

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Zoologia

Angie Zuleidi Amezquita Mayorquin

**PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS EM *PASSIFLORA POHLII* (PASSIFLORACEAE) E
RELAÇÕES COM ABELHAS CREPUSCULARES *PTILOGLOSSA* (COLLETIDAE):
abordagens morfológicas e químicas**

Belo Horizonte
2025

Angie Zuleidi Amezquita Mayorquin

**PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS EM *PASSIFLORA POHLII* (PASSIFLORACEAE) E
RELAÇÕES COM ABELHAS CREPUSCULARES *PTILOGLOSSA* (COLLETIDAE):
abordagens morfológicas e químicas**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em
zoologia da Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Zoologia.

Orientador: Prof. Clemens Schlindwein

Belo Horizonte
2025

043

Mayorquin, Angie Zuleidi Amezquita.

Produção de voláteis em *Passiflora pohlii* (Passifloraceae) e relações com abelhas crepusculares *Ptiloglossa* (Colletidae): abordagens morfológicas e químicas [manuscrito] / Angie Zuleidi Amezquita Mayorquin. – 2025.

81 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Clemens Schlindwein.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Zoologia. 2. Abelhas. 3. Polinização. I. Schlindwein, Clemens.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 591



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ANGIE ZULEIDI AMEZQUITA MAYORQUIN

Ao sétimo dia do mês de novembro do ano de dois mil e vinte e cinco, às oito horas, realizou-se, por webconferência, a defesa de Doutorado da Pós-Graduação em Zoologia, de autoria da Doutoranda **Angie Zuleidi Amezquita Mayorquin** intitulada: “Produção de voláteis em *Passiflora pohlii* (Passifloraceae) e relações com abelhas crepusculares *Ptiloglossa* (Colletidae): abordagens morfológicas e químicas”. Abrindo a sessão, o Presidente da Banca, Prof. Dr. Clemens Peter Schindwein, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra para a discente para apresentação de seu trabalho. Esteve presente a Banca Examinadora composta pelos membros: Adalberto José dos Santos, João Renato Stehmann, Paula de Souza São Thiago Calaça, Theo Rolla Paula Mota, e demais convidados. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da discente. Após a arguição, apenas a Banca Examinadora permaneceu na sala para avaliação e deliberação acerca do resultado final, a saber: o trabalho foi APROVADO SEM ALTERAÇÕES



Documento assinado eletronicamente por **João Renato Stehmann, Professor do Magistério Superior**, em 14/11/2025, às 09:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula de Souza São Thiago Calaça, Usuário Externo**, em 14/11/2025, às 11:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adalberto Jose dos Santos, Professor do Magistério Superior**, em 14/11/2025, às 13:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clemens Peter Schindwein, Professor do Magistério Superior**, em 23/11/2025, às 14:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Theo Rolla Paula Mota, Professor do Magistério Superior**, em 26/11/2025, às 13:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4730126** e o código CRC **8567E567**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Produção de voláteis em *Passiflora pohlii* (Passifloraceae) e relações com abelhas crepusculares *Ptiloglossa* (Colletidae): abordagens morfológicas e químicas

ANGIE ZULEIDI AMEZQUITA MAYORQUIN

Esta tese foi apresentada em sessão pública e submetida a avaliação em 07 de novembro de 2025, sendo aprovada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Adalberto José dos Santos (Membro / UFMG)

Prof. Dr. Clemens Peter Schlindwein (Orientador / UFMG)

Prof. Dr. João Renato Stehmann (Membro / UFMG)

Profa. Dra. Paula de Souza São Thiago Calaça (Membro / Fundação Ezequiel Dias)

Prof. Dr. Theo Rolla Paula Mota (Membro / UFMG)



Documento assinado eletronicamente por **João Renato Stehmann, Professor do Magistério Superior**, em 14/11/2025, às 09:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula de Souza São Thiago Calaça, Usuário Externo**, em 14/11/2025, às 12:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adalberto Jose dos Santos, Professor do Magistério Superior**, em 14/11/2025, às 13:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clemens Peter Schlindwein, Professor do Magistério Superior**, em 23/11/2025, às 14:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Theo Rolla Paula Mota, Professor do Magistério Superior**, em 26/11/2025, às 13:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4730183** e o código CRC **5A3DA2CC**.

Ao meu parceiro de vida, por me fazer enxergar o mundo com outros olhos e por me libertar dos fardos que carregava do passado.

Que venham muitos mais anos juntos!

AGRADECIMENTOS

O caminho percorrido neste doutorado foi um caminho de autoconhecimento, de autodesafio, de luta contra inimigos silenciosos, com os quais consegui lidar quando soube que me abraçavam: a ansiedade e o estresse. Um caminho de saudade infinita da minha família, da minha cultura, do meu cachorro e de ver o crescimento de meus irmãos em pequenos fotogramas a cada ligação. A culpa e as lágrimas me deram a mão e caminharam comigo ao ver que o tempo diminuía e que muitos dos objetivos em mente não conseguiriam ser realizados. No final, um único objetivo: terminar este caminho para abrir os olhos a outras perspectivas.

Agradeço ao investimento público em educação que, ainda que insuficiente em muitas esferas, me concedeu a oportunidade de realizar este doutorado e de ter uma chance concreta de melhorar minha qualidade de vida no futuro. Deixo aqui meu profundo agradecimento à CAPES e à FAPEMIG pelas bolsas de estudo concedidas. Sem este apoio, a realização deste doutorado não teria sido possível de modo algum.

Agradeço de todo o coração a cada uma das pessoas que esteve me acompanhando neste caminho: ao meu orientador, por tentar me compreender e me guiar; a cada um dos professores com os quais trabalhei, por todo o seu conhecimento; ao Adriano, por me guiar e me acompanhar no começo; a cada um dos ICs que aportaram um grão de areia no cuidado e manutenção das plantas, entre outras coisas; e ao Museu de História Natural da UFMG, por me ajudar no crescimento de algumas plântulas.

E, finalmente, agradeço à minha família que, de longe, me deu apoio emocional e sempre teve esperança em mim, à qual adoro e espero poder ver daqui a pouco. Agradeço aos meus sogros e à minha cunhada, que me acolheram em momentos de pandemia, me deram todo o carinho e me receberam como mais um membro da família, sem receber nada em troca e dando tudo. Ao meu companheiro de vida, por sua compreensão, por me abraçar em cada crise de ansiedade e me encorajar a cumprir cada etapa deste doutorado, mesmo quando eu mesma duvidava que seria capaz; por ter pegado na minha mão e ter estado ao meu lado nos momentos difíceis, e por irmos descobrindo juntos, pouco a pouco, o significado de um

relacionamento e a vontade de melhorar a cada dia. Te amo e espero que venham muitos mais anos ao teu lado.

*“O nosso povo odeia política, mas quem odeia
nosso povo ama política”*

Mano brown

RESUMO

A principal proposta deste trabalho reside na investigação dos compostos voláteis que medeiam a especializada polinização crepuscular entre *Ptiloglossa* e *Passiflora pohlii* e onde eles são produzidos. Esta interação distingue-se pela notável sobreposição química entre os perfis odoríferos da abelha e da flor, bem como pela exclusividade do mutualismo, onde *P. pohlii* conta com *Ptiloglossa* como seu único polinizador eficaz. Pelo qual o nosso trabalho está estruturado em dois eixos principais:

Caracterização da Fragrância Floral: O primeiro capítulo busca identificar a composição química dos voláteis de *P. pohlii*, determinar o ritmo de emissão e localizar anatomicamente as estruturas produtoras do odor. Encontramos que os filamentos da corona externa eram a fonte do intenso aroma cítrico, comprovado através de análises químicas, morfológicas e de ultraestrutura nestas estruturas. A emissão de voláteis, dominada por monoterpenos (97%), atingiu seu pico no amanhecer, coincidindo com o horário de forrageamento das abelhas descrito na literatura, e decaiu drasticamente (90%) poucas horas depois, um declínio correlacionado com a degradação de organelas celulares. Conclui-se que *P. pohlii* possui um sistema altamente coordenado de características estruturais, químicas e temporais, o que sugere fortemente uma adaptação para atrair seletivamente suas polinizadoras crepusculares em uma janela de tempo restrita.

Caracterização da Fragrância das Abelhas: O segundo capítulo analisa os compostos voláteis emitidos pelas próprias abelhas *Ptiloglossa*, comparando machos e fêmeas e identificando a glândula responsável pela produção. Os resultados demonstraram que a glândula mandibular é a fonte do característico odor cítrico destas abelhas, o qual é majoritariamente composto por monoterpenos, como geraniol e geranial. Foi documentado um nítido dimorfismo sexual: a morfologia da glândula tem forma de castanha de caju nas fêmeas e é trilobada nos machos. Estes resultados sustentam a hipótese de que estes compostos atuariam como feromônios, para o que serão necessários bioensaios futuros que o confirmem.

Em conjunto, os dois capítulos revelam um notável paralelismo químico e ecológico: tanto a planta quanto sua polinizadora especializada emitem perfis dominados por

monoterpenos de aroma cítrico, sincronizados com a janela de atividade crepuscular, sugerindo um sistema de polinização mutualisticamente ajustado e altamente especializado.

Palavras-chave: Polinização crepuscular, Voláteis florais, Ultraestrutura do osmóforo, Emissão de aroma terpenoide, *Passiflora*, *Ptiloglossa*, glândula mandibular.

ABSTRACT

The primary aim of this work is to investigate the volatile compounds that mediate the specialized crepuscular pollination between *Ptiloglossa* and *Passiflora pohlii*, and to determine their production sites. This interaction is characterized by a remarkable chemical overlap between the olfactory profiles of the bee and the flower, as well as by the exclusivity of the mutualism, where *P. pohlii* relies on *Ptiloglossa* as its only effective pollinator. Thus, our work is structured around two main axes:

Floral Fragrance Characterization: The first chapter aims to identify the chemical composition of the volatiles of *P. pohlii*, determine their emission rhythm, and anatomically locate the odor-producing structures. We found that the filaments of the outer corona were the source of the intense citrus aroma, as proven through chemical, morphological, and ultrastructural analyses of these structures. The emission of volatiles, dominated by monoterpenes (97%), peaked at dawn, coinciding with the foraging time of the bees described in the literature, and decreased drastically (90%) a few hours later a decline correlated with the degradation of cellular organelles. It is concluded that *P. pohlii* possesses a highly coordinated system of structural, chemical, and temporal characteristics, which strongly suggests an adaptation to selectively attract its crepuscular pollinators within a restricted time window.

Bee Fragrance Characterization: The second chapter analyzes the volatile compounds emitted by the *Ptiloglossa* bees themselves, comparing males and females and identifying the gland responsible for production. The results demonstrated that the mandibular gland is the source of the bees' characteristic citrus odor, which is predominantly composed of monoterpenes, such as geraniol and geranial. A clear sexual dimorphism was documented: the gland morphology is rounded (bean-shaped) in females and trilobed in males. These results support the hypothesis that these compounds would function as pheromones, for which future bioassays will be needed to confirm it.

Together, the two chapters reveal a remarkable chemical and ecological parallel: both the plant and its specialized pollinator emit profiles dominated by citrus-scented monoterpenes,

synchronized with the crepuscular activity window, suggesting a mutually adjusted and highly specialized pollination system.

Key-words: Crepuscular pollination, Floral volatiles, Osmophore ultrastructure, Terpenoid scent emission, *Passiflora*, *Ptiloglossa*, mandibular gland.

RESUMEN

La principal propuesta de este trabajo reside en la investigación de los compuestos volátiles que median la polinización crepuscular especializada entre *Ptiloglossa* y *Passiflora pohlii* y en determinar dónde son producidos. Esta interacción se distingue por la notable superposición química entre los perfiles odoríferos de la abeja y la flor, así como por la exclusividad del mutualismo, donde *P. pohlii* tiene a *Ptiloglossa* como su único polinizador eficaz. Por lo cual, nuestro trabajo está estructurado en dos ejes principales:

Caracterización de la Fragancia Floral: El primer capítulo busca identificar la composición química de los volátiles de *P. pohlii*, determinar el ritmo de emisión y localizar anatómicamente las estructuras productoras del olor. Encontramos que los filamentos externos de la corona eran la fuente del intenso aroma cítrico, comprobado mediante análisis químicos, morfológicos y de ultraestructura en estas estructuras. La emisión de volátiles, dominada por monoterpenos (97%), como geraniol e geranial, alcanzó su pico al amanecer, coincidiendo con el horario de forrajeo de las abejas según la literatura, y decayó drásticamente (90%) pocas horas después, una disminución correlacionada con la degradación de orgánulos celulares que ayudan en la producción de olor. Se concluye que *P. pohlii* posee un sistema altamente coordinado de características estructurales, químicas y temporales, lo que sugiere fuertemente una adaptación para atraer selectivamente a sus polinizadoras crepusculares en una ventana de tiempo restringida.

Caracterización de la Fragancia de las Abejas: El segundo capítulo analiza los compuestos volátiles emitidos por las abejas *Ptiloglossa*, comparando machos y hembras e identificando la glándula responsable de la producción. Los resultados demostraron que la glándula mandibular es la fuente del característico olor cítrico de estas abejas, el cual está mayoritariamente compuesto por monoterpenos, como geraniol y geranial. Se documentó un claro dimorfismo sexual: la morfología de la glándula tiene forma de anacardo en las hembras y es trilobulada en los machos, siendo de mayor tamaño en los machos. Estos resultados sustentan la hipótesis de que estos compuestos funcionarían como feromonas, para lo cual se necesitarán bioensayos futuros que lo confirmen.

En conjunto, los dos capítulos revelan un notable paralelismo químico y ecológico: tanto la planta como su polinizadora especializada emiten perfiles dominados por monoterpenos de aroma cítrico, sincronizados con la ventana de actividad crepuscular, sugiriendo un sistema de polinización mutualísticamente ajustado y altamente especializado.

Palabras clave: Polinización crepuscular, Volátiles florales, Ultraestructura del osmóforo, Emisión de aroma terpenoide, *Passiflora*, *Ptiloglossa*, glándula mandibular.

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1.	A Comunicação Química entre Planta e Polinizador	16
1.2.	Comunicação Química na Vida Social e Solitária das Abelhas	17
1.3.	A Interação Especializada entre <i>Passiflora pohlii</i> e Abelhas <i>Ptiloglossa</i>	17
1.4.	O Nicho Crepuscular: Vantagens, Desafios e Adaptações das Abelhas	18
1.5.	A Interação Especializada entre <i>Passiflora pohlii</i> e <i>Ptiloglossa</i>	19
2.	CAPÍTULO 1: Emissão de Odor na <i>Passiflora pohlii</i> de Floração Crepuscular: Estrutura do Osmóforo e Voláteis Terpenoides	22
2.1.	ABSTRACT	23
2.2.	INTRODUCTION	24
2.3.	MATERIALS AND METHODS.....	26
2.3.1.	Sensory analysis	26
2.3.2.	Morphology and Histochemical analyses (light microscopy)	27
2.3.3.	Ultrastructural analysis (TEM).....	27
2.3.4.	Surface structure analysis (SEM)	28
2.3.5.	Headspace analysis of floral volatiles	28
2.3.6.	Comparative analysis of floral volatiles in <i>Passiflora</i>	29
2.4.	RESULTS.....	30
2.4.1.	Flower structure.....	30
2.4.2.	Sensory analysis	30
2.4.3.	Structure and histochemical analyses	30
2.4.4.	Ultrastructural analysis of the outer filaments.....	31

2.4.5.	Surface structure analysis	33
2.4.6.	Floral volatiles at early anthesis of complete flowers	33
2.4.7.	Schedule of odor emission.....	33
2.4.8.	Floral scent emission in outer filaments and in flowers with these filaments removed	34
2.5.	DISCUSSION.....	34
2.5.1.	Ultrastructure of osmophores	35
2.5.2.	Odor localization	36
2.5.3.	Scent emission is restricted at dawn.....	37
2.5.4.	Floral Scent Composition	38
2.6.	Conclusion	39
2.7.	REFERENCES	40
3.	CAPÍTULO 2: Emissão de odores cítricos por abelhas <i>Ptiloglossa</i> (Colletidae), origem, composição e morfologia glandular	56
3.1.	RESUMO.....	56
3.2.	INTRODUÇÃO	57
3.3.	MATERIAL E MÉTODOS	59
3.3.1.	Coleta de abelhas	59
3.3.2.	Anatomia da glândula mandibular – microscopia de luz	60
3.3.3.	Coleta headspace de compostos emitidos por abelhas <i>Ptiloglossa</i>	60
3.3.4.	Extrato da glândula mandibular.....	60
3.3.5.	Análise e identificação de compostos.....	61
3.4.	RESULTADOS	62
3.4.1.	Composição do odor de <i>Ptiloglossa</i>	62

3.4.2.	Morfologia da glândula mandibular	63
3.4.3.	Identificação e caracterização química do conteúdo da glândula mandibular	66
3.4.4.	Comparação do perfil químico entre machos e fêmeas	68
3.5.	DISCUSSÃO	68
3.6.	Considerações finais	71
3.7.	REFERENCIAS	72

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. A Comunicação Química entre Planta e Polinizador

A atração de polinizadores pelas flores é mediada por uma complexa combinação de sinais multimodais, que inclui desde odores, cores e formas até a oferta de recursos como néctar, pólen e óleos florais (Junker; Parachnowitsch, 2015). Em particular, o odor floral tem uma função importante que varia de acordo com o contexto e com o animal que a percebe (Raguso, 2008). Ela pode atuar como um atraente específico para polinizadores especializados, como no caso de compostos florais específicos que atraem vespas polinizadoras de figos (*Ficus*, Moraceae) (Chen et al., 2009) ou um conjunto de compostos como nas mariposas *Hadena bicruris* (Dötterl et al., 2006) e a maioria das espécies de insetos visitantes florais. Paralelamente, voláteis florais podem ter uma função repelente contra ladrões de néctar, no caso de algumas formigas (Junker; Blüthgen, 2008), ou servir como guias olfativos para ajudar os visitantes a localizar recursos florais (Dötterl; Jürgens, 2005).

Em abelhas, aromas florais podem exercer variadas funções em seu comportamento de forrageio. Eles atraem abelhas a longas distâncias, servindo como guias especialmente em ambientes densos ou com pouca luz, onde a eficácia de sinais visuais é limitada (Ackerman, 1986; Knudsen; Andersson; Bergman, 1999). A atração olfativa a longa distância é um mecanismo particularmente importante para abelhas inexperientes e recém-emergidas, que dependem do olfato para localizar suas primeiras fontes de alimento (Dötterl et al., 2005; Milet-Pinheiro et al., 2013; Molet; Chittka; Raine, 2009). Além disso, os aromas florais aumentam a eficiência do forrageamento, uma vez que indicam a presença ou ausência de recursos como néctar e pólen, permitindo que indivíduos evitem de visitar flores vazias (Dobson; Danielson; Wesep, 1999; Howell; Alarcón, 2007). No caso de abelhas oligoléticas, que coletam pólen exclusivamente em flores da mesma espécie gênero ou família de plantas (Robertson, 1925), pode haver uma resposta comportamental inata a compostos específicos emitidos por suas plantas hospedeiras (Dötterl; Jürgens, 2005; Dötterl; Vereecken, 2010; Milet-Pinheiro et al., 2013). Essa atração instintiva é refinada com a experiência, integrando-se progressivamente a outros estímulos, como cor e forma floral, para formar um padrão de busca mais completo (Burger et al., 2012).

1.2. Comunicação Química na Vida Social e Solitária das Abelhas

A comunicação química é fundamental para organização social, sobrevivência e reprodução das abelhas (Ayasse; Paxton; Tengö, 2001). Ela regula uma ampla gama de atividades destas abelhas, desde a localização de alimento, a defesa da colmeia, a evasão de predadores e a seleção de parceiros para acasalamento (Müller; Buchbauer, 2011). Sinais químicos especializados medeiam interações essenciais, como a identificação de membros da colônia, garantindo o reconhecimento dos integrantes coespecíficos da mesma colônia e a exclusão de intrusos (Buchwald; Breed, 2005). Em colônias a regulação é ainda mais complexa, Os feromônios da rainha suprimem a reprodução das operárias e mantêm a estrutura hierárquica, enquanto os feromônios de alarme geram respostas coletivas de defesa de maneira sincronizada (Slessor; Winston; Le Conte, 2005). No entanto, a importância dos sinais químicos também é fundamental para a grande variedade de espécies com hábitos solitários.

Para as abelhas solitárias, os sinais químicos são o principal meio de comunicação, atuando especialmente na seleção de parceiros e no reconhecimento entre espécies (Ayasse; Paxton; Tengö, 2001). Os odores são cruciais para que os machos localizem as fêmeas e consigam distinguir entre aquelas que estão sexualmente receptivas ou ainda são virgens daquelas que já foram fecundadas (Schiestl; Ayasse, 2000). Em várias espécies, os machos definem e demarcam territórios associados a recursos, usando compostos químicos para atrair fêmeas. Este comportamento pode servir como um indicador da sua qualidade genética ou da sua capacidade de defender o local contra rivais (Ayasse; Paxton; Tengö, 2001; Frankie; Vinson; Coville, 1980; Hefetz, 1983; Vinson et al., 1982).

