340.
- Rocha, D. I., L. C. da Silva, V. M. M. Valente, D. M. T. Francino & R. M. S. A. Meira. 2009. Morphoanatomy and development of leaf secretory structures in *Passiflora amethystina* Mikan (Passifloraceae). *Australian Journal of Botany* 57: 619–626
- Roth, I. 1974. Morfología, anatomía y desarrollo de la hoja pinnada y de las glándulas laminares en *Passiflora* (Passifloraceae). *Acta Botánica Venezuéllica* 9: 363–380.
- Ulmer, T. & J. M. MacDougal. 2004. *Passiflora*: Passionflowers of the world. Timber Press. Portland, USA.
- Vanderplank, J. 1996. *Passion flowers and passion fruit*. MIT Press. 2nd Edition. Cambridge, USA.
- Wilkinson, H. 1979. The plant surface (mainly leaf) Part. III Extrafloral nectaries. en: C. R. Metcalfe & L. Chalk (Eds.), *Anatomy of the dicotyledon*. Clarendon Press. Oxford, England. Pp.124–131
- Zimmermann, J. G. 1932. Über die extrafloralen Nektarien der Angiospermen. *Beihefte zum botanischen Centralblatt*. 49A: 99–196