



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



**Nectários extraflorais em *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem (Cucurbitaceae):
anatomia e respostas morfofisiológicas em função do *status* nutricional
e herbivoria.**

Poliana Fernandes Souza Lima

Belo Horizonte - MG
Fevereiro - 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



**Nectários extraflorais em *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem (Cucurbitaceae):
anatomia e respostas morfofisiológicas em função do *status* nutricional
e herbivoria.**

Poliana Fernandes Souza Lima

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Linha de pesquisa: Botânica - Morfologia Vegetal - Anatomia Vegetal

Orientação: Prof. Dr. Élder Antônio Sousa e Paiva

Belo Horizonte - MG
Fevereiro – 2016

“Ensine sempre o que você aprendeu (...) Em um estado sombrio nós nos encontramos (...) e um pouco mais de conhecimento ilumina nosso caminho”

(Mestre Yoda- *Star Wars*)

AGRADECIMENTOS

O árduo trajeto que leva à conclusão de uma dissertação de mestrado é uma experiência enriquecedora e cheia de superações. A cada novo obstáculo nos deparamos com barreiras quase intransponíveis, que se tornam muito mais simples na presença de pessoas especiais que, direta ou indiretamente, participam conosco desta jornada. Para aqueles que compartilharam deste momento, segue o meu muito obrigado.

Muito obrigado ao povo brasileiro que, por meio dos muitos impostos e lutas, possibilitou que eu estivesse aqui, cursando uma universidade pública, gratuita e de qualidade.

Meu muito obrigado ao Professor Orientador Élder Paiva, por sua paciência, carinho e ensinamentos, por acreditar em mim, me mostrar o caminho da ciência, e fazer parte da minha vida acadêmica nos momentos bons e ruins. Mas, principalmente, por ser o exemplo de profissional que sempre irá fazer parte da minha vida.

À minha família que soube compreender minha ausência neste período. Em especial quero agradecer à minha mãe que esteve presente desde o momento da coleta até a apresentação dos resultados. Por seu apoio e amor incondicional.

Aos Professores Cléber Cunha, Denise Trombert e Luzia Modolo por todo o incentivo, apoio e ideias que trocamos.

Aos técnicos do Centro de microscopia pelo auxílio na obtenção das imagens de microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

Ao Professor Cléber Cunha e ao graduando Agnello Picorelli por todo seu auxílio e paciência no árduo caminho das ciências estatísticas. E principalmente ao Alberto Teixeira, por toda sua dedicação e estímulo que acabou impulsionando este trabalho.

Aos amigos, que fizeram desse momento um pouco mais leve com sua alegria e com palavras de incentivo e com momentos de reflexão científica (no bar). Ao Cláudio Rosmaninho e Neide Raphael, pelas desventuras gastronômicas que tornaram meus fins de semana um pouco mais divertidos e instrutivos.

Ao Pedro Brandão, por saber deixar tudo mais leve, mais divertido. Por compartilhar comigo os momentos dramáticos desse percurso. Por saber ouvir os

intermináveis discursos sobre o projeto, o trabalho, os resultados. Por estar ao meu lado, colaborando e compartilhando todos os momentos.

As minhas amigas: Camila, Maria Letícia, Priscilla, Solange e Thayse, por todo apoio no projeto e na vida. Por todos os litros de água deionizada que carregaram comigo, por todas as tabelas, gráficos, textos e lamentações que escutaram.

Aos meus irmãos de coração: Bárbara Oliveira, Cintia Almeida, Glauber Romães, Mariana Araújo, Pedro (Jedi) Cornélio, Samantha Mourão, Saulo Romães, e tantos outros.

Aos técnicos Wagner Afonso Rocha e Maria do Socorro Silva pelo apoio técnico excepcional.

Agradeço ao querido Rodrigo Teixeira Ávila e ao professor Fábio Murilo DaMatta, do Laboratório de Metabolismo e Nutrição Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, que auxiliaram nas análises de néctar.

Aos colegas de laboratório pelo convívio e apoio.

A todos os colegas e professores da pós-graduação em Biologia Vegetal pelo convívio e aprendizado.

E, por fim, a todos aqueles que por um lapso não mencionei, mas que colaboraram para esta pesquisa: abraços fraternos a todos!

“A gente só conhece bem as coisas que cativou - disse a raposa.
- Os homens não têm mais tempo de conhecer coisa alguma. Compram tudo já pronto nas lojas. Mas como não existem lojas de amigos, os homens não têm mais amigos. Se tu queres um amigo, cativa-me!”