1.3. A Interação Especializada entre *Passiflora pohlii* e Abelhas *Ptiloglossa*

O forrageamento em baixa luminosidade, no crepúsculo, pode conferir vantagens às abelhas, como a diminuição de competição interespecífica por recursos e a redução da pressão de predação (Araújo et al., 2022; Kelber et al., 2006; Wcislo et al., 2004). A capacidade dessas abelhas crepusculares de forragear no escuro lhes permite coletar recursos antes das abelhas diurnas, ao amanhecer, e depois da atividade de voo das abelhas diurnas, ao anoitecer, além de anteceder polinizadores estritamente noturnos, como os morcegos (Franco e Gimenes, 2011;

Araujo *et al.*, 2020; Araújo *et al.*, 2022). Por serem as primeiras a chegar às flores que desabrocham perto do crepúsculo, essas abelhas coletam uma quantidade maior de pólen, removendo até 15 vezes mais pólen por minuto do que outros visitantes da mesma planta. Isso demonstra a maior eficiência decorrente de seu hábito crepuscular (Araújo *et al.*, 2022).

1.4. O Nicho Crepuscular: Vantagens, Desafios e Adaptações das Abelhas

A baixa luminosidade do crepúsculo dificulta distinguir sinais florais visuais no ambiente, aumentando o ruído visual e tornando a visão menos confiável (Warrant, 2017). Por isso, a navegação e o forrageamento tornam-se um desafio para abelhas crepusculares, que coletam recursos florais exclusivamente sob baixa luz (O'Carroll; Warrant, 2017). Para contrabalançar essas dificuldades, as abelhas crepusculares evoluíram várias adaptações visuais que maximizam a captação de luz aumentando sua sensibilidade visual e minimizam os erros de interpretação do ambiente, (O'Carroll; Warrant, 2017; Warrant *et al.*, 2004). Entre essas adaptações estão ocelos e omatídios maiores em comparação com abelhas diurnas. O aumento no tamanho dos omatídios, no entanto, reduz sua quantidade por área, o que diminui a resolução da imagem, mas garante a captação de luz suficiente para uma boa percepção do ambiente (Araújo *et al.*, 2023). Além das adaptações visuais, a comunicação química entre flor e abelha cumpre uma função essencial que a visão sozinha não consegue suprir (Araújo *et al.*, 2024).

As plantas visitadas ou polinizadas por abelhas crepusculares geralmente apresentam um conjunto de características típicas de flores noturnas, como cores claras, principalmente branco, que contrastam em ambientes de pouca luminosidade, e a presença de forte odor floral (Araújo *et al.*, 2022; Baker, 1961; Borges; Somanathan; Kelber, 2016; Wcislo *et al.*, 2004). *Ptiloglossa* (Colletidae, Diphaglossinae) é um gênero de abelhas conhecido por ter atividade restrita ao horário crepuscular e tem sido registrado como visitante de diversas espécies de plantas cujas flores estão abertas nesses períodos (Araujo *et al.*, 2020; Barbosa *et al.*, 2022; Cordeiro *et al.*, 2017; Costa; Cerdeira, 2018; Faria; Stehmann, 2010; Roberts, 1971). Em alguns casos, no entanto, sua visitas florais não resulta em polinização efetiva, como ocorre em *Pseudobombax longiflorum* (Araújo *et al.*, 2022) e *Caryocar brasiliense* (Araujo *et al.*, 2020), ambas polinizadas principalmente por morcegos.

Por outro lado, há espécies de plantas que são polinizadas efetivamente por abelhas crepusculares do gênero *Ptiloglossa*. Essas plantas também exibem características como coloração clara e odor forte, mas, além disso, possuem atributos típicos de flores melitófilas como tamanhos menores, posição menos expostos e peças florais que fornecem base de pouso para abelhas (Barbosa et al., 2022; Faria; Stehmann, 2010).

1.5. A Interação Especializada entre *Passiflora pohlii* e *Ptiloglossa*

No gênero *Passiflora* (Passifloraceae), o subgênero *Decaloba* reúne várias dessas características, suas flores geralmente são brancas, tem tamanho médio e frequentemente possuem odor forte perceptível, adequando-se, desta maneira, perfeitamente à polinização por abelhas crepusculares (Acha et al., 2021). Em diversas espécies de *Decaloba* abelhas crepusculares de *Ptiloglossa* já foram registradas como polinizadas, como *Passiflora biflora* e *P. misera* (Varassin; Trigo; Sazima, 2001). Outras, como *P. morifolia* (Barbosa et al., 2022) e *P. pohlii* (Faria; Stehmann, 2010), tiveram polinização efetiva confirmada por meio da comprovação de produção de frutos, sugerindo uma relação íntima com estas abelhas crepusculares. No entanto, apenas nas duas primeiras espécies mencionadas os odores florais foram analisados até o momento. Diante disso, é importante avançar na investigação da composição química floral e de interações mediadas por voláteis florais tanto em espécies do subgênero *Decaloba* quanto em outras espécies de plantas para compreender as relações especializadas com abelhas no crepúsculo matutino.

Passiflora pohlii, sendo uma espécie autoincompatível, depende de polinizadores para se reproduzir. Esse papel é desempenhado com eficácia por três espécies de abelhas do gênero *Ptiloglossa*, que visitam as flores num curto período ao amanhecer, entre 5:00 e 7:00 h. Durante a visita floral, a parte dorsal do tórax de *Ptiloglossa* toca os estigmas com alta frequência e garante, desta maneira, alta taxa de frutificação 80% após visitas únicas? (Faria; Stehmann, 2010). As flores emitem fragrância cítrica, mas aspectos cruciais como sua composição química, o momento de liberação dos odores e o local e mecanismo de emissão do odor na flor estão desconhecidos. A caracterização desses aspectos é fundamental para compreender o papel dos compostos voláteis na interação especializada desse sistema de polinização crepuscular. Curiosamente, as próprias abelhas *Ptiloglossa* emitem fragrância cítricas semelhantes para o

sentido olfativo humano. É possível que as abelhas utilizem estes odores cítricos em suas interações, como na atração de parceiros sexuais, ou que o odor possa guiar abelhas inatas durante os primeiros voos em busca de alimento.

Contudo, não é conhecido quais compostos voláteis estão envolvidos na possível comunicação química entre as abelhas, nem o local da sua produção. Essas incógnitas realçam a relevância do estudo dos componentes químicos presentes nessa interação. Diante disso, esta tese investiga a química subjacente a esses dois organismos por meio de dois capítulos: No primeiro capítulo são determinados os componentes da fragrância de *Passiflora pohlii*, seu horário de liberação e a morfologia e ultraestrutura dos osmôforos responsáveis pela produção desses compostos. No segundo capítulo, é analisada a fragrância emitida por abelhas *Ptiloglossa*, comparando os perfis químicos de machos e fêmeas e localizado a glândula produtora dessas fragrâncias.

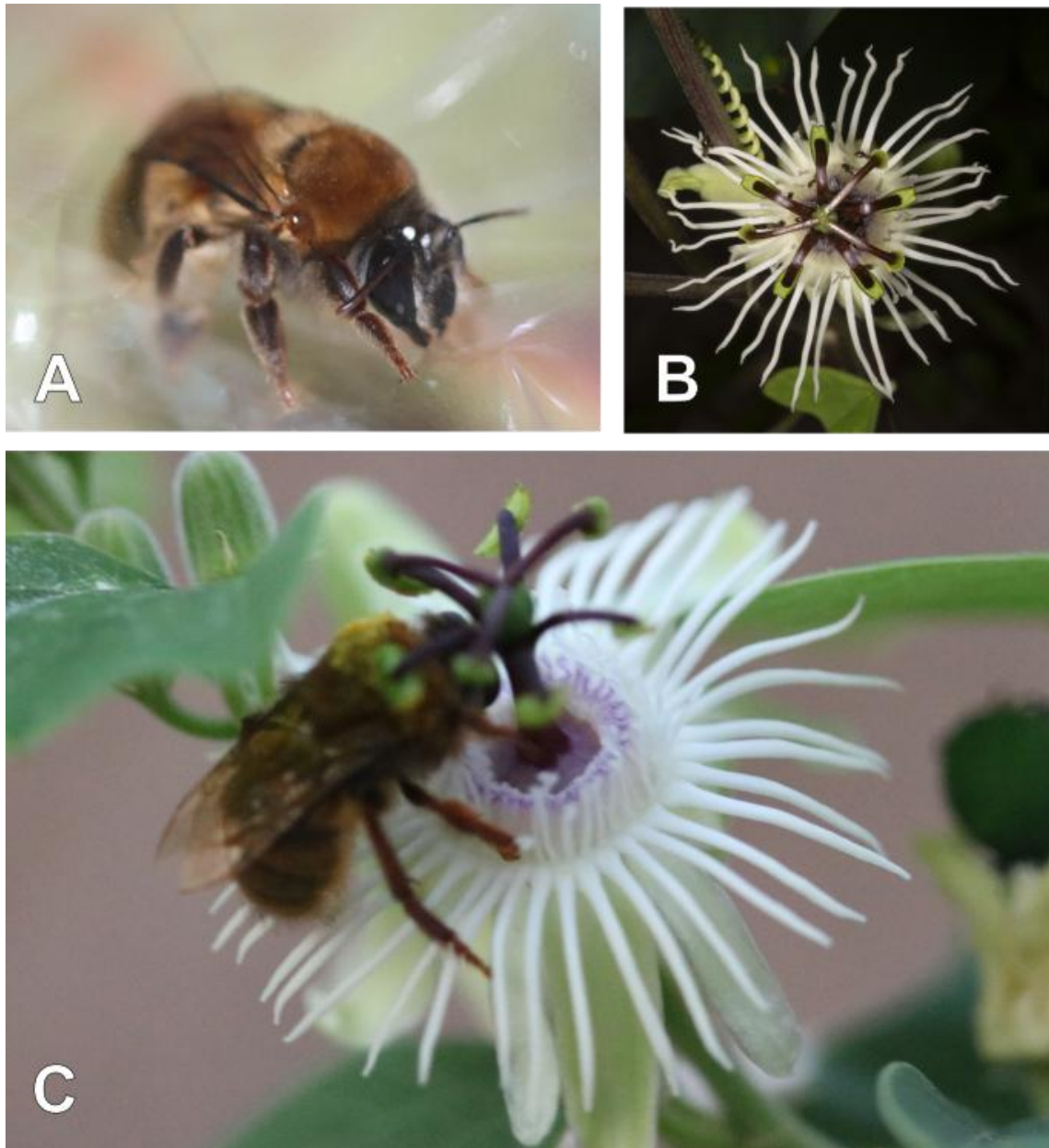


Figura 1: Sistema de polinização crepuscular entre *Passiflora pohlii* e a abelha *Ptiloglossa* sp. **(A)** A abelha polinizadora *Ptiloglossa* sp. **(B)** A flor de *Passiflora pohlii*. **(C)** Registro da interação biológica, com a abelha em contato com os estigmas e as anteras, garantindo a transferência de pólen.

2. CAPÍTULO 1: Emissão de Odor na *Passiflora pohlii* de Floração Crepuscular: Estrutura do Osmóforo e Voláteis Terpenoides

Submetido na revista **Annals of Botany**

Original Article

Scent rhythms in twilight-flowering *Passiflora pohlii*: osmophore structure and terpenoid volatiles

Angie Zuleidi Mayorquin¹, Elder Antônio Sousa Paiva^{2*}, Stefan Dötterl³, Reisle Oliveira⁴, Diogo Montes Vidal⁵, Clemens Schindwein²

¹ Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Laboratório Plebeia – Ecologia de Abelhas e da Polinização, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

² Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

³ Department of Environment & Biodiversity, Plant Ecology, University of Salzburg, Hellbrunnerstr. 34, 5020 Salzburg, Austria

⁴ Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

⁵ Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

* **Corresponding author:** epaiva@icb.ufmg.br

2.1. ABSTRACT

Background and Aims

Some plants release strong flower scents at night and are pollinated by nocturnal bees. So far, however, little is known about their quantitative temporal pattern of scent release, their scent composition, and the localization and ultrastructure of the scent-emitting tissues. Here, we use *Passiflora pohlii*, a passionflower species whose blossoms open at dawn, are pollinated by crepuscular *Ptiloglossa* bees, and emit an intense citrus-like floral scent to (i) localize and characterize the ultrastructure of osmophores (scent-emitting tissues), (ii) quantify the rhythm of volatile emissions, and (iii) identify the chemical composition of the floral scent, to understand better their role in synchronizing pollination within a restricted temporal window.

Methods

Osmophores were localized using morphochemical techniques and characterized via transmission electron microscopy (TEM). Volatile compounds were collected by dynamic headspace at early (dawn; complete and dissected flowers) and late (early morning; complete flowers) anthesis stage, and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Sequential ultrastructural analyses tracked subcellular changes correlated with scent emission.

Key Results

The outer corona filaments were identified as the primary site of scent emission, confirmed by diagnostic structural features (osmophores) and exhibiting significantly higher volatile emissions than other floral tissues. Scent emission peaked at dawn, temporally aligned with the activity of *Ptiloglossa* pollinators, before declining by 90% in late anthesis, despite unchanged floral turgor. TEM revealed organelle degradation, correlating with the decline in emission. The scent profile was dominated by monoterpenoids, primarily 'citronelloids' (geraniol and derivatives thereof).

Conclusions

We identify a coordinated system of structural, chemical, and temporal characteristics in a species of passionflower that appear to be tailored to the sensory characteristics, body size, and crepuscular flight activities of the pollinating *Ptiloglossa* bees.

Key-words: Crepuscular pollination, Floral volatiles, Osmophore ultrastructure, Terpenoid scent emission, *Passiflora*.

2.2. INTRODUCTION

The Passifloraceae family is renowned for its economic importance as fruit crops and ornamentals, as well as for the diversity of its floral shapes, colors, and scents. *Passiflora*, the most species-rich genus of the family, counts a total of 625 species, predominantly distributed in South America (Dhawan *et al.*, 2004). The flowers are pollinated by a variety of animals, including hummingbirds and bats, but the most common is pollination by bees (Koschnitzke and Sazima, 1997; Amela García and Hoc, 1998b; Franco and Gimenes, 2011).

Floral scent has been noted in various *Passiflora* species (Frankie and Vinson, 1977; Koschnitzke and Sazima, 1997; Amela García and Hoc, 1998a,b; Amela García, 1999; Aponte and Jáuregui, 2004). The floral odor is closely related to the type of pollinators that visit the plant. Red *Passiflora* flowers that bloom during the day and attract hummingbirds usually lack scent. In contrast, bee-pollinated and night-blooming bat flowers generally emit a strong scent (Varassin *et al.*, 2001). However, the floral scent composition has been published for only 19 species to date, five of which were found to be odorless (Lindberg *et al.*, 2000; Varassin *et al.*, 2001; Montero *et al.*, 2016; della Cuna *et al.*, 2018).

Floral scents are frequently produced in osmophores, which are scent glands that usually present a glandular epithelium and strata of glandular cells from the subjacent parenchyma (Vogel, 1963). Osmophores are commonly found in petals and are responsible for attracting potential pollinators (Teichert *et al.*, 2009; Marinho *et al.*, 2014; Tölke *et al.*, 2018). Sensory

analyses of some *Passiflora* species by dissection of flower parts, encapsulation in containers, and sensory analyses by the human nose suggest that the floral scents originate from the corona filaments (MacDougal, 1994; Varassin *et al.*, 2001).

The corona is a distinctive floral structure of Passifloraceae originating from the hypanthium and consisting of the operculum and rows of filaments (MacDougal, 1994; Hemingway *et al.*, 2011). In many cases, these filament rows are differentiated into an inner row of short, finer filaments. In contrast, the outer filaments are more robust and can vary in number according to the species. The outer filaments generally serve as landing platforms and attract pollinators (Krosnick *et al.*, 2013), whereas the inner filaments have no described function.

The comparison of the ultrastructure of the corona filaments of scented *Passiflora caerulea* with those of the scentless *P. suberosa* flowers revealed differences in the secretory cells of the outer corona filaments, which are presumed to produce odor in the scented species (Amela García *et al.*, 2007). In *P. caerulea*, these cells contain smooth endoplasmic reticulum and amyloplasts, features absent in the corresponding cells of *P. suberosa*. Such structural distinctions are believed to account for the contrasting scent-producing capabilities of the two species (Amela García *et al.*, 2007). The floral volatile compounds, however, were not analyzed in that study, which prevents comparison between the organelles and the types of compounds released.

Most known *Passiflora* species exhibit diurnal anthesis, synchronized with the activity of pollinators such as bees and hummingbirds. However, a small group displays nocturnal anthesis, being pollinated by bats (e.g., *P. mucronata* and *P. galbana*; Varassin *et al.*, 2001; della Cuna *et al.*, 2018) or sphingid moths (e.g., *P. penduliflora*; Kay, 2001). An even more singular strategy is observed in species with dawn flowering, such as *Passiflora pohlii* Mast. This climber exhibits small flowers that open by 0400 h and emit a pronounced citric scent (Faria and Stehmann, 2010), being exclusively pollinated by crepuscular bees of the genus *Ptiloglossa*. These bees gain a competitive advantage by foraging in near-absent competition, before the flight activity of diurnal bees (Kelber *et al.*, 2006; Wcislo and Tierney, 2009; Araújo *et al.*, 2022). Crepuscular bees exhibit visual adaptations for low-light flight (Warrant *et al.*,

2004; Araújo *et al.*, 2023) and usually use the strong floral scent emitted by the nocturnal/crepuscular flowers as olfactory guides (Carvalho *et al.*, 2012; Krug *et al.*, 2018; Araújo *et al.*, 2024). Thus, understanding how, when, and where floral scent is released in *P. pohlii* is crucial to elucidating its interaction with crepuscular bee pollinators.

In this study, we focus on *Passiflora pohlii*, a species of the subgenus *Decaloba*, the second-largest lineage within *Passiflora* with 230 species, including 20 representatives in Brazil (Krosnick *et al.*, 2013). As is characteristic of this subgenus, *P. pohlii* exhibits small flowers featuring a plicate membranous operculum, two whorls of coronal filaments, and white-purple coloration. Its distribution spans from Bolivia to west-central and southeastern Brazil, with annual flowering and short flower longevity (Faria and Stehmann, 2010; Milward-De-Azevedo *et al.*, 2012). We investigate the citric scent of *Passiflora pohlii* flowers by addressing the following questions: (i) where are the floral scents emitted? (ii) What is the morphology and cellular ultrastructure of the osmophores responsible for releasing the volatiles? (iii) What is the composition of the emitted volatile compounds? Moreover, (iv) when is the floral scent released? To address these questions, we conducted olfactory tests on different parts of the flower, performed light and transmission electron microscopy analysis on the floral tissues responsible for odor production, and used headspace and gas chromatography coupled with mass spectrometry to identify the volatiles at dawn and soon after sunrise.

2.3. MATERIALS AND METHODS

2.3.1. Sensory analysis

To identify the location of the odor-emitting parts of the flower, we dissected three flower buds into their constituent parts: sepals, petals, outer filaments, inner filaments, calyx tube (operculum and limen), and androgynophore. Each part was placed on an odorless polyester oven bag (40 cm, Wyda®) and covered with a drinking glass to accumulate the emitted odor for two hours, between 4:00 and 6:00 h, the period of strong scent emission by the flowers. Thereafter, the glasses were removed, and three individuals smelled each part to determine the odor-producing parts of the flower (see Paiva *et al.*, 2019).

2.3.2. Morphology and Histochemical analyses (light microscopy)

We collected flowers from three cultivated individuals of *P. pohlii* on the campus of the Federal University of Minas Gerais (UFMG, 19°52'5.628"S 43°57'59.904"W) and at the Museum of Natural History and Botanical Garden of UFMG (MHNJB, 19°53'31.632"S 43°54'47.984"W) (Figure 1C). From the three individuals, we selected three flowers per individual across the following flowering stages: i) pre-anthesis, about five hours before flower opening (2200 h), ii) Early anthesis: about two hours after flower opening, when strong smell is perceived (0530 h), and iii) Late anthesis: about five hours after flower opening when floral odor was weak (0800 h).

The flower buds and flowers were cut to obtain samples for transverse and longitudinal sections. Samples were fixed in Karnovsky fixative (Karnovsky, 1965) under a vacuum of -400 mmHg and then remaining in this fixative for 24 hours. Subsequently, the samples were dehydrated through a graded ethanol series and embedded in 2-hydroxyethyl methacrylate historesin (Leica Microsystems Inc., Heidelberg, Germany) in a freezer at -18 °C for 48 hours before polymerization, following the method described by Paiva et al. (2011).

Transverse and longitudinal sections (5µm thick) were obtained with a rotary microtome (Hyrax M40, Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany), stained with 0.05% toluidine blue pH 6.8 (O'Brien *et al.*, 1964), placed on slides, and mounted in synthetic resin Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). To detect starch and lipids, unstained sections were subjected to histochemical tests using Lugol (Johansen, 1940) and Sudan Red 7 B (Brundrett *et al.*, 1991), respectively. All sections were analyzed and documented using an image capturing system (TV0.5XC-3, Olympus Scientific Solutions, Waltham, USA) coupled to a light microscope (CX41RF, Olympus Scientific Solutions, Waltham, USA).

2.3.3. Ultrastructural analysis (TEM)

We conducted ultrastructural analysis in the outer corona filaments at the same three floral stages. Filament segments were cut into pieces measuring up to 1 mm in length. The

samples were fixed in Karnovsky fixative (pH 7.2, 0.1 M phosphate buffer) for 24 hours. The excess air was removed using a vacuum to improve fixative penetration. Following this, the samples underwent fixation in osmium tetroxide (1% in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2). Before embedding in epoxy resin, they were contrasted with a 2% aqueous solution of uranyl acetate and dehydrated in an increasing acetone series. The 50 nm ultrathin sections were contrasted with lead citrate (3% w/v, 5 min) and examined with a Tecnai-G12 Spirit Transmission Electron Microscope (TEM) (Philips/FEI Company, Eindhoven, The Netherlands) at 80 kV (Robards, 1978).

2.3.4. Surface structure analysis (SEM)

The surfaces of the inner and outer filaments were analyzed using a scanning electron microscope (SEM) (Quanta 200 electron microscope, FEI Company, Eindhoven, The Netherlands). The filaments were fixed in Karnovsky's solution for 24 hours and then placed in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. They were dehydrated in an increasing ethanol series, subjected to critical point drying, and coated with gold-palladium (Robards, 1978).

2.3.5. Headspace analysis of floral volatiles

To determine the floral volatiles and quantify the intensity of floral scent emission during anthesis, we performed dynamic headspace sampling on flowers from three *P. pohlii* individuals at early anthesis (0530 to 0730 h, four flowers in total) and late anthesis (0800 to 1000 h, three flowers in total). To determine whether the outer filaments were the primary source of odor, as suggested by the previous sensory test, volatile compounds were collected separately from dissected outer filaments and residual floral tissues (flowers minus outer filaments) during early anthesis (n = 3 in total). *P. pohlii* leaves were used as a control, and volatiles emitted by them were excluded from our analysis.

The headspace analysis was conducted by placing each sample into an odorless polyester oven bag (40 cm in length, Wyda®), and sampling using a vacuum pump (G12/01 EB; Rietschle Thomas, Puchheim, Germany) with an airflow rate set at 200 ml/min, regulated

by a flow meter. A glass trap (30 mm in length and 3 mm in internal diameter) filled with a filter comprising glass fiber and HayeSep Porous Polymer Adsorbent (10 mg, particle size 100-120 mesh) was used to capture the volatile compounds from the samples.

The capillary, housing the filter with the volatiles, was eluted with 200 μ L of solvent (acetone or hexane, HPLC grade, $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich). The samples were stored at -4°C until analyzed by GC-MS (Shimadzu GC2010 gas chromatograph coupled to a Shimadzu QP2010 Plus mass spectrometer (EI) using a RTX-5 capillary column -Restek, PA, USA; $30\text{ m} \times 0.25\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$). The temperature gradient program started at 50°C and was maintained for 1 minute, with a temperature increase of 7°C per minute until a temperature of 270°C was reached.

The chemical structure of volatile compounds was identified using GC-MS Solutions software (version 4.20) and compared with data from mass spectra and retention index libraries in GC-MS databases (FFNSC, NIST) and literature sources (NIST Chemistry Book on the Web, Scifinder). For quantification, β -pinene at 100 ppm was used as a reference standard.

To determine whether there were differences in the quantitative analyses (absolute amount of the compound) of the odor emitted between the early and late phases of anthesis, a PERMANOVA analysis was conducted in R v4.5.0 (R Core Team, 2025) using the *vegan* package and the *adonis2* function (999 permutations) (Anderson, 2017).

2.3.6. Comparative analysis of floral volatiles in *Passiflora*

To contextualize the floral scent profile of *P. pohlii* within the genus *Passiflora*, we conducted a comparative analysis of floral volatile organic compounds using 92 scent profiles from 79 species, compiled from seven studies (Lindberg *et al.*, 2000: 8 species; Varassin *et al.*, 2001: 3 species; Cutri, 2013: 3 species; Shen, 2013: 1 species; Montero *et al.*, 2016: 5 species; PhD thesis, Clifford, 2017: 70 species; Della Cuna *et al.*, 2018: 1 species; Supplementary Table 1). Profiles were included only if they met three criteria: (1) whole-flower headspace collection;

(2) quantitative reporting of absolute or relative abundances (%); and (3) compound identification via gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Following data extraction, rare compounds (<2% relative abundance in all samples) were excluded, retaining 318 compounds for analysis. These were classified into 43 functional-structural categories based on carbon skeleton and dominant functional groups (Supplementary Table 2). Relative abundances were transformed using centered log-ratio (CLR) to address compositional bias (Aitchison, 1982). Floral chemical dissimilarity was quantified via Euclidean distance on CLR-transformed data. Hierarchical clustering was performed using Ward's algorithm (ward.D2). All analyses were performed in R v4.5.0 (R Core Team, 2025) using the packages: *compositions*/CLR transformation (van den Boogaart *et al.*, 2024), *dplyr*/data handling (Wickham *et al.*, 2023), *factoextra*/visualization (Kassambara and Mundt, 2020), and *pvclust*/bootstrap validation (Suzuki *et al.*, 2019).

2.4. RESULTS

2.4.1. Flower structure

The flowers of *P. pohlii* range from 2.5 to 4.5 cm in diameter. The corona consists of the operculum, inner filaments, which are short white filaments with capitate tips parallel to the androgynophore, and outer filaments, also white but larger than the inner filaments and perpendicular to the androgynophore (Figure 1A-B).

2.4.2. Sensory analysis

The sensory analysis indicated that the outer filaments of the corona emitted the distinctive citric aroma that is typical of the entire flower. This odor contrasted with all other flower parts, which exhibited either a minimal scent or whose scent was entirely undetectable to human olfaction.

2.4.3. Structure and histochemical analyses

The outer filaments of *P. pohlii* exhibited an oval cross-section and contained a prominent central vascular bundle that extended longitudinally along the entire filament length. Notably, this vascular tissue showed no lateral branching or projections into the surrounding cortical parenchyma (Figure 1C-D). In the pre-anthesis stage, there was a noticeable accumulation of amyloplasts in the outer portion of the cortex, formed by secretory parenchyma cells (Figure 1C-D). Along the filament, in the acropetal direction, we observed an increase in potentially secretory cells in the cortex. In the basal and median portions, only the outer cortex is composed of cells with dense cytoplasm (see Figure 1D). In contrast, in the apical portion, the cortex is entirely formed by secretory parenchyma cells (Figure 1C, 1E).

During the early anthesis phase, the Lugol test, used to detect starch, showed a positive result, evidencing a large quantity of starch throughout the cortex of the apical portion of the outer filament (Figure 1F). However, in the basal portion of the filament, the presence of starch was notably lower, in addition to being restricted to the most external cortical portions (Figure 1G). Another interesting aspect regarding starch reserves is that, in the late anthesis phase, the Lugol test yielded a negative result, indicating the absence of starch in the filaments at this stage.

Across all observed phases (Figure 1C - F), the epidermal cells of the outer filaments maintained a consistent structure with a notably larger central vacuole than the subjacent parenchyma. Moreover, both the epidermal and subjacent parenchyma cells displayed well-developed nuclei.

2.4.4. Ultrastructural analysis of the outer filaments

Pre-anthesis. At this stage, ultrastructural analysis of the outer filaments revealed epidermal cells with a wavy cuticle firmly attached to the cell wall. They exhibited a larger central vacuole when compared to those of the subjacent parenchyma, resembling what is seen in light microscopy. Additionally, the epidermal cells were found to be nucleated, contain plastids, numerous mitochondria, and a few oil droplets (Figure 2A-B).

The subjacent secretory parenchyma cells showed some oil droplets and several plastids containing starch grains. These plastids, in addition to containing large starch grains, are distinguished by their dense stroma and an internal membrane system that forms slightly dilated thylakoids in the peripheral portion (Figure 2C-D).

Early anthesis. The epidermal cells maintained a larger central vacuole than the subjacent parenchyma cells. The epidermal cells were characterized by abundant mitochondria, a higher concentration of oil droplets in comparison to pre-anthesis, and a uniformly distributed SER within the dense layer of extravacuolar cytoplasm (Figure 3A-B).

The subjacent parenchyma cells exhibited plastids and mitochondria as predominant organelles. A marked reduction in the number of starch grains was observed in the plastids; in most of them, the starch was reduced to a shapeless and fibrillar mass (Figure 3C). There was an increase in the size of the central vacuole, the presence of some plastids devoid of starch, and an increase in the amount of oil droplets compared to the previous stage. The presence of small vacuoles containing amorphous material, similar to that observed in plastids, was striking, with some cases showing a remarkable similarity between plastids and the vacuoles (Figure 3D). The plasma membrane of many subepidermal cells showed conspicuous sinuosities, suggesting the storage of substances in a periplasmic space (Figure 3D-E).

In the vascular bundle, a standard structure was observed, with the xylem presenting few vessel elements, characteristically devoid of any sign of organic material (Figure 3F-G). In the phloem, the ordinary companion cells had dense cytoplasm; the sieve tube elements had slightly dense and vesiculated cytoplasm, in which the presence of amorphous material with a fibrillar appearance was notable (Figure 3F-G).

Late anthesis. In this final stage of anthesis, the epidermal cells lacked the oil droplets present in the previous stages and contained only a small amount of amyloplasts with small starch granules (Figure 4A). The plasma membrane appeared sinuous, creating a conspicuous periplasmic space, in which amorphous material was observed (Figure 4 A-B). This amorphous material present in the periplasmic space was also observed in the large central vacuole, which at this stage occupies almost the entire protoplast, leaving only a thin layer of extravacuolar

cytoplasm (Figure 4A). Within the subjacent parenchyma, the presence of plastids with remnants of hydrolyzed starch is still a striking feature (Figure 4C-D). Mitochondria and rare segments of endoplasmic reticulum, in addition to the large central vacuole, complete the set of most representative organelles in this phase. The xylem presents vessel elements that, although already differentiated and dead, are filled with substances exhibiting an amorphous or fibrillar aspect (Figure 4E), whereas in the phloem, the cells retain the same characteristics observed in the previous phase (Figure 4F).

2.4.5. Surface structure analysis

The images obtained through scanning microscopy revealed that the epidermal cells of the outer filament of *P. pohlii* were voluminous, projecting onto the surface with a globular appearance, giving the surface a rough appearance (Figure 5A-B). Additionally, the cuticle of these cells displayed undulations, significantly increasing the overall surface area of the cuticle (Figure 5C). The images of the inner filaments revealed the capitate tips of these filaments (Figure 5D), differing from the pointed tips of the outer filaments. The epidermal cells of the inner filaments (Figure 5E) were less pronounced compared to those of the outer filaments. However, the cuticle of inner filaments showed undulations, similar to those of outer filaments; the undulations of inner filaments were less homogeneous than those of outer filaments (Figure 5F).

2.4.6. Floral volatiles at early anthesis of complete flowers

The floral scent of *P. pohlii* contained a total of 9 terpenoid compounds. Thereof, five compounds contributed together to almost 93% of the total scent: β -citronellol (37%), geranial (36%), geranyl acetate (9%), geraniol (6%), and neral (5%) (Table 1).

2.4.7. Schedule of odor emission

The flower of *Passiflora pohlii* began to open around 0330 h and was fully open by 0400 h; however, it did not emit any noticeable scent for the human nose. The scent emission

started around 0515 h. Our findings indicate that the flowers emitted a significantly stronger scent during early anthesis (0530 h to 0730 h; twilight hours) compared to late anthesis (0800 h to 1000 h; daylight) (Table 1). The total scent emission exhibited an approximate 89.96% reduction ($\pm 54.12\%$) following dawn (Figure 6A), despite the flower maintaining full turgidity. Notably, the relative compositional profile of volatile compounds remained largely consistent between these two phases, as evidenced by a strong positive correlation (Pearson's $r = 0.86$). Flower wilting started around noon, with the petals and sepals bending forward. The total value of volatile compounds released during the two stages was significantly different (PERMANOVA, $F = 6.5907$, $p = 0.041$).

2.4.8. Floral scent emission in outer filaments and in flowers with these filaments removed

Headspace analysis of dissected outer coronal filaments in *P. pohlii* (Table 2) revealed terpenoid profiles similar to whole-flower volatile emissions (Table 1). Experimental removal of these filaments reduced total scent emission to residual levels; only four volatile compounds (collectively representing 2% of the outer filaments' emission) were detected in one of three replicate samples (Figure 6B). No volatiles were detected in the other two biological replicates.

2.5. DISCUSSION

The study demonstrated that odor production in *Passiflora pohlii* flowers occurs along the outer filaments of the corona, with the highest intensity to the human nose at the tips. No evidence of odor production was found in the inner filaments. The osmophores form a fragrant ring surrounding the center of the flower, with their secretory cells containing starch and dense cytoplasm, characteristics typical of odor-producing tissues. Quantitative chemical analysis of the floral scent confirmed that volatile emission is restricted to the outer filaments and occurs only for a brief period during the early morning twilight until sunrise, when odor release rapidly declines. However, the flower remains turgid until early afternoon. The floral scent is primarily composed of terpenoids, which account for approximately 97% of the emitted volatiles.

2.5.1. Ultrastructure of osmophores

The *P. pohlii* osmophore exhibits a simple structure, a glandular epithelium overlying a few secretory parenchyma layers. The papillose epidermal cells, a feature consistent with volatile-secreting tissues across other angiosperm species (Sazima *et al.*, 1993; Vogel and Hadacek, 2004; Melo *et al.*, 2010; Gonçalves-Souza *et al.*, 2017), confirm its identity as an osmophore.

The high cytoplasmic density and abundant organelles in the outer filament cortical region indicate active secretory function (Paiva *et al.*, 2021; Tölke *et al.*, 2018). This structural feature joins with two key osmophore features, the accumulation of starch in secretory cells (Pansarin *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2010; Tölke *et al.*, 2018) and vacuolar dynamics characterized by volume expansion and flocculent deposits during secretion, a pattern also documented in osmophores of some Anacardiaceae species (Tölke *et al.*, 2018).

During late anthesis in *P. pohlii*, small vacuoles containing hydrolyzed starch-like material form through plastid-to-vacuole conversion, retaining remnants of degraded starch. These dynamics of organelle interactions and vacuole biogenesis have been documented in nectaries (Peng *et al.*, 2004; Guimarães *et al.*, 2016; Paiva *et al.*, 2021) as well as in osmophores (Gonçalves-Souza *et al.*, 2017) and demonstrate both organellar plasticity and the critical role of starch as an energy source for osmophore metabolism during volatile release, with residual material persisting post-secretion.

Concurrently, the amorphous material observed within vessel elements resembles soluble carbohydrates, suggesting apoplastic translocation of sugars derived from starch hydrolysis or directly from the sieve cells. This observation provides a plausible explanation for the presence of sugar within xylem vessels. Furthermore, the central vascular bundle of the outer filament lacks projections toward secretory cells, and the osmophore secretory tissue itself is non-vascularized, which reinforces the hypothesis of sugar apoplastic transport. Collectively, this evidence supports the high energy demand of the secretory process commonly associated with osmophores (Gonçalves-Souza *et al.*, 2017). Therefore, it seems coherent to provide substantial sugar during volatile release, whether for active substance transport, mitochondria-

linked energy production, or even for biosynthetic processes. Lipid droplets, presumably containing terpenes, were observed from pre-anthesis onward. Although plastids and endoplasmic reticulum typically mediate terpene synthesis (Langenheim, 2003; Rodrigues *et al.*, 2011; Sadala-Castilho *et al.*, 2016), we detected no evidence of synthesis activity during the studied phases. Thus, the cellular structure suggests that the detected terpenes were synthesized earlier, during bud development.

2.5.2. Odor localization

In *Passiflora pohlii*, odor production is a distinctive characteristic, confirmed by both quantitative and ultrastructural analyses to occur exclusively within the outer filaments of the corona (Figure 6B). This specific localization has also been reported in other *Passiflora* species (MacDougal, 1994; Amela García, 1999; Amela García *et al.*, 2007). While the rest of the *P. pohlii* flower, including the inner filaments, is virtually scentless, some studies report odor emission from other floral parts, in particular *Passiflora* species (MacDougal, 1994; Amela García and Hoc, 1998a,b; Amela García, 1999). However, these reports are based exclusively on subjective sensory analyses, classifying odor only as mild or intense based on human perception, and lack confirmatory analytical evidence. Critically, despite species-specific variations in reported scent locations, the outer filaments consistently emit scent in all fragrant *Passiflora* species identified.

Positioned at the flower's periphery, the secretory-active tips of the outer filaments facilitate the dispersion of volatiles through wind exposure and mobility. Their rough surface and elaborate cuticular ornamentation further enhance volatilization by maximizing surface area. Crucially, these filaments form a continuous osmophore ring encircling the nectary, creating an annular olfactory guide that enables pollinating bees to locate nectar at a fixed centripetal distance, a mechanism convergent with *Antirrhinum majus*, where petal-pollinator contact zones exhibit peak volatile emission (Kolossova *et al.*, 2001). Complementing this olfactory ring, a radial visual nectar guide formed by purple tips on the pleated operculum contrasts with the white filaments, serving as an attractive cue for bees (Chittka and Raine, 2006) and potentially directing them toward the central nectary, the primary floral resource sought by *Ptiloglossa* bees in these flowers (Mayorquin, Schlindwein, unpublished data).

2.5.3. Scent emission is restricted at dawn.

Our scent analyses of *Passiflora pohlii* revealed that floral volatiles are primarily emitted during the early phase of anthesis, which occurs in this species at dawn. Shortly after sunrise, the concentration of floral scent dropped by approximately 90% ($\pm 54\%$), while the overall composition of volatiles remained largely unchanged (positive correlation, Pearson's $r = 0.860$). Despite remaining fully turgid during daylight, the flowers emit little to no scent.

In *P. pohlii*, the effective pollinating *Ptiloglossa* bees visit the flowers only at dawn (Faria and Stehmann, 2010). This visiting pattern indicates a strong synchronization between scent emission and the flight activity of crepuscular bee pollinators. Floral scent emission, adjusted to the time of pollinator activity, has been repeatedly demonstrated in several pollination systems (Dudareva *et al.*, 2000; Raguso, 2008; Wright and Schiestl, 2009).

Our ultrastructural analysis supports these findings by revealing the cellular changes associated with volatile production. During the pre-anthesis stage, the outer filaments exhibited a high accumulation of starch and a dense stroma, indicating intense metabolic activity. These energy reserves are likely mobilized during anthesis for volatile biosynthesis and emission. During early anthesis, when scent release peaks, we observed an increase in vesicles and membrane undulations, which likely facilitate the transport of volatiles toward the cell walls for emission.

By late anthesis, the disappearance of oil droplets and amyloplasts, previously present in earlier stages, indicates that volatile release had been completed. This simultaneous depletion of different types of reserves supports the hypothesis that *P. pohlii* optimizes scent emission by concentrating it within a short time window, precisely when pollinators are active.

The success of plant-pollinator communication depends on several factors, among which the precise timing of signal presentation plays a crucial role (Raguso, 2008), which is particularly important for *Passiflora pohlii*, given the short activity window of its crepuscular pollinators. This strategy likely optimizes pollination efficiency by ensuring that scent emission

coincides precisely with pollinator activity, thereby increasing the probability of successful pollen transfer.

2.5.4. Floral Scent Composition

The floral scent of *P. pohlii* is dominated by acyclic monoterpenes, including citronellol, geraniol, geranial, and neral, collectively termed 'citronelloids' (Bergman *et al.*, 2023). These citronelloids originate from geraniol (an alcoholic monoterpene), which undergoes enzymatic transformations to generate other volatile components. For instance, oxidation of geraniol yields geranial (an aldehydic monoterpene), while reduction of one of its double bonds produces citronellol (an alcoholic monoterpene). Subsequent biochemical transformations yield other compounds, such as neral and geranyl acetate, which are present in lower proportions within *P. pohlii*'s scent (Bergman *et al.*, 2023). A key differentiating feature of *P. pohlii* is its metabolic branching from geraniol. This results in a unique volatile profile dominated by monoterpenes (exceeding 90%), primarily alcohols and aldehydes, characteristics rarely seen in other *Passiflora* species (Figure 7).

P. pohlii and *P. misera* clustered closely in the cluster analysis (Figure 7), reflecting the similarity in the composition of volatile compound types present in their floral scents. Beyond this chemical resemblance, these two species are also phylogenetically close, belonging to the same subgenus (*Decaloba*) and the same clade (SA8), which exhibits the broadest geographical distribution among the *Decaloba* groups (Acha *et al.*, 2021). Their floral appearance is highly similar, characterized by predominantly white-colored flowers, and bees of the genus *Ptiloglossa* pollinate both. In the case of *P. misera*, anthesis was described as 'mainly early and short / dawn-sunset' (Amela García and Hoc, 2001), which we interpret as being very similar to the anthesis pattern observed in *P. pohlii* in this study. Collectively, this evidence suggests that *P. pohlii* and *P. misera* share not only chemical and morphological characteristics, but also convergent ecological strategies aimed at attracting specific pollinators within a restricted time of day. This pattern appears to extend to other species within *Decaloba*, as evidenced by *P. biflora*, which shares similar chemical characteristics and coloration, reinforcing the hypothesis of a common evolutionary pattern.