O Pequeno Príncipe- Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	6
CAPÍTULO I – Anatomia, histoquímica e ultraestrutura dos nectários extraflorais de <i>Luffa cylindrica</i> (L.) M. Roem (Cucurbitaceae).....	9
Resumo.....	10
Abstract.....	11
Introdução.....	12
Materiais e métodos.....	13
Resultados.....	14
<i>Localização</i>	14
<i>Anatomia e Histoquímica</i>	15
<i>Caracterização ultraestrutural</i>	16
Discussão.....	23
<i>Localização</i>	23
<i>Anatomia, Histoquímica e Caracterização ultraestrutural</i>	24
Referências Bibliográficas.....	26
CAPÍTULO II – As respostas estruturais e metabólicas dos nectários extraflorais de <i>Luffa cylindrica</i> (L.) M. Roem (Cucurbitaceae) variam com o status	

nutricional e herbivoria.....	29
Resumo.....	30
Abstract.....	31
Introdução.....	32
Materiais e métodos.....	34
Obtenção das plântulas.....	34
Solução nutritiva.....	35
Herbivoria.....	35
Análise química do néctar.....	36
Análise estatística.....	37
Resultados.....	38
Discussão.....	43
Referências Bibliográficas.....	47

1 RESUMO

2 Nectários extraflorais (NEFs) são estruturas secretoras que estão comumente
3 envolvidos na defesa indireta da planta. Em *Luffa cylindrica* estas estruturas estão
4 presentes nas folhas, caules e nos frutos. Nas folhas os NEFs estão dispostos na face
5 abaxial do limbo e das estípulas, podendo ocorrer também no pecíolo e em folhas
6 modificadas como brácteas e bractéolas. Os nectários encontram-se funcionais e
7 atraem formigas desde os estágios iniciais de expansão dos órgãos aos quais estão
8 associados, sendo que a atividade secretora se estende até a senescência de tal
9 órgão. A diferenciação e o processo secretor dos NEFs podem ser induzidos por
10 herbivoria e/ou danos artificiais e, portanto, podem ser assim considerados como uma
11 resposta de defesa induzida. Neste trabalho foram estudadas a organização estrutural
12 e ultraestrutural dos NEFs; avaliou-se, ainda, os efeitos de diferentes *status*
13 nutricionais e de herbivoria no número de nectários e concentração de açúcares do
14 néctar. Plantas cultivadas em três diferentes concentrações de nutrientes (10, 50 e
15 100% de nutrientes na solução nutritiva) foram submetidas à herbivoria simulada
16 mantendo-se um grupo controle em cada tratamento. O néctar foi coletado em todos
17 os tratamentos para análise quantitativa dos açúcares. Após a expansão de dez folhas
18 pós herbivoria, área foliar foi mensurada e o número de nectários contabilizado. Houve
19 variação significativa no número de nectários para cada tratamento, principalmente no
20 grupo cultivado a 10% onde as plantas que sofreram herbivoria apresentaram menor
21 densidade de nectários que aquelas do grupo controle. Porém isso se deu em função
22 do aumento da área foliar naquelas que sofreram herbivoria. Os resultados sugerem
23 que *Luffa cylindrica*, sob déficit nutricional, investe mais na produção de tecido
24 fotossintetizante quando submetida ao ataque de herbívoros. Por outro lado, plantas
25 cultivadas com níveis adequados de nutrientes investem em um néctar com maior
26 quantidade de açúcares.

27

28 **Palavras-chave:** *Luffa cylindrica*, nectário extrafloral, néctar, anatomia vegetal,
29 nutrição, herbivoria.

1 **ABSTRACT**

2 Extrafloral nectaries (EFNs) are secretory structures commonly involved in the indirect
3 defence of plants. In *Luffa cylindrica*, these structures occur in leaves, stems and fruits.
4 In leaves, EFNs are present on the lower surface and the stipules, and can also occur
5 in the petiole and modified leaves such as bracts and bracteoles. EFNs are functional
6 and attract ants from the initial stages of the development of their associated organs
7 and the secretory activity is prolonged until the senescence of such organs. EFNs
8 differentiation and secretor process are generally induced by herbivory and/or artificial
9 damage and, consequently, are considered as a induced defence response. In this
10 work, the structural and ultrastructural organization of EFNs were studied; also, the
11 effects of different nutritional *status* and herbivory on the occurrence of nectaries
12 number and sugar concentration of nectar were analysed. Plants growing in three
13 different nutrient concentrations (10, 50 and 100% of nutrients in the nutritive solution)
14 were subjected to simulated herbivore, leaving a control group (i.e. without herbivory)
15 per nutrient concentration. Nectar was collected from all treatments to quantitative
16 analyses of sugars. Following the growth of ten leaves post-herbivory, leaf area was
17 measured and the nectary number was counted. There was significant variation in
18 nectary number per treatment, especially in plants growing at 10% with herbivory,
19 which showed less nectary density in relation to control plants. However, this pattern
20 was significantly related to leaf area increase in those plants suffering herbivory. The
21 results suggest that *Luffa cylindrica* allocates more resources in photosynthetic tissue
22 when subjected to herbivore attack under nutritional deficit. Likewise, plants growing
23 under suitable levels of nutrients invest in nectar containing a greater amount of
24 sugars.