Besides *P. misera*, the species with chemical profiles similar to *P. pohlii* (Figure 7, red names) exhibit bee-pollinated flowers that are diurnal and brightly colored. On average, these species contain 70% alcoholic-, aldehydic-, and ester-type monoterpenes, compounds that are rarely found as major constituents in other *Passiflora* species (Figure 7). In contrast, groups with nocturnal pollinators, such as bats, do not exhibit these compound types as their predominant types; instead, they display aromatic compounds as their main constituents (Figure 7).

In summary, the data indicate that this distinct scent chemistry is a unique, specialized feature of a small clade (10 species) within *Passiflora*, representing a specific chemical strategy for bee pollination that is not common across the genus.

2.6. Conclusion

Odor emission in *P. pohlii* is spatially restricted to a specific floral part (the outer filaments) and temporally optimized to dawn. This process is sustained by starch-derived energy reserves and dominated by geraniol-derived monoterpenes. This strategy, combined with olfactory guides and likely visual cues (white coloration), reflects an evolutionary adaptation to pollination by crepuscular bees. However, behavioral bioassays are essential to confirm whether these 'citronelloids' function as effective chemical attractants for *Ptiloglossa*. So far, these bees have previously only been shown to respond to benzenoids/phenylpropanoids (e.g., 2-phenylethanol), fatty acid derivatives (1-octanol), and mixtures containing such compounds together with non- 'citronelloid' terpenes (e.g., linalool) (Martínez-Martínez *et al.*, 2021). The chemical and ecological convergence with *P. misera* and other *Decaloba* species suggests an evolutionary pattern where 'citronelloid' synthesis emerges as a metabolic innovation for efficient pollinator attraction within restricted temporal windows.

Funding

This study was financed by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Universal APQ-00713-17); personal research grants are acknowledged to

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais [Grant number 14923 to A.Z.M]; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) [Grant number 88887.663151/2022-00]; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [grant number 307353/2021–4 to E.A.S.P. and 314829-2021-0 to C.S.].

Acknowledgements

We thank the ‘Centro de Microscopia – UFMG’ (CM-UFMG; Belo Horizonte, Brazil) for their support and facilities. We are also grateful to the Graduate Program in Zoology (PPGZoo) of UFMG. We thank Adriano Valentin for his mentorship, Graziella Oliveira (undergraduate research assistant) for preparing the light microscopy sections, and the team at the Natural History Museum for their technical support in cultivating the *Passiflora pohlii* seedlings.

2.7. REFERENCES

Acha S, Linan A, MacDougal J, Edwards C. 2021. The evolutionary history of vines in a neotropical biodiversity hotspot: Phylogenomics and biogeography of a large passion flower clade (*Passiflora* section Decaloba). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **164**: 107260. DOI: 10.1016/j.ympev.2021.107260

Aitchison J. 1982. The Statistical Analysis of Compositional Data. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* **44**: 139–160. DOI: 10.1111/j.2517-6161.1982.tb01195.x

Amela García MT. 1999. Biología floral y sistema reproductivo de especies nativas de *Passiflora* (Passifloraceae) de la Argentina. PhD Thesis, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Amela García MT, Galati BG, Hoc PS. 2007. Ultrastructure of the corona of scented and scentless flowers of *Passiflora* spp. (Passifloraceae). *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **202**: 302–315. DOI: 10.1016/j.flora.2006.08.003

Amela García MT, Hoc PS. 1998a. Floral biology and reproductive system of *Passiflora mooreana* (Passifloraceae). *Darwiniana* **35**: 9–27.

Amela García MT, Hoc PS. 1998b. Biología floral de *Passiflora foetida* (Passifloraceae). *Revista de Biología Tropical* **46**: 191–202.

- Amela García MT, Hoc PS. 2001.** Pollination of *Passiflora*: Do different pollinators serve species belonging to different subgenera? *Acta Horticulturae* **561**: 71–74. DOI: 10.17660/ActaHortic.2001.561.10
- Anderson MJ. 2017.** Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) In: *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*. John Wiley & Sons, Ltd, 1–15.
- Aponte Y, Jáuregui D. 2004.** Algunos aspectos de la biología floral de *Passiflora cincinnata* Mast. *Revista de la Facultad de Agronomía* **21**: 211–220.
- Araújo P, Caetano CA, Schlindwein C, Alves-Dos-Santos I, Mota T. 2023.** Body size and the architecture of the visual system in crepuscular and diurnal bees. *Biological Journal of the Linnean Society* **138**: 328–340. DOI: 10.1093/biolinnean/blac154
- Araújo P, Araujo FF, Mota T, Schlindwein C. 2022.** The advantages of being crepuscular for bees: major pollen gain under low competition during the brief twilight period. *Biological Journal of the Linnean Society* **135**: 251–264. DOI: 10.1093/biolinnean/blab137
- Araújo P, Araujo FF, Vidal D, Mota T, Schlindwein C. 2024.** The role of visual and olfactory floral cues in twilight foraging by *Ptiloglossa* and *Xylocopa* bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **78(2)**, 25. doi.org/10.1007/s00265-024-03441-y
- Bergman ME, Franks AE, Phillips MA. 2023.** Biosynthesis, natural distribution, and biological activities of acyclic monoterpenes and their derivatives. *Phytochemistry Reviews* **22**: 361–384. DOI: 10.1007/s11101-022-09849-6
- van den Boogaart KG, Tolosana-Delgado R, Bren M. 2024.** *compositions: Compositional Data Analysis*. R package version 2.0-8. DOI: 10.32614/CRAN.package.compositions
- Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA. 1991.** Efficient Lipid Staining in Plant Material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in Polyethylene Glycol-Glycerol. *Biotechnic & Histochemistry* **66**: 111–116. DOI: 10.3109/10520299109110562
- Carvalho AT, Maia ACD, Ojima PY, Santos AA, Schlindwein C. 2012.** Nocturnal Bees are Attracted by Widespread Floral Scents. *Journal of Chemical Ecology* **38(3)**, 315–318. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0084-z>
- Chittka L, Raine NE. 2006.** Recognition of flowers by pollinators. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 428–435. DOI: 10.1016/j.pbi.2006.05.002
- Clifford MR. 2017.** Scents and Sense Ability: The evolution and role of chemical cues in the pollination and herbivory of *Passiflora*. PhD Thesis, University of Washington, Washington, United States.
- della Cuna FSR, Calevo J, Giovannini A, Boselli C, Tava A. 2018.** Characterization of the Essential oil of the Bat-Pollinated *Passiflora mucronata*. *Natural Product Communications* **13**: 1934578X1801301236. DOI: 10.1177/1934578X1801301236

Cutri L. 2013. O aroma das flores de *Passiflora* spp na atração de polinizadores: uma abordagem bioquímica e molecular. PhD Thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.

Dhawan K, Dhawan S, Sharma A. 2004. Passiflora: a review update. *Journal of Ethnopharmacology* **94**: 1–23. DOI: 10.1016/j.jep.2004.02.023

Dudareva N, Murfitt LM, Mann CJ, Gorenstein N, Kolosova N, Kish CM, Bonham C, Wood K. 2000. Developmental Regulation of Methyl Benzoate Biosynthesis and Emission in Snapdragon Flowers. *The Plant Cell* **12**: 949–961. DOI: 10.1105/tpc.12.6.949

Faria FS, Stehmann JR. 2010. Biologia reprodutiva de *Passiflora capsularis* L. e *P. pohlii* Mast. (Decaloba, Passifloraceae). *Acta Botanica Brasilica* **24**: 262–269. DOI: 10.1590/S0102-33062010000100028

Franco EL, Gimenes M. 2011. Pollination of *Cambessedesia wurdackii* in Brazilian campo rupestre vegetation, with special reference to crepuscular bees. *Journal of Insect Science* **11**: 97. DOI: 10.1673/031.011.9701

Frankie GW, Vinson SB. 1977. Scent Marking of Passion Flowers in Texas by Females of *Xylocopa virginica texana* (Hymenoptera: Anthophoridae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **50**: 613–625.

Gonçalves-Souza P, Schlindwein C, Dötterl S, Paiva EAS. 2017. Unveiling the osmophores of *Philodendron adamantinum* (Araceae) as a means to understanding interactions with pollinators. *Annals of Botany* **119**: 533–543. DOI: 10.1093/aob/mcw236

Guimarães E, Nogueira A, Machado SR. 2016. Floral nectar production and nectary structure of a bee-pollinated shrub from Neotropical savanna. *Plant Biology* **18**: 26–36. DOI: 10.1111/plb.12370

Hemingway CA, Christensen AR, Malcomber ST. 2011. B- and C-class gene expression during corona development of the blue passionflower (*Passiflora caerulea*, Passifloraceae). *American Journal of Botany* **98**: 923–934. DOI: 10.3732/ajb.1100026

Johansen DA. 1940. *Plant Microtechnique*.

Karnovsky M. 1965. A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy. *The Journal of Cell Biology* **27**: 1A-149A.

Kassambara A, Mundt F. 2020. *factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses*. R package version 1.0.7. DOI: 10.32614/CRAN.package.factoextra

Kay E. 2001. Observations on the Pollination of *Passiflora penduliflora*. *Biotropica* **33**: 709–713.

Kelber A, Warrant EJ, Pfaff M, et al. Raguso RA. 2006. Light intensity limits foraging activity in nocturnal and crepuscular bees. *Behavioral Ecology* **17**: 63–72. DOI: 10.1093/beheco/arj001

Koschnitzke C, Sazima M. 1997. Biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em mata semidecídua. *Brazilian Journal of Botany* **20**: 119–126. DOI: 10.1590/S0100-84041997000200002

Kolosova N, Sherman D, Karlson D, Dudareva N. 2001. Cellular and Subcellular Localization of S-Adenosyl-L-Methionine:Benzoic Acid Carboxyl Methyltransferase, the Enzyme Responsible for Biosynthesis of the Volatile Ester Methylbenzoate in Snapdragon Flowers. *Plant Physiology* **126**: 956–964. DOI: 10.1104/pp.126.3.956

Krosnick SE, Porter-Utley KE, MacDougal JM, Jørgensen PM, McDade LA. 2013. New Insights into the Evolution of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae): Phylogenetic Relationships and Morphological Synapomorphies. *Systematic Botany* **38**: 692–713. DOI: 10.1600/036364413X670359

Krug C, Cordeiro GD, Schäffler I, Silva CI, Oliveira R, Schlindwein C, Dötterl S, Alves-dos-Santos I. 2018. Nocturnal bee pollinators are attracted to Guarana flowers by their scents. *Frontiers in Plant Science* **9**. DOI: [10.3389/fpls.2018.01072](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01072)

Langenheim JH. 2003. *Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany*. Timber Press.

Lindberg AB, Knudsen JT, Olesen JM. 2000. Independence of floral morphology and scent chemistry as trait groups in a set of *Passiflora* species. *The Scandinavian Association for Pollination Ecology honours Knut Fægri*. **39**: 91–111.

MacDougal JM. 1994. Revision of *Passiflora* Subgenus *Decaloba* Section *Pseudodysosmia* (Passifloraceae). *Systematic Botany Monographs* **41**: 1–146. DOI: 10.2307/25027834

Marinho CR, Souza CD, Barros TC, Teixeira SP. 2014. Scent glands in legume flowers. *Plant Biology* **16**: 215–226. DOI: 10.1111/plb.12000

Martínez-Martínez CA, Cordeiro GD, Martins HOJ, Kobal ROAC, Milet-Pinheiro P, Stanton MA, Franco EL, Krug C, Mateus S, Schlindwein C, Dötterl S, Alves-dos-Santos I. 2021. Floral volatiles: a promising method to access the rare nocturnal and crepuscular bees. *Frontiers in Ecology and Evolution* **9**: 676743. DOI: 10.3389/fevo.2021.676743

Melo MC, Borba EL, Paiva EAS. 2010. Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution* **286**: 141–151. DOI: 10.1007/s00606-010-0294-1

Milward-De-Azevedo MA, Baumgratz JFA, Gonçalves-Esteves V. 2012. A taxonomic revision of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae) in Brazil. *Phytotaxa* **53**: 1. DOI: 10.11646/phytotaxa.53.1.1

Montero DAV, Marques MOM, Meletti LMM, Kampen MHV, Polozzi SC. 2016. Floral scent of Brazilian *Passiflora*: five species analysed by dynamic headspace. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **88**: 1191–1200. DOI: 10.1590/0001-3765201620150285

O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368–373. DOI: 10.1007/BF01248568

Paiva ÉAS, Ballego-Campos I, Gibernau M. 2021. True nectar or stigmatic secretion? Structural evidence elucidates an old controversy regarding nectaries in *Anthurium*. *American Journal of Botany* **108**: 37–50. DOI: 10.1002/ajb2.1595

Paiva EAS, Dötterl S, De-Paula OC, et al. 2019. Osmophores of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): a particular structure of the androecium that releases an unusual scent. *Protoplasma* **256**: 971–981. DOI: 10.1007/s00709-019-01356-4

Paiva EAS, Pinho SZD, Oliveira DMT. 2011. Large Plant Samples: How to Process for GMA Embedding? In: *Methods in Molecular Biology. Light Microscopy: methods and protocols*. New York: Springer/Humana Press, 37–49.

Pansarin LM, Castro MM, Sazima M. 2009. Osmophore and elaiophores of *Grobya amherstiae* (Catasetinae, Orchidaceae) and their relation to pollination. *Botanical Journal of the Linnean Society* **159**: 408–415. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2009.00953.x

Peng Y-B, Li Y-Q, Hao Y-J, Xu Z-H, Bai S-N. 2004. Nectar production and transportation in the nectaries of the female *Cucumis sativus* L. flower during anthesis. *Protoplasma* **224**: 71–78. DOI: 10.1007/s00709-004-0051-9

R Core Team. 2025. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>

Raguso RA. 2008. Wake Up and Smell the Roses: The Ecology and Evolution of Floral Scent. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **39**: 549–569. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095601

Robards AW. 1978. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. *Hall JL (ed) Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*: 343–403.

Rodrigues TM, Teixeira SP, Machado SR. 2011. The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae–Caesalpinioideae). *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **206**: 585–594. DOI: 10.1016/j.flora.2010.10.002

- Sadala-Castilho R, Machado SR, Sá-Haiad B, Lima HA. 2016.** Oil-resin glands in Velloziaceae flowers: structure, ontogenesis and secretion. *Plant Systematics and Evolution* **302**: 585–599. DOI: 10.1007/s00606-016-1287-5
- Sazima M, Vogel S, Cocucci A, Hausner G. 1993.** The perfume flowers of *Cyphomandra* (Solanaceae): Pollination by euglossine bees, bellows mechanism, osmophores, and volatiles. *Plant Systematics and Evolution* **187**: 51–88. DOI: 10.1007/BF00994091
- Shen X. 2013.** Volatile compounds isolated and identified from Kohia (*Passiflora tetrandra*). Master of Applied Science, Auckland University of Technology, Auckland, New Zealand.
- Suzuki R, Terada Y, Shimodaira H. 2019.** *pvcust: Hierarchical Clustering with P-Values via Multiscale Bootstrap Resampling*. R package version 2.2-0. DOI: 10.32614/CRAN.package.pvcust
- Teichert H, Dötterl S, Zimma B, Ayasse M, Gottsberger G. 2009.** Perfume-collecting male euglossine bees as pollinators of a basal angiosperm: the case of *Unonopsis stipitata* (Annonaceae). *Plant Biology* **11**: 29–37. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2008.00101.x
- Tölke ED, Bachelier JB, Lima EA, Ferreira MJP, Demarco D, Carmello-Guerreiro SM. 2018.** Osmophores and floral fragrance in *Anacardium humile* and *Mangifera indica* (Anacardiaceae): an overlooked secretory structure in Sapindales. *AoB PLANTS* **10**. DOI: 10.1093/aobpla/ply062
- Varassin IG, Trigo JR, Sazima M. 2001.** The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in south-eastern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* **136**: 139–152. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2001.tb00563.x
- Vogel S. 1963.** Duftdrüsen im Dienste der Bestäubung; über Bau und Funktion der Osmophoren. *Verlag der Akademie der Wissenschaften und der Literatur, Mainz*.
- Vogel S, Hadacek F. 2004.** Contributions to the functional anatomy and biology of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) III. An ecological reappraisal of floral organs. *Plant Systematics and Evolution* **249**: 173–189. DOI: 10.1007/s00606-004-0203-6
- Warrant EJ, Kelber A, Gislén A, Greiner B, Ribi W, Wcislo WT. 2004.** Nocturnal Vision and Landmark Orientation in a Tropical Halictid Bee. *Current Biology* **14**: 1309–1318. DOI: 10.1016/j.cub.2004.07.057
- Wcislo WT, Tierney SM. 2009.** Behavioural environments and niche construction: the evolution of dim-light foraging in bees. *Biological Reviews* **84**: 19–37. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2008.00059.x
- Wickham H, François R, Henry L, Müller K, Vaughan D. 2023.** *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. R package version 1.1.4. DOI: 10.32614/CRAN.package.dplyr

Wright GA, Schiestl FP. 2009. The evolution of floral scent: the influence of olfactory learning by insect pollinators on the honest signaling of floral rewards. *Functional Ecology* **23**: 841–851. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2009.01627.x

TABLES

Table 1. Absolute value (ng/flower/hour, mean \pm SD) and relative value (Percentage, mean \pm SD) of compounds found in the scent of *Passiflora pohlii* flowers during early anthesis stage (0530 h to 0730 h), and late anthesis stage (0800 h to 1000 h). Values $>5\%$ are printed in bold. Retention index (RI).

Compounds	RI	Early anthesis (n=4)		Late anthesis (n=3)	
		Absolute value (ng/flower/hour)	Relative value (%)	Absolute value (ng/flower/hour)	Relative value (%)
Terpenoid					
citronellal	1156	303 \pm 196	1 \pm 0.2	8 \pm 13	0.2 \pm 0.3
β-citronellol	1233	10040 \pm 5025	37 \pm 9.5	536 \pm 498	21 \pm 26.1
neral	1247	1574 \pm 1061	5 \pm 0.7	265 \pm 359	9 \pm 5.2
geraniol	1261	1687 \pm 1585	6 \pm 2.8	148 \pm 189	4 \pm 3
geranial	1279	10543 \pm 6007	36 \pm 4.2	1117 \pm 1024	55 \pm 23.1
methyl geranate	1333	70 \pm 77	0.3 \pm 0.5	10 \pm 16	0.5 \pm 0.8
citronellyl acetate	1357	778 \pm 438	3 \pm 0.8	28 \pm 29	0.9 \pm 0.6
geranic acid	1372	828 \pm 743	3 \pm 2.3	54 \pm 66	2 \pm 1
geranyl acetate	1387	2708 \pm 2268	9 \pm 6.3	210 \pm 315	7 \pm 5.4

Table 2. Location of floral scent emission in *Passiflora pohlii*. Quantification of volatiles emitted during the early anthesis stage from the outer filaments of the corona and from flowers where the outer filaments were experimentally removed. Absolute amount of different volatile compounds emitted (ng/flower/hour, mean \pm SD), Retention index (RI).

Compounds	RI	Outer filaments (n=3)		Flower without outer filaments (n=3)	
		Absolute value (ng/flower/hour)	Relative value (%)	Absolute value (ng/flower/hour)	Relative value (%)
Terpenoid					
γ -isogeraniol	1146	42 \pm 17	0.3 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
citronellal	1156	80 \pm 25	1 \pm 0.1	0 \pm 0	0 \pm 0
β -citronellol	1233	5243 \pm 1936	36 \pm 2.7	0 \pm 0	0 \pm 0
neral	1247	609 \pm 303	4 \pm 0.9	14 \pm 19	1 \pm 2.4
geraniol	1261	644 \pm 256	4 \pm 1.9	44 \pm 62	4 \pm 7.8
geranial	1279	6081 \pm 1769	43 \pm 3.8	269 \pm 381	27 \pm 47.6
citronellyl acetate	1357	1000 \pm 580	6 \pm 2.6	0 \pm 0	0 \pm 0
neryl acetate	1365	189 \pm 157	1 \pm 0.8	0 \pm 0	0 \pm 0
geranyl acetate	1387	500 \pm 160	4 \pm 0.4	0 \pm 0	0 \pm 0

FIGURES

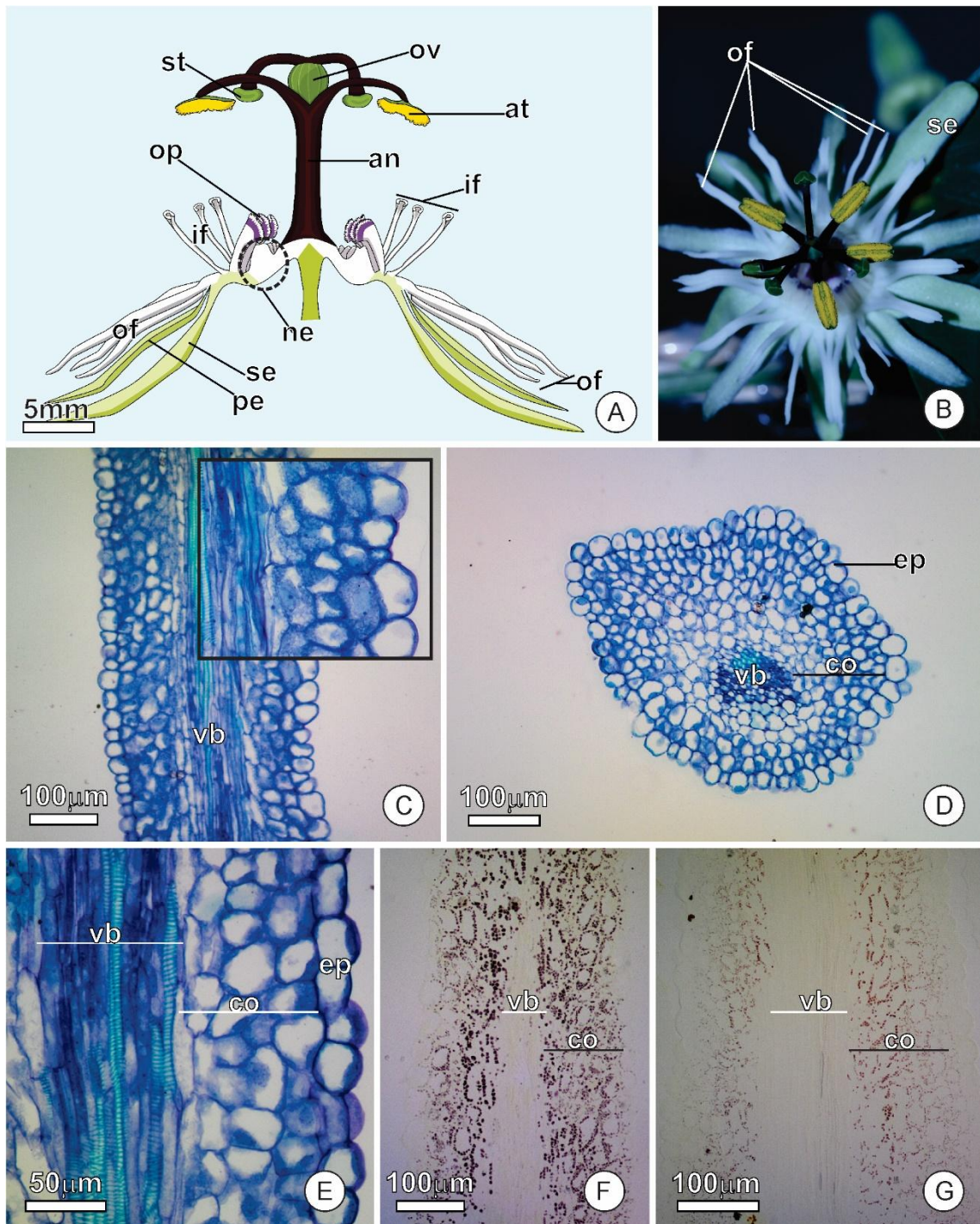


Figure 1. *Passiflora pohlii* flower parts and histological sections of the outer filaments of the corona. **A-B.** Longitudinal section of the flower and top view, respectively. Notice the different flower parts with emphasis on the long outer filaments. **C-G.** Sections of the outer filaments. **C.** Longitudinal section in the pre-anthesis stage; notice the dense cytoplasm of the subjacent parenchyma cells (insert) and the central vascular bundle with xylem and phloem. **D.** Transverse section of the median portion of the filament in early anthesis showing the oval shape of the filament, a uniseriate epidermis and the outer cortex with secretory cells. **E.** Longitudinal section in late anthesis; note that in the cortex the parenchyma cells show less dense cytoplasm than in the previous phases. **F-G.** Histochemical analysis with Lugol to detect starch (dark spots) in a longitudinal section during early anthesis. (F) Filament tip

showing high density of starch grains. (G) Filament base with lower starch content. (an - androgynophore; at - anther; co - cortex; ep - epidermis; if - inner filaments; ne - floral nectary; of - outer filaments; op - operculum; pe - petal; se - sepal; st - stigma; vb - vascular bundle).

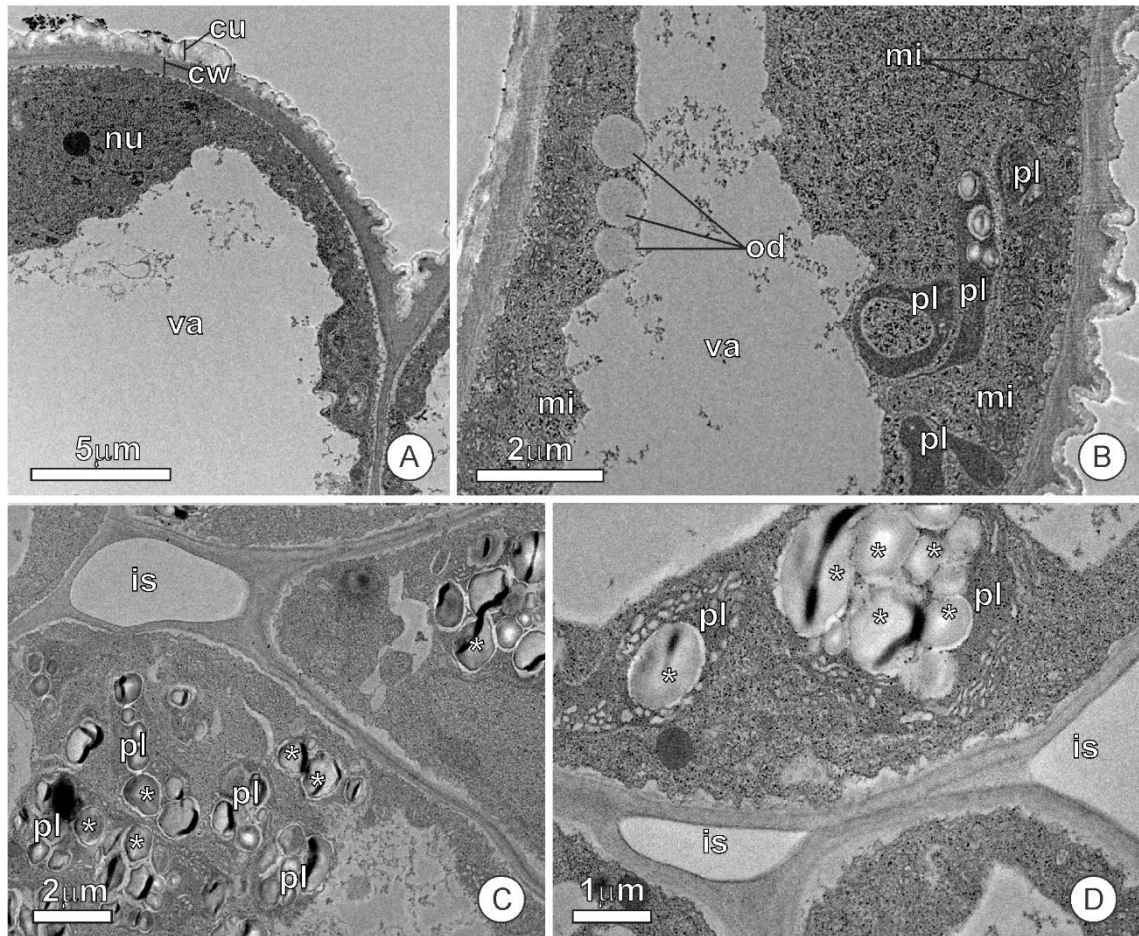


Figure 2. Ultrastructure of the distal portion of the outer filament of *Passiflora pohlii* in the pre-anthesis stage. **A-B.** Epidermal cell with a wavy cuticle firmly attached to the cell wall and a large central vacuole; in B the presence of oil droplets can be seen, mitochondria and plastids stand out. **C.** Secretory parenchyma cells with numerous plastids, filled with starch grains (*). **D.** Detail of cytoplasmic portion of secretory cell with large plastids filled with starch grains without signs of hydrolysis. (cu - cuticle; cw - cell wall; is - intercellular space; mi - mitochondria; nu - nucleus, od - oil droplet; pl - plastid; va - vacuole).

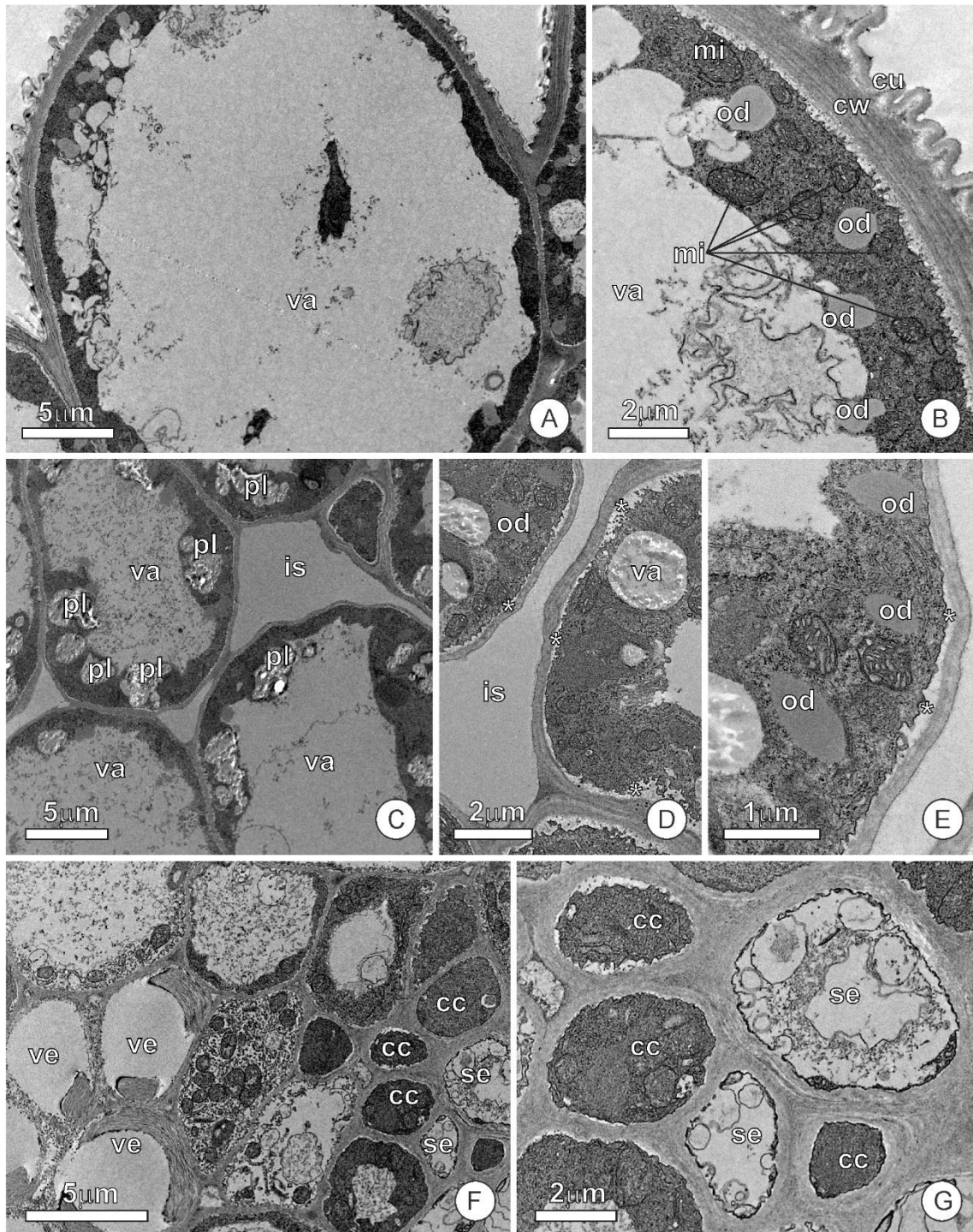


Figure 3. Ultrastructure of the outer filament of *Passiflora pohlii* flower in early anthesis, the stage at which the flower's scent is perceived. **A-B.** epidermal cells with a large vacuole and extravascular cytoplasm rich in mitochondria and oil droplets. Note that the cuticle remains attached, with no signs of rupture. **C-E.** Secretory parenchyma cells. Note, in **C**, the large central vacuole containing amorphous material; in the plastids the starch grains are undefined, in an advanced stage of hydrolysis. **D.** Detail of the peripheral cytoplasm rich in organelles; note the similarity of the vacuolar content with the hydrolyzed starch in the previous image. **E.**, Detail of the peripheral cytoplasm with oil droplets and mitochondria; the plasma membrane with undulations and a discrete periplasmic space is created (*). **F-G.** Detail of the vascular bundle. In **F** the xylem (left) presents few vessel elements and parenchyma cells. In the phloem (right) the ordinary companion cells show dense cytoplasm; the sieve tube elements have slightly dense and vesiculated cytoplasm. **G.** Detail of the phloem with companion

cells next to the sieve tube elements with slightly dense and vesiculated cytoplasm. Note the presence of amorphous material with a fibrillar appearance in the sieve tube elements. (cc - companion cell; is - intercellular space; mi - mitochondria; od - oil droplet; pl- plastid; se – sieve tube element; va - vacuole; ve - vessel element).

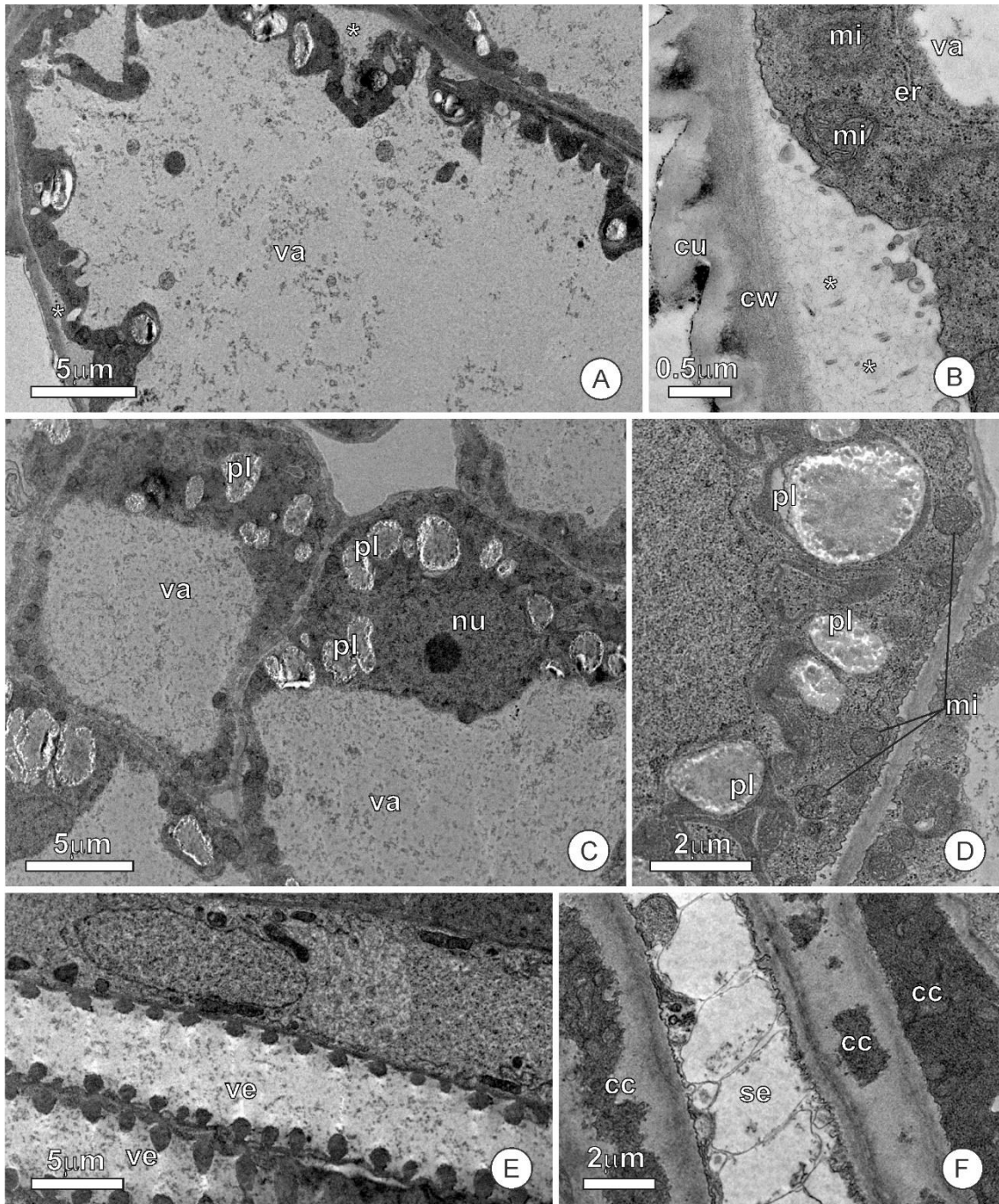


Figure 4. Ultrastructure of the outer filament of *Passiflora pohlii* flower in late anthesis, the stage at which the scent is no longer perceptible. **A.** Epidermal cell with a large central vacuole and plastids with a few starch granules; the plasma membrane is sinuous, creating a large periplasmic space. **B.** Detail of the peripheral portion of the epidermal cell, note the intact and well-adhered cuticle; in the periplasmic space (*) there is an accumulation of amorphous material. **C.** Parenchyma cells with a well-developed nucleus and some amyloplasts with starch remnants. **D.** Parenchyma cell with some plastids and mitochondria; inside the plastids there is an amorphous material, residues of already hydrolyzed starch. **E-F.** Detail of the vascular bundle. **E.** The xylem presents vessel elements that although already differentiated and dead, present full of substances with an amorphous or fibrillar aspect. **F.** Detail of phloem, notice the dense cytoplasmic companion cells and a characteristic sieve tube element. (cu - cuticle; cw - cell wall; mi - mitochondria; nu - nucleus, pl - plastid; se - sieve tube element; va - vacuole; ve - vessel element).

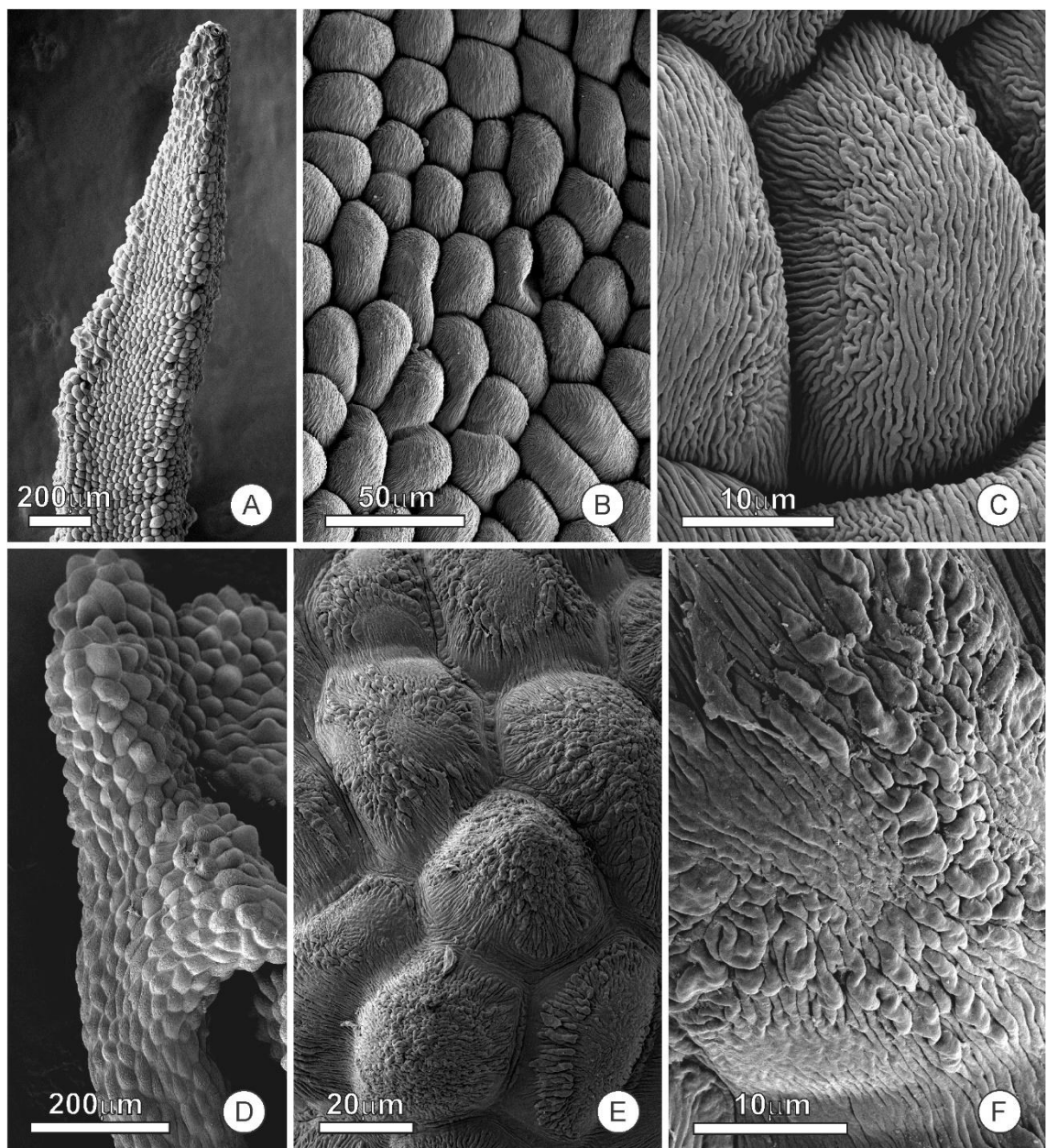


Figure 5. Scanning electron microscopy images of the *Passiflora pohlii* corona filaments in early anthesis. **A-C.** Outer filament. (A) Filament apical zone showing its elliptical tubular form and pointed tips. **B-C.** The turgid epidermal cells protrude, giving the surface a rough appearance. In **C**, a detail of the cuticle, with a regular wavy pattern. **D-F.** Inner filament tip. **D.** Filament apical zone showing its capitate tips. **E-** Detail of the epidermal cells, which are less pronounced than those of the outer filament; in **F** a cuticle detail, notice the heterogeneous undulation.