25

26 **Keywords:** *Luffa cylindrica*, extrafloral nectary, nectar, plant anatomy, nutrition,
27 herbivory.

1 INTRODUÇÃO GERAL

2 As plantas possuem diversas estruturas secretoras atuando das mais diversas
3 formas. Os nectários são estruturas secretoras envolvidas na secreção de néctar e
4 podem ser classificados conforme sua posição, sendo florais aqueles presentes em
5 peças florais, e extraflorais aqueles presentes em órgãos não-reprodutivos (Schmid
6 1988). Há ainda a divisão em nectários nupciais e extranupciais, aqueles que não
7 estão diretamente ligados à polinização (Delpino 1868-1875 *apud* Schmid 1988).

8 Nectários extraflorais (NEFs) apresentam grande diversidade estrutural, bem
9 como ampla ocorrência em vários táxons (Heil *et al.* 2000; Weber 2013) sendo mais
10 abundantes em comunidades tropicais que em temperadas (Oliveira *et al.* 1999).
11 Muitas vezes os NEFs são utilizados como caracteres distintivos, de grande valor
12 diagnóstico, como em Leguminosae, onde podem ser úteis, por exemplo, na distinção
13 de espécies e variedades do gênero *Cassia* (Bhattacharyya e Maheshwari 1971).

14 A família Cucurbitaceae possui várias espécies portadoras de nectários
15 extraflorais, entre elas *Luffa cylindrica*. Os NEFs de *L. cylindrica* foram estudados
16 inicialmente por Chakravarty (1948) que além de reportar a interação destas estruturas
17 com insetos, descreveu a organização anatômica em microscopia de luz.

18 Enquanto os nectários florais atuam mediando o processo de polinização
19 (Janzen 1966; Oliveira 1997), os NEFs estão comumente voltados para a defesa
20 indireta da planta e podem ser vistos como um tipo de defesa biótica, aquela que
21 representa uma associação de uma espécie com outra que, por sua presença e
22 atividade, irá promover a proteção (Bentley 1977; Del Claro 2012; Weber 2013).

23 Diversas espécies vegetais, distribuídas em pelo menos 109 famílias e 801
24 gêneros, produzem nectários extraflorais (Keeler 2016). Embora estes nectários não
25 estejam diretamente envolvidos na polinização, são visitados por diversos insetos (Heil
26 *et al.* 2001) e atuam como mediadores de interações simbióticas. Com estes nectários
27 a planta é capaz de atrair predadores como formigas e vespas, ambas defendendo-a
28 contra herbívoros (Heil e McKey 2003; Leitão *et al.* 2005). Além destes, outros insetos
29 visitam os NEFs, se alimentam do néctar, mas não fornecem proteção à planta, a
30 esses visitantes damos o nome de pilhadores de néctar (Heil *et al.* 2004).

31 De maneira geral, os nectários (tanto florais quanto extraflorais) consistem de
32 três componentes básicos: i) epiderme, que pode apresentar ou não estômatos ou
33 tricomas, por onde o néctar é liberado; ii) parênquima especializado que produz ou
34 armazena os solutos do néctar; iii) tecidos vasculares, usualmente com maior

1 proporção de floema (Fahn 2000; Paccini *et al.* 2003). Geralmente o néctar possui
2 mais açúcares se comparado ao fluido do floema, porém, quantidades similares de
3 aminoácidos e sais minerais são observadas estando, no entanto, sujeitas a variações
4 bióticas, temporais e espaciais (Baker *et al.* 1978; Heil *et al.* 2000).

5 Evidências indicam que o néctar é proveniente do floema, sendo modificado
6 pelo parênquima especializado do nectário (Fahn 1979), porém essa visão é muito
7 simplificada e discutível (Nicolson *et al.* 2007). Alguns autores sugerem que parte do
8 açúcar pode ter origem nos produtos da fotossíntese do próprio nectário ou,
9 provavelmente, em outros órgãos da planta, em que o amido pode ser um produto
10 intermediário de armazenamento (Nicolson *et al.* 2007). A hidrólise do amido
11 armazenado torna possível a alta produção de néctar em qualquer momento do dia
12 (Pacini *et al.* 2003), sendo bastante comum nos nectários florais.