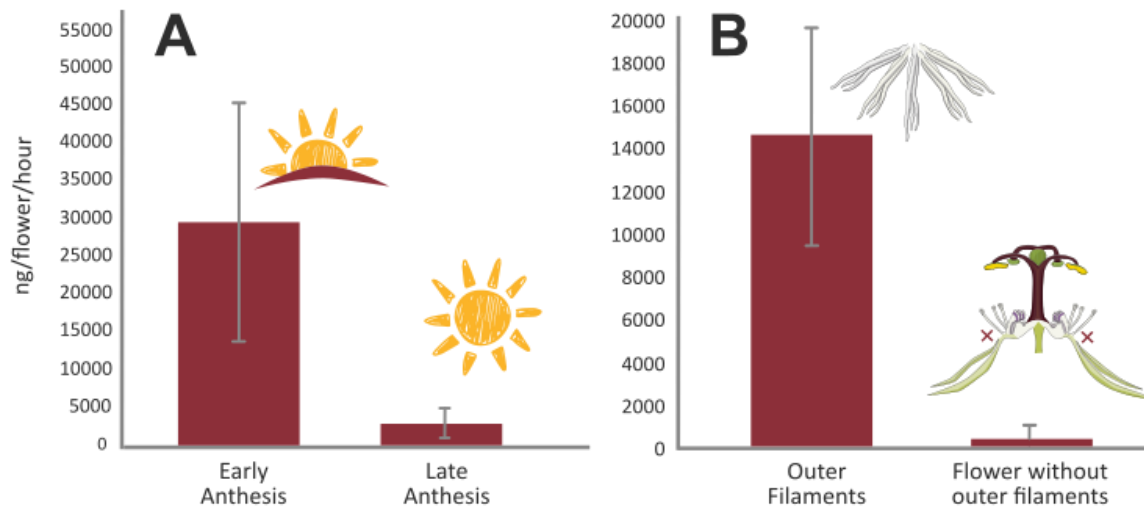


Figure 6. Scent emission quantity by time and in outer filaments vs. rest of flower. **A.** Total amount of compounds (ng/flower/hour) produced in the early (0530 h to 0730 h) and late (0800 h to 1000 h) stages of anthesis of *Passiflora pohlii*. **B.** Total amount of compounds emitted (ng/flower/hour) by the outer filaments compared to those emitted by the whole flower with the outer filaments removed demonstrating that the outer filaments are the primary source of odor in *Passiflora pohlii* flowers.

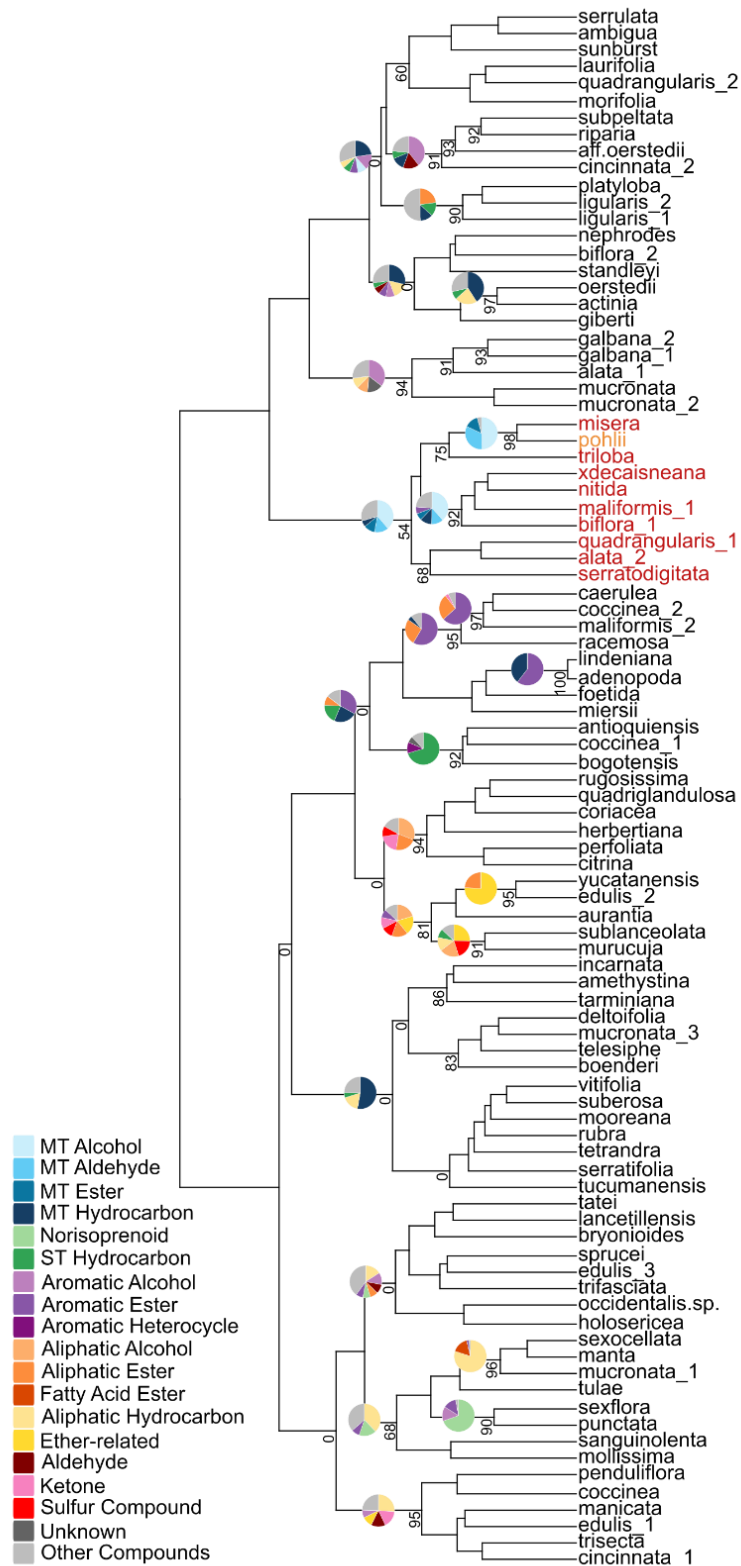


Figure 7. Hierarchical cluster analysis of floral volatile composition in *Passiflora* species. The dendrogram groups species based on similarity in floral scent compound profiles (relative percentages), using literature-derived data. Node circles represent chemical profiles, with size indicating mean relative abundance of dominant compound classes. Branch labels show Approximately Unbiased (AU) support values (%). Species chemically closest to *Passiflora pohlii* are highlighted in red. MT. Monoterpene, ST. Sesquiterpene.

3. CAPÍTULO 2: Emissão de odores cítricos por abelhas *Ptiloglossa* (Colletidae), origem, composição e morfologia glandular

Angie Zuleidi Mayorquin, Jose Serrão, Stefan Dötterl, Reislá Oliveira, Diogo Montes Vidal, Clemens Schindwein

3.1. RESUMO

Compostos orgânicos voláteis possuem um papel importante para a comunicação entre inúmeras espécies de abelhas e entre flores e abelhas visitantes florais. Em espécies de abelhas crepusculares, como as do gênero *Ptiloglossa* (Colletidae), que forrageiam exclusivamente sob luz baixa, a comunicação química assume um papel ainda mais importante do que em abelhas diurnas. Estas abelhas dependem fortemente de pistas olfativas quando visitam flores noturnas de odor intenso. No entanto, a origem e composição dos odores que elas próprias emitem e que podem possuir um papel para comunicação intraespecífica, são desconhecidas. Perguntamos: (i) Qual a composição dos voláteis emitidos pelas abelhas *Ptiloglossa*? (ii) Onde os voláteis são produzidos? (iii) qual a morfologia das glândulas produtoras dos voláteis? e (iv) há diferença na composição e intensidades dos voláteis e estruturas glandulares entre machos e fêmeas? Este estudo investigou a composição e origem do odor cítrico das abelhas crepusculares *Ptiloglossa*. Por meio de análises químicas (GC-MS) e extração glandular, os voláteis emitidos e presentes nas glândulas foram comparados. Além disso, comparamos a morfologia das glândulas produtoras do aroma e seus compostos voláteis entre machos e fêmeas. Identificamos a glândula mandibular como a fonte do odor característico de *Ptiloglossa*. Seu perfil químico foi dominado pelos monoterpenos geraniol, geranial, neral, linalol e ocimeno, apresentando composição qualitativamente similar entre machos e fêmeas. No entanto, os machos apresentaram uma variabilidade significativamente maior na quantidade total de compostos emitidos. Além disso, a morfologia da glândula mandibular difere entre os sexos: as fêmeas possuem um reservatório em formato de castanha de caju, enquanto os machos exibem uma estrutura trilobada e achatada de pelo menos três vezes o tamanho da glândula na fêmea. Concluímos que a glândula mandibular produz uma mistura de compostos com potencial feromonal. A significativa variabilidade na quantidade total emitida pelos machos corrobora a hipótese de que os voláteis emitidos por abelhas de *Ptiloglossa* podem possuir uma função na biologia reprodutiva destas

abelhas, atuando como um sinal honesto. Para testar esta hipótese seria importante realizar biotestes com extratos glandulares de machos e fêmeas.

3.2. INTRODUÇÃO

Para as abelhas solitárias os sinais químicos representam o principal canal de comunicação, especialmente nos processos de seleção sexual e reconhecimento interespecífico (Ayasse; Paxton; Tengö, 2001). Os odores são essenciais para que os machos localizem fêmeas e discriminem entre aquelas sexualmente receptivas ou virgens e as já fecundadas (Schiestl; Ayasse, 2000). Em algumas espécies, os machos estabelecem e marcam territórios associados a recursos, utilizando-se de sinais químicos para atrair fêmeas, um comportamento que pode sinalizar sua qualidade genética ou capacidade de defesa do local contra competidores (Ayasse; Paxton; Tengö, 2001; Frankie; Vinson; Coville, 1980; Hefetz, 1983; Vinson et al., 1982).

Além do contexto reprodutivo, sinais químicos são igualmente cruciais para a localização e discriminação de plantas hospedeiras, fontes de recursos e marcação individual do ninho em contextos de agregação (Dötterl; Vereecken, 2010; Hefetz, 1987). Essa dependência da comunicação química é ainda mais crítica para as abelhas crepusculares, que operam em condições de luz limitada.

Para superar as limitações visuais impostas pelo crepúsculo, abelhas com atividade nesse período desenvolveram adaptações integradas nos sistemas morfológico, fisiológico e neural. Tais adaptações, que incluem o aumento dos olhos compostos e ocelos, capacitam essas abelhas ao voo eficiente em condições de luminosidade reduzida. Esta capacidade visual permite comportamentos essenciais como forrageamento e navegação para realocação do ninho durante voos de retorno. (Greiner et al., 2004; Greiner; Ribi; Warrant, 2004; Kelber et al., 2006; Warrant et al., 2004). Essas adaptações atuam em sinergia com sinais químicos: odores florais funcionam como atrativos de longo alcance, enquanto os estímulos visuais são cruciais para desencadear o pouso e a coleta de recursos florais (Araújo et al., 2024). Dessa forma, em sistemas de polinização noturna/crepuscular, o odor orienta as abelhas até as fontes de alimento, auxiliando também na localização de sítios de nidificação e cópula (Borges; Somanathan; Kelber, 2016; Krug et al., 2018; Martínez-Martínez et al., 2021).

A compreensão dos mecanismos de como abelhas crepusculares interagem com o ambiente, sobretudo quimicamente é pouco conhecido. Ocorrem cerca de 250 espécies de abelhas de hábitos noturnos ou crepusculares no mundo, distribuídas pelas famílias Andrenidae, Apidae, Halictidae e Colletidae (Wcislo & Tierney, 2009). Na região neotropical, dois gêneros são representativos de hábitos noturnos e crepusculares: *Megalopta* (Halictidae) e o gênero *Ptiloglossa* (Colletidae). Este último, de hábito estritamente crepuscular, pertence à subfamília Diphaglossinae e possui um total de 57 espécies descritas (Velez-Ruiz, 2015). As abelhas do gênero *Ptiloglossa* nidificam no solo e possuem comportamento frequentemente gregário, exibindo um curto período de atividade restrito aos crepúsculos matutino e vespertino (Roberts, 1971). Os sinais olfativos utilizados por essas abelhas para comunicação intraespecífica, como atração de parceiros, marcação de território ou comunicação entre os sexos, ainda não são conhecidos.

As abelhas crepusculares do gênero *Ptiloglossa* dependem fortemente de pistas olfativas para forrageamento, comportamento evidenciado pelas síndromes florais das plantas que visitam ou polinizam. Entre estas encontramos flores quiropterófilas, como o pequi (*Caryocar brasiliense*) (Araujo et al., 2020) e espécies de *Pseudobombax* (Araújo et al., 2024), as quais abrem no fim da tarde e permanecem abertas até a manhã seguinte. Embora sejam visitadas por *Ptiloglossa*, que chega a remover quantidade expressiva de pólen, estas abelhas não se constituem como polinizadoras eficazes (Araujo et al., 2020). Por outro lado, há flores melitófilas de antese crepuscular matutina, como diversas Myrtaceae (Cordeiro et al., 2017, 2021), *Machaerium opacum* (Fabaceae) (Siqueira et al., 2018), *Spondias mombin* (Anacardiaceae) (Carneiro; Martins, 2012), o guaraná (*Paullinia cupana*) (Krug et al., 2018) e *Passiflora pohlii* (Faria; Stehmann, 2010), caracterizam-se por exalar odores intensos, possuir coloração branca e abrir-se antes do nascer do sol. Neste grupo as abelhas *Ptiloglossa* são as primeiras visitantes florais e são polinizadoras efetivas. Apesar de serem polinizadoras eficientes de variadas plantas a origem e composição química dos sinais olfativos que as próprias abelhas utilizam para comunicação intraespecífica permanecem completamente desconhecidas, representando uma lacuna significativa no entendimento da ecologia química desses polinizadores crepusculares.

A produção de compostos voláteis pelas próprias abelhas frequentemente ocorre em glândulas específicas, ou células do tegumento modificadas e conectadas à cutícula (Ayasse;

Paxton; Tengö, 2001; Müller; Buchbauer, 2011). Em abelhas, reconhece-se a importância de várias glândulas e as funções que elas exercem. Por exemplo, a glândula de Dufour, em abelhas do gênero *Colletes*, produz lactonas macrocíclicas utilizadas para revestir as células de cria (Almeida, 2008), enquanto a secreção da glândula labial em *Bombus* atua como feromônio de atração sexual. Dentro da diversidade de glândulas em abelhas, a glândula mandibular se destaca por produzir feromônios de atração de parceiros e de marcação de território em diversas abelhas solitárias, como *Colletes*, *Andrena*, *Panurgus*, *Osmia*, *Xylocopa*, entre outras (Ayasse; Paxton; Tengö, 2001). Entretanto, para a maioria das abelhas de hábitos crepusculares, como as do gênero *Ptiloglossa*, as fontes glandulares e a composição dos voláteis permanecem inexploradas.

Um odor cítrico característico, consistentemente percebido durante a coleta e em espécimes de coleção, é emitido por abelhas do gênero *Ptiloglossa* (Observação pessoal). Contudo, os compostos voláteis responsáveis por esta fragrância nunca foram identificados. A origem glandular e uma possível variação do perfil químico entre os sexos também permanecem desconhecidas. Diante dessas lacunas, este trabalho aborda as seguintes perguntas: (i) Qual a composição dos voláteis emitidos pelas abelhas *Ptiloglossa*? (ii) Onde os voláteis são produzidos? (iii) Qual a morfologia das glândulas produtoras? e (iv) Há diferença na composição e intensidades dos voláteis e estruturas glandulares entre machos e fêmeas?

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Coleta de abelhas

Os espécimes de *Ptiloglossa* sp. utilizados nas análises foram coletados quando visitaram flores de *Passiflora pohlii* (Passifloraceae), uma espécie polinizada exclusivamente por abelhas desse gênero (Faria; Stehmann, 2010). As coletas foram realizadas em seu habitat original nas dependências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil (19°52'04.8"S 43°57'59.8"W). Os espécimes foram separados em morfotipos com base em caracteres morfológicos, em cooperação com Dr. Eduardo Almeida (Universidade de São Paulo), especialista do grupo taxonômico.

3.3.2. Anatomia da glândula mandibular – microscopia de luz

Para o estudo da morfologia as abelhas de *Ptiloglossa* sp.1, três machos e uma fêmea foram imobilizados durante 10 minutos no freezer a -10°C. As cabeças foram retiradas com ajuda de uma lâmina de barbear e colocadas em Fixador Zamboni (Stefanini; Martino; Zamboni, 1967) na geladeira a 5° C, por 15 dias. O material foi analisado no Laboratório de Ultraestrutura Celular da Universidade Federal de Viçosa (UFV), desidratado em soluções gradativas de Etanol (70%, 80%, 90%, 95%) e embebido em historesina Leica (Leica Biosystems GmbH, Heidelberg, Germany). Depois da polimerização da historesina, as amostras foram cortadas em pedaços de 2 µm de espessura, coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscopia de luz.

3.3.3. Coleta headspace de compostos emitidos por abelhas *Ptiloglossa*

Para coletar os compostos voláteis emitidos pelas abelhas (três machos, dois fêmeas), os indivíduos foram coletados e imediatamente acondicionados em sacos de poliéster inodoros (40 cm, Wyda®) até o início da extração dos odores. As abelhas permaneceram nos sacos por pelo menos 30 minutos antes do início da coleta dos voláteis.

Os voláteis foram amostrados mediante a técnica de *headspace* dinâmico, com duração de duas horas. Cada saco contendo um indivíduo foi acoplado a uma bomba de vácuo (modelo G12/01 EB; Rietschle Thomas, Puchheim, Alemanha), cujo fluxo de ar foi mantido constante a 200 mL/min, regulado por um fluxômetro.

Os compostos voláteis foram retidos em um tubo adsorvente contendo uma mistura de fibra de vidro e o polímero adsorbens poroso HayeSep® (100-120 *mesh*). Para eluir os compostos adsorvidos, utilizamos 200 µL de hexano (grau HPLC ≥ 99,9%, Sigma-Aldrich). As amostras eluídas foram armazenadas a -20 °C até as análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

3.3.4. Extrato da glândula mandibular

Os extratos das glândulas mandibulares foram analisados nos mesmos indivíduos nos quais foram coletadas as amostras *headspace* antes (cinco machos, dois fêmeas) com exceção de dois machos nos quais não conseguimos ter amostras de *headspace* analisadas. Os espécimes foram imobilizados num freezer a -20 °C por ~10 minutos, até eles morreram. Isto permitiu a dissecação da glândula mandibular da cabeça com facilidade. Quando a extração não pôde ser realizada imediatamente, as abelhas foram armazenadas a -20 °C por até três dias. Não notamos diferenças nas extrações e análises após este congelamento prolongado em comparação com extrações imediatas.

A cabeça, previamente dissecada, foi fixada em um suporte constituído por uma mistura de parafina e cera de abelha para facilitar a manipulação durante a extração da glândula mandibular e foi submersa em soro fisiológico para evitar desidratação dos tecidos. A glândula, que permaneceu aderida à mandíbula à qual se conecta por um ducto excretor, foi então cuidadosamente extraída. Para isso, todos os músculos e tecidos da mandíbula conectados à cabeça foram seccionados, isolando-a completamente.

Em seguida, a glândula mandibular ainda unida a mandíbula foi submersa em 100 µL de hexano (grau HPLC $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich) por um período de 10 segundos para reter os compostos pelo solvente. Posteriormente, a glândula e a mandíbula foram retiradas do solvente. A amostra resultante foi então armazenada a -20 °C até a análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

3.3.5. Análise e identificação de compostos

A análise GC-MS foi realizada em um cromatógrafo a gás Shimadzu GC2010 acoplado a um espectrômetro de massa (EI) Shimadzu QP2010 Plus. Foi utilizada uma coluna capilar RTX-5 (Restek, PA, EUA; 30 m \times 0,25 m \times 0,25 mm), com programação de gradiente de temperatura começando em 50°C mantida por 1 min e uma taxa de aumento de 7°C por min até chegando a 270°C.

A identificação dos compostos foi realizada utilizando o software GCMSolutions. Os cromatogramas obtidos foram comparados com dados de bibliotecas espectrais comerciais (FFNSC, NIST, SHIM) e literatura (NIST Chemistry WebBook, SRD 69; SciFinder). Adicionalmente, os compostos foram confirmados através da comparação de seus índices de retenção experimentais com valores de referência reportados na literatura, calculados a partir de uma série homóloga de n-alcenos.

Para quantificação, utilizou-se pentadecanoato de metila (1000 ppm) e b-pineno (100ppm) como padrão. Compostos identificados como contaminantes provenientes do solvente, do sistema ou do material biológico foram excluídos das análises subsequentes.

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Composição do odor de *Ptiloglossa*

Na análise *headspace* de machos e fêmeas de *Ptiloglossa*, foi identificado um total de dez compostos voláteis. Todos foram terpenos, sendo um sesquiterpeno e os demais monoterpenos pertencentes hidrocarbonetos (álcool, aldeído e éster). Nos machos, os compostos majoritários foram geraniol ($66 \pm 7\%$), geranial ($15 \pm 7\%$) e ocimeno ($10 \pm 13\%$). Nas fêmeas, observou-se os mesmos compostos majoritários, mas com a dominância mais acentuada do geraniol ($83 \pm 9\%$) (Tabela 1).

Tabela 1. Compostos do extrato da glândula mandibular e dos voláteis do odor emitida por machos e fêmeas de *Ptiloglossa* sp. Valores representam a quantidade relativa (%) de cada composto. (Tr = compostos detectados em traços). Valores superiores a 5% estão destacados em negrito.

Composto	RI	Tipo de composto	Voláteis (<i>Headspace</i>) (% \pm s,d)		Extrato Glândula Mandibular (% \pm s,d)	
			Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Myrcene	990	Monoterpeno hidrocarboneto	Tr	Tr	Tr	Tr
Limonene	1031	Monoterpeno hidrocarboneto	Tr	1 \pm 0	Tr	0 \pm 1
Ocimene	1051	Monoterpeno hidrocarboneto	10 \pm 13	5 \pm 4	11 \pm 9	8 \pm 4

Linalool	1106	Monoterpeno álcool	5 ± 2	5 ± 3	6 ± 5	3 ± 1
Nerol	1232	Monoterpeno álcool	Tr	Tr	Tr	Tr
Neral	1246	Monoterpeno aldeído	2 ± 1	1 ± 0	8 ± 8	12 ± 9
Geraniol	1258	Monoterpeno álcool	66 ± 7	83 ± 9	40 ± 23	48 ± 37
Geranial	1280	Monoterpeno aldeído	15 ± 7	5 ± 2	34 ± 22	28 ± 22
Geranyl acetate	1383	Monoterpeno éster	1 ± 1	Tr	1 ± 1	Tr
Geranyl acetone	1456	Sesquiterpenoide	Tr	1 ± 1	Tr	Tr

3.4.2. Morfologia da glândula mandibular

As glândulas mandibulares de *Ptiloglossa* foram bem desenvolvidas e ligadas à mandíbula através dum ducto excretor. A glândula apresenta diferenças marcantes entre machos e fêmeas na forma do reservatório (Figura 1A). Em fêmeas, a glândula mandibular possui um formato arredondado, semelhante a uma castanha de caju, que se estende lateralmente pela cabeça até a região dos olhos compostos, onde é dobrada pelo lóbulo antenal do cérebro. Nos machos, a glândula mandibular é pelo menos 3 vezes maior que na fêmea. Ela apresenta três lóbulos predominantes e, de modo geral, sua estrutura é aplanada, ficando aderida à cutícula superficial (Figura 1 A, B).

A região secretora da glândula mandibular é formada por uma camada única de células colunares que reveste o reservatório (Figura 1C). Essas células conectam-se individualmente ao reservatório através de um único canalículo extracelular, formando um aparato terminal, uma característica típica da classe III na classificação de Noirot & Quenedey (1974) (Figura 1D). Citologicamente, as células secretoras apresentam um citoplasma homogeneamente acidófilo, devido à sua riqueza em proteínas básicas, o que resulta em uma intensa coloração com corantes ácidos (Figura 1F). Seus núcleos são bem desenvolvidos, localizando-se no polo basal das células, distantes da superfície apical onde se conectam ao reservatório. Estes têm predominância de cromatina descondensada e nucléolos evidentes, características que indicam alta atividade metabólica (Figura 1E). Em contraste, as células canaliculares que formam os canalículos extracelulares, visíveis através de invaginações na célula secretora, apresentam

núcleos pequenos com cromatina condensada (Figuras 1F). O reservatório, rodeado por esse epitélio secretor, é amplo e preenchido por uma secreção de aspecto fracamente acidófilo (Figura 1C).

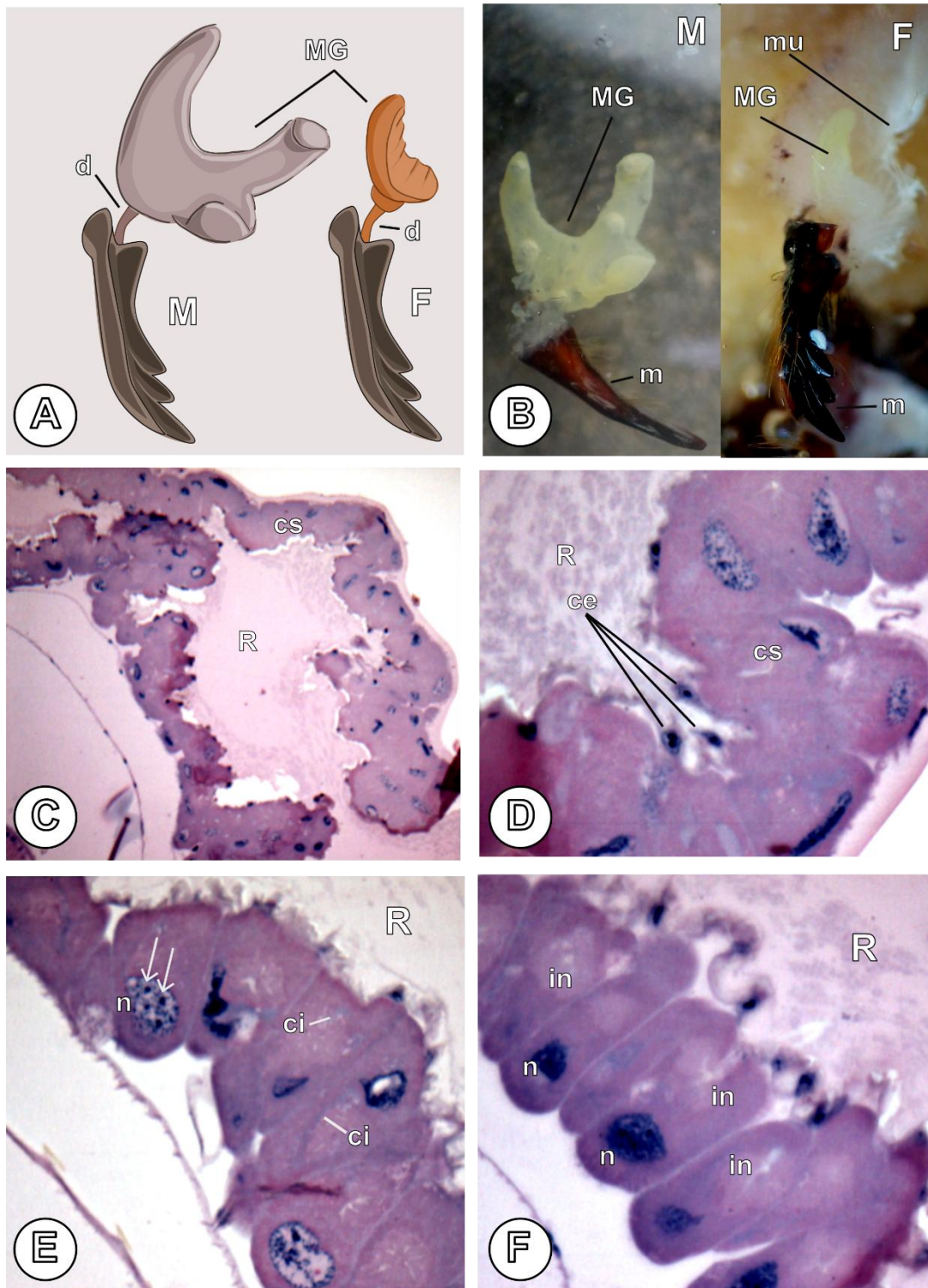


Figura 1. Morfologia externa da glândula mandibular e das células secretoras em *Ptiloglossa* sp. **A, B.** Estrutura externa da glândula mandibular em machos e fêmeas ainda conectadas a mandíbula através o ducto excretor. **C-F.** Seções histológicas coradas com Hematoxilina e eosina. **C.** Reservatório revestido por um epitélio secretor simples de células colunares. **D.** Canaliculos extracelulares de células secretoras estendendo-se no reservatório. **E.** Nucléolos conspícuos nos núcleos das células secretoras, indicando alta atividade secretora (setas). Presença de canaliculos na região intracelular. **F.** Núcleos das células secretoras posicionados no polo basal, com invaginações apicais abrigando células canaliculares que conduzem as substâncias ao reservatório através de canaliculos. **ce** canaliculos extracelulares, **ci**

canalículos intracelulares, **cs** células secretoras, **d** ducto excretor, **m** mandíbula, **mu** musculo, **MG** glândula mandibular, **in** invaginação, **n** núcleo, **R** reservatório.

3.4.3. Identificação e caracterização química do conteúdo da glândula mandibular

Os principais constituintes da secreção glandular, foram geraniol (Machos: $40\% \pm 23$; Fêmeas: $48\% \pm 37$), geranial (Macho: $34\% \pm 22$; Fêmea: $28\% \pm 22$), neral (Macho: $8\% \pm 8$; Fêmea: $12\% \pm 9$) e ocimene (Macho: $11\% \pm 9$; Fêmea: $8\% \pm 4$). Juntos, esses quatro compostos representaram pelo menos 80% da composição total dos perfis analisados (Tabela 1). A concordância dos perfis da glândula mandibular e da fragrância da abelha confirma que esta glândula é a fonte dos voláteis encontrados no headspace.

Nossas análises de cromatografia gasosa identificaram as glândulas mandibulares como fonte dos compostos voláteis liberados por abelhas *Ptiloglossa* sp. Essa conclusão é corroborada pelos cromatogramas comparativos (Figura 2A), que demonstram uma sobreposição entre o perfil químico do extrato glandular e aquele obtido do *headspace* de abelhas vivas. Todos os compostos detectados nas amostras são terpenoides. Os monoterpenoides predominaram em machos e fêmeas, tanto no extrato das glândulas mandibulares quanto na análise *headspace*.

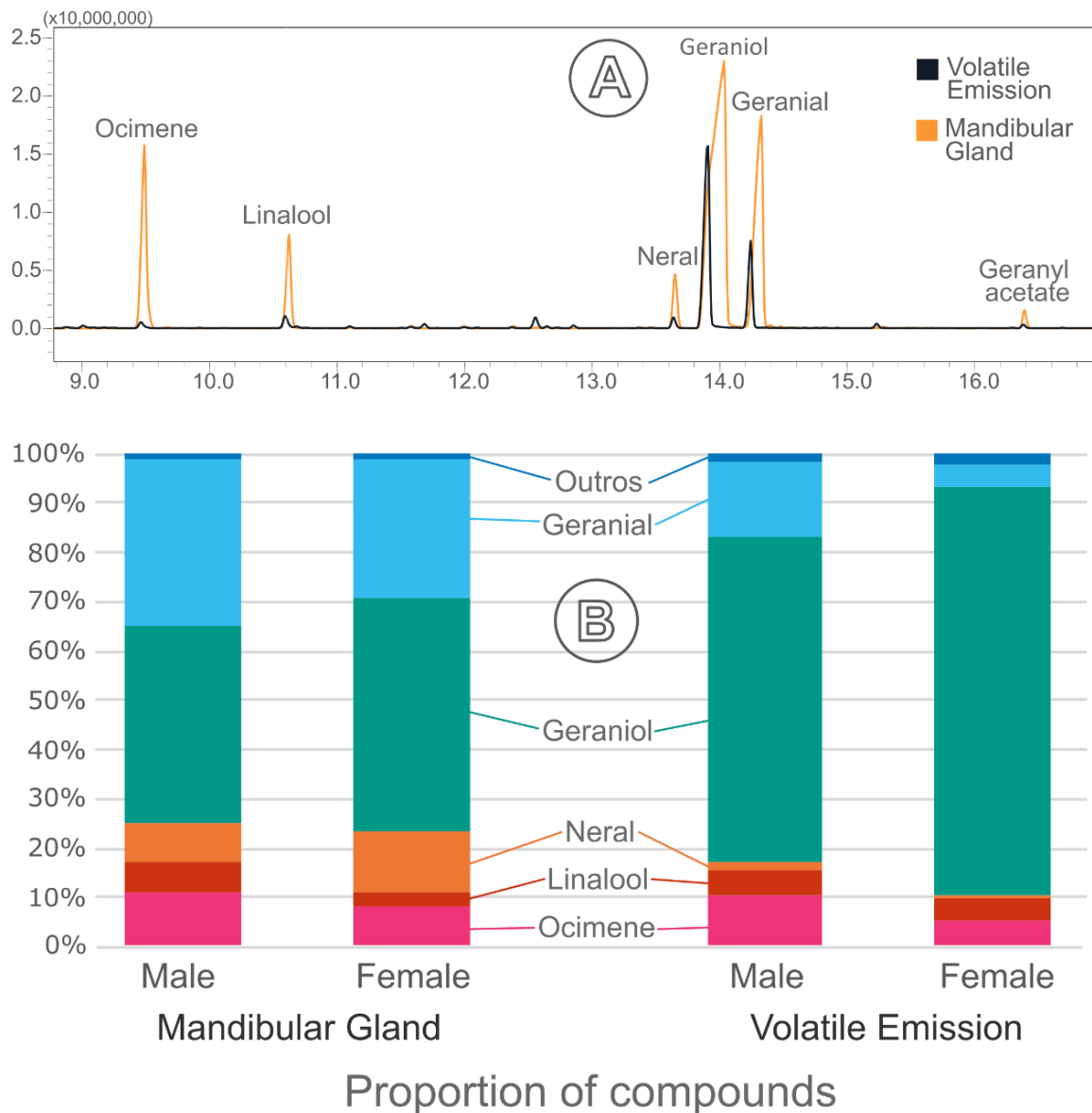


Figura 2. Análise química comparativa dos compostos de *Ptiloglossa* sp. Cromatogramas comparativos do extrato da glândula mandibular (linha laranja) e dos voláteis emitidos por um macho vivo (linha preta). Os picos dos principais compostos (Ocimeno, Linalol, Neral, Geraniol, Geranial e Acetato de geranila) se sobrepõem nos dois cromatogramas, e a ordem de abundância dos compostos se mantém consistente entre as amostras, com os mesmos compostos ocupando as posições de maior a menor concentração em ambos os casos. **B.** Perfil químico (quantidades relativas) do extrato da glândula mandibular e dos voláteis emitidos pelas abelhas *Ptiloglossa*, em machos e fêmeas. Evidencia-se que o geraniol é o composto de maior proporção em ambos; no entanto, observa-se uma quantidade relativamente maior nas fêmeas.

3.4.4. Comparação do perfil químico entre machos e fêmeas

O perfil qualitativo dos compostos foi consistentemente o mesmo entre machos e fêmeas de *Ptiloglossa*, tanto nas análises dos extratos glandulares quanto nas do *headspace*. No entanto alguns compostos (Myrcene, Limonene, Nerol, Geranyl acetate, e Geranyl acetone) foram detectados apenas em traços de determinadas amostras (Tabela 1). Apesar dessa similaridade qualitativa, houve pequenas diferenças nas proporções relativas dos compostos. O geraniol foi o composto majoritário em todos os casos, mas a porcentagem relativa foi maior nas fêmeas. Consequentemente, sua contraparte oxidada (geranial) foi ocorreu em proporções menores. Este padrão foi verificado tanto no extrato glandular quanto no *headspace*. Adicionalmente, o ocimeno também apresentou uma proporção menor nas fêmeas (Figura 2B).

3.5. DISCUSSÃO

Nosso estudo mostra, que os voláteis cítricos emitidos pelos machos e fêmeas de *Ptiloglossa* são produzidos e liberados pelas glândulas mandibulares. Existe sobreposição tanto na quantidade e quanto na proporção dos seis monoterpênoides principais registrados nas análises *headspace* e no conteúdo do reservatório da glândula mandibular. Observou-se que a forma e o tamanho da glândula diferem entre machos e fêmeas, sendo a dos machos maiores. Não foram encontradas diferenças nos compostos produzidos por ambos os sexos, mas sim na proporção de alguns desses compostos.

A glândula mandibular foi identificada como a produtora do odor cítrico em *Ptiloglossa* sp. Nas fêmeas, o formato do reservatório assemelha-se ao de vários himenópteros, que possuem glândulas mandibulares tipicamente saculares (Cruz-Landim, 1967; Cruz-Landim; Abdalla; Gracioli-Vitti, 2005), cujo tamanho, em abelhas sociais, pode variar conforme a casta (Cruz-Landim; Gracioli-Vitti; Abdalla, 2011; Salles; Cruz-Landim, 2004). Em *Ptiloglossa*, o reservatório encontra-se inteiramente revestido por células secretoras, uma característica compartilhada com *Apis mellifera* (Apidae, Apini), que também exibe um formato sacular único sem divisões (Cruz-Landim, 1967). Esta configuração contrasta com a observada em espécies do gênero *Melipona* (Apidae, Meliponini). Nestas, embora também apresentem um saco

simples, as células secretoras estão concentradas numa região específica do reservatório, e não distribuídas uniformemente (Cruz-Landim, 1967).

Quanto aos machos de *Ptiloglossa*, observa-se uma glândula mandibular de formato trilobado, uma característica até então não registrada em outras abelhas. Glândulas lobadas já são documentadas em diversas espécies como *Oxytrigona tataira* (Apidae, Meliponini), que possui um reservatório com dois lóbulos, mas apenas um é recoberto por células secretoras (Cruz-Landim, 1967). Uma condição mais similar de *Ptiloglossa*, é descrita para machos de *Centris* (Apidae, Centridini), que apresentam glândulas mandibulares bilobadas integralmente cobertas por células secretoras. A diferença reside no seu formato, as células são globulares em *Centris adani*, enquanto em *Ptiloglossa* são colunares (Vinson et al., 1982, 1984).

Evidenciou-se um nítido dimorfismo sexual na morfologia da glândula mandibular de *Ptiloglossa*, com os machos apresentando glândulas mais desenvolvidas que as fêmeas - padrão distinto encontrado principalmente em abelhas eussociais. Nestas, contudo, o dimorfismo se manifesta principalmente entre as castas femininas, sendo as glândulas mais desenvolvidas nas rainhas do que nas operárias, caso de *Apis mellifera*, enquanto nos machos se apresentam rudimentares (Cruz-Landim, 1967; Cruz-Landim; Hofling; Imperatriz-Fonseca, 1980). No entanto, em abelhas eussociais essas glândulas mantêm tamanho similar entre os sexos, de modo geral (Cruz-Landim, 1967; Gracioli-Vitti; Abdalla, 2006). Essa dimorfismo sexual na morfologia foi associado à função da glândula, com a diferencia entre sexos relacionando-se principalmente à atração de machos e regulação do comportamento das operárias, inibindo o desenvolvimento ovariano (Cruz-Landim, 2009; Salles; Cruz-Landim, 2004).

O padrão encontrado em *Ptiloglossa* assemelha-se antes ao documentado para abelhas parasitas como *Leiopodus lacertinus*, cujos machos apresentam glândulas mandibulares maiores e de morfologia racemosa singular, enquanto as fêmeas possuem glândulas menores, ovais e compactas (Galvani; Settembrini, 2013). O dimorfismo, com glândulas mais desenvolvidas em machos, está frequentemente associado à atração sexual de fêmeas ou à marcação territorial mediante abertura das mandíbulas, como observado em *Xylocopa* e algumas *Centris* (Cruz-Landim, 2009; Vinson et al., 1984). Vale notar que em espécies que utilizam secreções de glândulas das pernas posteriores para marcação territorial, as glândulas

mandibulares tendem a ser vestigiais (Cruz-Landim, 2009; Vinson et al., 1984). Consequentemente, o desenvolvimento acentuado da glândula mandibular em machos pode constituir um indicativo de sua função na sinalização química territorial ou atração sexual via emissão de voláteis.

A presença de uma glândula mandibular bem desenvolvida em machos de *Ptiloglossa*, associada à produção de um odor cítrico composto por voláteis como geraniol, geranial, neral, linalol e ocimeno, evidencia um sistema de comunicação química convergente com aquele observado em machos de *Centris*. Neste gênero, o tamanho da glândula e a produção destes voláteis como geraniol, geranial, nerol, neral e acetato de geranila estão diretamente relacionados a comportamentos de marcação química territorial. Espécies com hábito de patrulhamento e marcação química, como *Centris adani*, *C. segregata* e *C. inermis*, apresentaram glândulas mandibulares desenvolvidas que produzem uma variedade de monoterpenos, enquanto outras espécies que não exibem tais comportamentos, nenhum volátil foi detectado (Vinson et al., 1982, 1984).

Em *Ptiloglossa* registramos que machos patrulham e reagem de forma agressiva a outros machos em flores de *Passiflora pohlii* (observações pessoais) onde as abelhas foram coletadas. Tais evidências comportamentais reforçam a relação entre a anatomia desenvolvida da glândula, a composição química característica e a conduta territorial exibida, consolidando a hipótese de que a secreção mandibular poderia atuar como um feromônio de marcação territorial no sistema de acasalamento desta espécie. Esta interpretação, no entanto, carece de confirmação por meio de bioensaios específicos e de uma caracterização mais detalhada do comportamento.

O perfil químico da glândula mandibular de *Ptiloglossa*, caracterizado pela presença de geraniol, geranial, neral, linalol e ocimeno, posiciona esta espécie dentro de um padrão amplamente conservado em abelhas solitárias das famílias Colletidae e Andrenidae. A ocorrência simultânea de geraniol e citral (neral + geranial) em ambos os sexos apresenta notável similaridade com os perfis documentados em espécies de *Andrena* (Bergström et al., 1982) e *Colletes*, onde estes compostos atuam como feromônios de agregação e comunicação sexual (Hefetz; Batra; Blum, 1979). Particularmente significativa é a semelhança com *Colletes*,

que compartilha não apenas os componentes citral (neral + geranial), mas também o linalol, uma associação química relativamente rara, no entanto este composto é minoritário em *Ptiloglossa* sp. (Hefetz; Batra; Blum, 1979). Portanto, a combinação de evidências morfológicas, químicas e comportamentais sustenta a hipótese de que a glândula mandibular em *Ptiloglossa* sp. está envolvida em um sistema de sinalização química, possivelmente relacionado à defesa de recursos florais e/ou atração sexual. A conservação do perfil químico entre sexos, associada ao dimorfismo estrutural, sugere que a evolução desta glândula seguiu trajetórias funcionais diferenciadas em machos e fêmeas, refletindo pressões ecológicas e reprodutivas distintas. Estudos futuros, focados em bioensaios de atração e análise temporal da emissão volátil, serão cruciais para desvendar os contextos específicos de uso destes compostos na comunicação desta espécie.

Os compostos voláteis que constituem a fragrância de *Ptiloglossa* são recorrentes nas fragrâncias florais de diversas famílias botânicas, como observado em *Ophrys lutea* (Orchidaceae) (Borg-Karlson; Tengö, 1986), *Paullinia cupana* (Sapindaceae) (Krug et al., 2018), *Impatiens* spp. (Balsaminaceae) (Jakubska-Busse et al., 2023), *Epiphyllum oxypetalum* (Cactaceae) (Zhang et al., 2025), rosas silvestres (Dani et al., 2021) e espécies de *Ocimum* (Lamiaceae) (Wesołowska; Dorota, 2025). Notavelmente, essas mesmas substâncias estão presentes em espécies polinizadas por *Ptiloglossa*, como *Passiflora misera* e *P. pohlii* (*Decaloba*) (Mayorquin et al. Submetido). Essa sobreposição química sugere um cenário evolutivo no qual as flores podem estar utilizando compostos já familiares ao repertório sensorial das abelhas, possivelmente associados a contextos de comunicação intraespecífica, como agregação ou atração sexual. Tal correspondência pode facilitar uma atração inata de abelhas recém-emergidas, que reconheceriam esses voláteis como sinais biologicamente relevantes (Dötterl; Vereecken, 2010; Jürgens; Dötterl; Meve, 2006; Schiestl, 2010). Essa convergência química entre o feromônio da abelha e os perfis florais abre perspectivas para investigações futuras, incluindo bioensaios de atração para avaliar o papel desses voláteis na interação abelha-planta e na comunicação intraespecífica de *Ptiloglossa*.

3.6. Considerações finais

Com base nas descobertas desta tese, conclui-se que a interação entre *Passiflora pohlii* e as abelhas *Ptiloglossa* constitui um caso notável de especialização mútua, sustentada por uma sincronia química e temporal precisa. A convergência de perfis voláteis (dominados por monoterpenos de aroma cítrico, como geraniol, geranial e neral) produzidos tanto nos filamentos externos da coroa da flor quanto na glândula mandibular das abelhas, revela um alinhamento químico íntimo entre os organismos. Esse paralelismo é reforçado pela emissão floral restrita ao amanhecer, que coincide com a atividade crepuscular das *Ptiloglossa*, e pelo dimorfismo sexual em suas glândulas, indicativo de funções em comunicação intraespecífica, possivelmente ligadas a atração sexual ou territorialidade. Tais adaptações conjuntas, tanto químicas quanto ecológicas, não apenas podem garantir a polinização eficaz de *P. pohlii*, mas também sugerem que compostos originalmente envolvidos na comunicação das abelhas possam ter sido cooptados pela flor como sinais de atração confiáveis. Esse mecanismo seria especialmente vantajoso em condições de baixa luminosidade, onde estímulos olfativos tornam-se predominantes. Para confirmar a função feromonal desses compostos e desvendar os detalhes dessa fascinante associação, estudos futuros com bioensaios comportamentais são indispensáveis.

3.7. REFERENCIAS

- ACHA, Serena *et al.* The evolutionary history of vines in a neotropical biodiversity hotspot: Phylogenomics and biogeography of a large passion flower clade (*Passiflora* section Decaloba). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 164, p. 107260, nov. 2021.
- ACKERMAN, James D. Coping with the Epiphytic Existence: Pollination Strategies. **Selbyana**, v. 9, n. 1, p. 52–60, 1986.
- ALMEIDA, Eduardo A. B. Colletidae nesting biology (Hymenoptera: Apoidea). **Apidologie**, v. 39, n. 1, p. 16–29, jan. 2008.
- ARAÚJO, Fernanda Figueiredo *et al.* Nocturnal bees exploit but do not pollinate flowers of a common bat-pollinated tree. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 14, n. 6, p. 785–797, 1 dez. 2020.
- ARAÚJO, Priscila *et al.* The advantages of being crepuscular for bees: major pollen gain under low competition during the brief twilight period. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 135, n. 2, p. 251–264, 11 jan. 2022.
- ARAÚJO, Priscila *et al.* Body size and the architecture of the visual system in crepuscular and diurnal bees. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 138, n. 3, p. 328–340, 1 mar. 2023.

ARAÚJO, Priscila *et al.* The role of visual and olfactory floral cues in twilight foraging by *Ptiloglossa* and *Xylocopa* bees. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 78, n. 2, p. 25, fev. 2024.

AYASSE, M.; PAXTON, R. J.; TENGÖ, J. MATING BEHAVIOR AND CHEMICAL COMMUNICATION IN THE ORDER HYMENOPTERA. **Annual Review of Entomology**, v. 46, n. Volume 46, 2001, p. 31–78, 1 jan. 2001.

BAKER, H. G. The Adaptation of Flowering Plants to Nocturnal and Crepuscular Pollinators. **The Quarterly Review of Biology**, 1 mar. 1961.

BARBOSA, José Felinto *et al.* Nocturnal and crepuscular pollination of *Passiflora morifolia* (Passifloraceae): breeding system, floral biology and pollinators. **Darwiniana, nueva serie**, v. 10, n. 1, p. 361–380, jan. 2022.

BERGSTRÖM, Gunnar *et al.* Multicomponent Mandibular Gland Secretions in Three Species of *Andrena* Bees (Hym., Apoidea). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 37, n. 11–12, p. 1124–1129, 1 dez. 1982.

BORGES, Renee; SOMANATHAN, Hema; KELBER, Almut. Patterns and Processes in Nocturnal and Crepuscular Pollination Services. **The Quarterly Review of Biology**, v. 91, p. 389–418, 1 dez. 2016.

BORG-KARLSON, A. K.; TENGÖ, J. Odor mimetism? **Journal of Chemical Ecology**, v. 12, n. 9, p. 1927–1941, 1 set. 1986.

BUCHWALD, Robert; BREED, Michael D. Nestmate recognition cues in a stingless bee, *Trigona fulviventris*. **Animal Behaviour**, v. 70, n. 6, p. 1331–1337, 1 dez. 2005.

BURGER, Hannah *et al.* An arthropod deterrent attracts specialised bees to their host plants. **Oecologia**, v. 168, n. 3, p. 727–736, 1 mar. 2012.

CARNEIRO, Liedson Tavares; MARTINS, Celso Feitosa. Africanized honey bees pollinate and preempt the pollen of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) flowers. **Apidologie**, v. 43, n. 4, p. 474–486, 1 jul. 2012.

CHEN, Chun *et al.* Private channel: a single unusual compound assures specific pollinator attraction in *Ficus semicordata*. **Functional Ecology**, v. 23, n. 5, p. 941–950, 2009.

CORDEIRO, G. D. *et al.* Pollination of *Campomanesia phaea* (Myrtaceae) by night-active bees: a new nocturnal pollination system mediated by floral scent. **Plant Biology**, v. 19, n. 2, p. 132–139, 2017.

CORDEIRO, Guaraci D. *et al.* Nocturnal Bees as Crop Pollinators. **Agronomy**, v. 11, n. 5, p. 1014, 20 maio 2021.

COSTA, N.; CERDEIRA, L. Crepuscular pollination and reproductive ecology of *Trembleya laniflora* (Melastomataceae), an endemic species in mountain rupestrian grasslands. **Flora**, v. 238, p. 138–147, 1 jan. 2018.

CRUZ-LANDIM, Carminda. Estudo comparativo de algumas glândulas das abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e respectivas implicações evolutivas. **Arquivos de Zoologia**, v. 15, n. 3, p. 177–290, 1967.

CRUZ-LANDIM, Carminda; ABDALLA, Fabio Camargo; GRACIOLI-VITTI, Luciana Fioretti. Morphological and functional aspects of volatile-producing glands in bees (Hymenoptera: Apidae). **Insect Science**, v. 12, n. 6, p. 467–480, dez. 2005.

CRUZ-LANDIM, Carminda da Cruz. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. [S.l.]: Editora UNESP, 2009.

CRUZ-LANDIM, C. da; HOFLING, MCA; IMPERATRIZ-FONSECA, VL. Tergal and mandibular glands in queens of *Paratrigona subnuda* (Moore)(Hymenoptera: Apidae). Morphology and associated behaviour. 1980.

CRUZ-LANDIM, Carminda da; GRACIOLI-VITTI, Luciana Fioretti; ABDALLA, Fábio Camargo. Ultrastructural studies of the mandibular gland of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836 (Apidae, Meliponini): a comparison between workers and queens. **Journal of Apicultural Research**, v. 50, n. 4, p. 306–315, 1 jan. 2011.

DANI, K. G. Srikanta *et al.* Diversification of petal monoterpene profiles during floral development and senescence in wild roses: relationships among geraniol content, petal colour, and floral lifespan. **Oecologia**, v. 197, n. 4, p. 957–969, 1 dez. 2021.

DOBSON, Heidi E. M.; DANIELSON, Erica M.; WESEP, Isaac D. Van. Pollen odor chemicals as modulators of bumble bee foraging on *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae). **Plant Species Biology**, v. 14, n. 2, p. 153–166, 1999.

DÖTTERL, S. *et al.* Nursery pollination by a moth in *Silene latifolia*: the role of odours in eliciting antennal and behavioural responses. **New Phytologist**, v. 169, n. 4, p. 707–718, 2006.

DÖTTERL, S.; JÜRGENS, A. Spatial fragrance patterns in flowers of *Silene latifolia*: Lilac compounds as olfactory nectar guides? **Plant Systematics and Evolution**, v. 255, n. 1, p. 99–109, 1 set. 2005.

DÖTTERL, S.; VEREECKEN, N. J. The chemical ecology and evolution of bee–flower interactions: a review and perspectives. **Canadian Journal of Zoology**, v. 88, n. 7, p. 668–697, jul. 2010.

DÖTTERL, Stefan *et al.* 1, 4-Dimethoxybenzene, a floral scent compound in willows that attracts an oligolectic bee. **Journal of chemical Ecology**, v. 31, n. 12, p. 2993, 2005.

FARIA, Flávia Santos; STEHMANN, João Renato. Biologia reprodutiva de *Passiflora capsularis* L. e *P. pohlii* Mast. (Decaloba, Passifloraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 1, p. 262–269, mar. 2010.

FRANCO, Emanuella Lopes; GIMENES, Miriam. Pollination of *Cambessedesia wurdackii* in Brazilian campo rupestre vegetation, with special reference to crepuscular bees. **Journal of Insect Science**, v. 11, n. 1, p. 97, 1 jan. 2011.

- FRANKIE, Gordon W.; VINSON, S. B.; COVILLE, Rollin E. Territorial Behavior of *Centris adani* and Its Reproductive Function in the Costa Rican Dry Forest (Hymenoptera: Anthophoridae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 53, n. 4, p. 837–857, 1980.
- GALVANI, Gerónimo L.; SETTEMBRINI, Beatriz P. Comparative morphology of the head glands in species of Protepeolini and Emphorini (Hymenoptera: Apidae). **Apidologie**, v. 44, n. 4, p. 367–381, 1 jul. 2013.
- GRACIOLI-VITTI, Luciana Fioretti; ABDALLA, Fábio Camargo. Comparative ultrastructure of the mandibular gland in *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) workers and males. v. 23, n. 3–4, p. 415–424, 2006.
- GREINER, Birgit *et al.* Neural organisation in the first optic ganglion of the nocturnal bee *Megalopta genalis*. **Cell and Tissue Research**, v. 318, n. 2, p. 429–437, 1 nov. 2004.
- GREINER, Birgit; RIBI, Willi A.; WARRANT, Eric J. Retinal and optical adaptations for nocturnal vision in the halictid bee *Megalopta genalis*. **Cell and Tissue Research**, v. 316, n. 3, p. 377–390, 1 jun. 2004.
- HEFETZ, A.; BATRA, S. W. T.; BLUM, M. S. Linalool, neral and geranial in the mandibular glands of *Colletes* bees — an aggregation pheromone. **Experientia**, v. 35, n. 3, p. 319–320, mar. 1979.
- HEFETZ, Abraham. Function of secretion of mandibular gland of male in territorial behavior of *Xylocopa sulcatipes* (Hymenoptera: Anthophoridae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 9, n. 7, p. 923–931, 1 jul. 1983.
- HEFETZ, Abraham. The role of Dufour's gland secretions in bees. **Physiological Entomology**, v. 12, n. 3, p. 243–253, 1987.
- HOWELL, Anna D.; ALARCÓN, Ruben. *Osmia* bees (Hymenoptera: Megachilidae) can detect nectar-rewarding flowers using olfactory cues. **Animal Behaviour**, v. 74, n. 2, p. 199–205, 1 ago. 2007.
- JAKUBSKA-BUSSE, Anna *et al.* Chemical Insect Attractants Produced by Flowers of *Impatiens* spp. (Balsaminaceae) and List of Floral Visitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 24, p. 17259, jan. 2023.
- JUNKER, Robert; BLÜTHGEN, Nico. Floral scents repel potentially nectar-thieving ants. **Evolutionary Ecology Research**, v. 10, n. 2, p. 295, 2008.
- JUNKER, Robert; PARACHNOWITSCH, AL. Working towards a holistic view on flower traits - How floral scents mediate plant-animal interactions in concert with other floral characters. **JOURNAL OF THE INDIAN INSTITUTE OF SCIENCE**, p. 43–67, 2015.
- JÜRGENS, Andreas; DÖTTERL, Stefan; MEVE, Ulrich. The chemical nature of fetid floral odours in stapeliads (Apocynaceae-Asclepiadoideae-Ceropegieae). **New Phytologist**, v. 172, n. 3, p. 452–468, 2006.

KELBER, Almut *et al.* Light intensity limits foraging activity in nocturnal and crepuscular bees. **Behavioral Ecology**, v. 17, n. 1, p. 63–72, 1 jan. 2006.

KNUDSEN, Jette T.; ANDERSSON, Susanna; BERGMAN, Peter. Floral Scent Attraction in *Geonoma macrostachys*, an Understorey Palm of the Amazonian Rain Forest. **Oikos**, v. 85, n. 3, p. 409–418, 1999.

KRUG, Cristiane *et al.* Nocturnal Bee Pollinators Are Attracted to Guarana Flowers by Their Scents. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, Carlos A. *et al.* Floral Volatiles: A Promising Method to Access the Rare Nocturnal and Crepuscular Bees. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 9, 2021.

MILET-PINHEIRO, Paulo *et al.* The Chemical Basis of Host-Plant Recognition in a Specialized Bee Pollinator. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 11, p. 1347–1360, 1 dez. 2013.

MOLET, Mathieu; CHITTKA, Lars; RAINE, Nigel E. How floral odours are learned inside the bumblebee (*Bombus terrestris*) nest. **Naturwissenschaften**, v. 96, n. 2, p. 213–219, 1 fev. 2009.

MÜLLER, Marianne; BUCHBAUER, Gerhard. Essential oil components as pheromones. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 26, n. 6, p. 357–377, 2011.

O'CARROLL, David C.; WARRANT, Eric J. Vision in dim light: highlights and challenges. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 5 abr. 2017.

RAGUSO, Robert A. Wake Up and Smell the Roses: The Ecology and Evolution of Floral Scent. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 39, n. 1, p. 549–569, 1 dez. 2008.

ROBERTS, Radclyffe B. Biology of the Crepuscular Bee *Ptiloglossa guinnae* N. Sp. with Notes on Associated Bees, Mites, and Yeasts. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 44, n. 3, p. 283–294, 1971.

ROBERTSON, Charles. Heterotropic Bees. **Ecology**, v. 6, n. 4, p. 412–436, 1925.

SALLES, H. C.; CRUZ-LANDIM, C. Effect of the juvenile hormone on the development of the mandibular gland in workers' pupae of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, p. 691–695, 2004.

SCHIESTL, F. P.; AYASSE, Manfred. Post-mating odor in females of the solitary bee, *Andrena nigroaenea* (Apoidea, Andrenidae), inhibits male mating behavior. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 48, n. 4, p. 303–307, 1 set. 2000.

SCHIESTL, Florian P. The evolution of floral scent and insect chemical communication. **Ecology Letters**, v. 13, n. 5, p. 643–656, 2010.

SIQUEIRA, Estefane *et al.* Pollination of *Machaerium opacum* (Fabaceae) by nocturnal and diurnal bees. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 12, n. 5, p. 633–645, 1 out. 2018.

SLESSOR, Keith N.; WINSTON, Mark L.; LE CONTE, Yves. Pheromone communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Journal of chemical ecology**, v. 31, n. 11, p. 2731–2745, 2005.

STEFANINI, Mario; MARTINO, Cesare De; ZAMBONI, Luciano. Fixation of Ejaculated Spermatozoa for Electron Microscopy. **Nature**, v. 216, n. 5111, p. 173–174, out. 1967.

VARASSIN, Isabela Galarda; TRIGO, José Roberto; SAZIMA, Marlies. The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in south-eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 136, n. 2, p. 139–152, 1 jun. 2001.

VELEZ-RUIZ, Rita. A Revision of the Bee Genus *Ptiloglossa* Smith (Hymenoptera: Colletidae: Diphaglossinae). **Electronic Theses and Dissertations**, 1 jan. 2015.

VINSON, S. B. *et al.* Mandibular glands of male *Centris adani*, (Hymenoptera: Anthophoridae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 8, n. 2, p. 319–327, 1 fev. 1982.

VINSON, S. B. *et al.* Comparative morphology and chemical contents of male mandibular glands of several *Centris* species (Hymenoptera: Anthophoridae) in Costa Rica. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 77, n. 4, p. 685–688, 1 jan. 1984.

WARRANT, Eric J. *et al.* Nocturnal Vision and Landmark Orientation in a Tropical Halictid Bee. **Current Biology**, v. 14, n. 15, p. 1309–1318, 10 ago. 2004.

WARRANT, Eric J. The remarkable visual capacities of nocturnal insects: vision at the limits with small eyes and tiny brains. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 5 abr. 2017.

WCISLO, William T. *et al.* The evolution of nocturnal behaviour in sweat bees, *Megalopta genalis* and *M. ecuadoria* (Hymenoptera: Halictidae): an escape from competitors and enemies?: NOCTURNAL BEHAVIOUR IN BEES. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 83, n. 3, p. 377–387, 20 out. 2004.

WESOŁOWSKA, A.; DOROTA, J. Mineral elements and chemical composition essential oil from leaves and flowers of selected lemon-scented *Ocimum* species. **ResearchGate**, 7 ago. 2025.

ZHANG, Yiyang *et al.* Floral scent emission of *Epiphyllum oxypetalum*: discovery of its cytosol-localized geraniol biosynthesis. **Horticulture Research**, v. 12, n. 5, p. uhaf039, 1 maio 2025.