13 A secreção dos NEFs é induzida por herbivoria e/ou danos artificiais e,
14 portanto, pode ser considerada uma resposta de defesa induzida. Essa resposta pode
15 se dar em nível anatômico, com a planta produzindo maior número de nectários, ou
16 em nível fisiológico, com a secreção de maior quantidade de néctar ou ainda de um
17 néctar de melhor qualidade (Heil *et al.* 2000). Algumas plantas são capazes de alterar
18 o volume e/ou composição do néctar, aumentando assim as chances de atrair
19 parceiros para uma relação mutualística (Stephenson 1982). O surgimento de novos
20 NEFs também é potencialmente induzido em resposta à herbivoria. A produção
21 adicional de NEFs pode resultar em maior quantidade de néctar disponível, o que
22 auxilia a planta no recrutamento de novos parceiros mutualísticos quando na presença
23 de herbívoros. Indução de NEFs em resposta de dano por herbivoria (simulada ou
24 natural) apenas é documentada em um número limitado de espécies (Pulice e Packer
25 2008), mas a cada dia, mais trabalhos tem surgido apontado novas espécies em que
26 essa relação ocorre.

27 A plasticidade fenotípica permite que as plantas produzam mais recompensas,
28 de modo que os benefícios sejam maximizados e os custos da produção minimizados
29 (Moran *et al.* 1992). Esta mesma plasticidade é, muitas vezes, dano-e-recurso
30 dependente (Mondor *et al.* 2006). Ou seja, quanto mais danos a planta sofrer, mais ela
31 investirá em proteção. O mesmo pode ser dito dos recursos, pois quanto mais
32 recursos, maior o investimento.

33 As formigas muitas vezes aumentam a sobrevivência da planta ao aumentar
34 seu *fitnes* por minimizar os danos causados por herbívoros (Heil *et al.* 2001). Alguns
35 autores acreditam que o dano inicial causado pelo herbívoro ativa uma via de

1 sinalização de octadecanoides que controlaria o fluxo dos nectários (Heil *et al.* 2001)
2 ou ainda, leva à secreção de compostos voláteis que atraem os predadores daquele
3 herbívoro sendo ainda são capazes de desencadear a mesma resposta em plantas
4 vizinhas, que não estavam sob ataque (Dicke *et al.* 1990).

5 Tanto o dano causado pelo herbívoro, quanto a herbivoria simulada causariam
6 o mesmo efeito (Heil *et al.* 2001), o incremento da produção de néctar. Isso indica que
7 não há uma molécula elicitora específica que desencadeie esta resposta, embora ainda
8 não se possa afirmar categoricamente que não haja uma via secundária que explique
9 esse processo (Heil *et al.* 2001). Apesar de a aplicação de ácido jasmônico exógeno
10 desencadear resposta semelhante, a produção de néctar é menor quando comparado
11 ao resultado obtido com a simulação de herbivoria (Heil *et al.* 2001). As respostas
12 químicas induzidas pela herbivoria são amplamente documentadas, porém menos
13 atenção é dada às respostas morfológicas induzidas, particularmente aquelas que
14 medeiam proteções mutualísticas (Pulice e Packer 2008).

15 Para a planta, investir em estruturas atrativas de defensores, como NEFs, tem
16 certo custo em termos energéticos. Toda essa energia e recurso poderiam ser
17 investidos em crescimento e reprodução. Visto isso, é esperado que a planta dispenda
18 mais energia nesse processo quando está em condições de estresse biótico e em um
19 ambiente que lhe forneça nutrientes suficientes (Kersch e Fonseca 2005).

20 Apesar dos estudos sobre a ecologia e anatomia dos nectários extraflorais de
21 *Luffa cylindrica*, inexistem dados acerca do processo de secreção de néctar nestes
22 nectários, bem como da organização ultraestrutural e das relações entre
23 características do protoplasto e síntese do néctar. Do mesmo modo, inexistem dados
24 acerca das respostas estruturais e metabólicas destes nectários sob o efeito de
25 diferentes concentrações nutricionais e herbivoria. Assim, este trabalho tem por
26 objetivos:

- 27 1) A caracterização anatômica estrutural, ultraestrutural e histoquímica
28 destes nectários;
- 29
- 30 2) Avaliar as respostas estruturais e metabólicas dos nectários
31 extraflorais de *Luffa cylindrica* em diferentes concentrações
32 nutricionais e sob efeito de herbivoria.

1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2 **Baker HG, Opler P, Baker I. 1978.** A comparison of the amino acid complements of
3 floral and extrafloral nectaries. *Botanical Gazette* **139**:322–332.
- 4 **Bentley BL. 1977.** Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards.
5 *Annual Review of Ecology and Systematics* **8**:407–427.
- 6 **Bhattacharyya B, Maheshwari JK. 1971.** Studies on extrafloral nectaries of the
7 Leguminales I. Papilionaceae, with a discussion on the systematics of the
8 Leguminales. *Proceedings of the Indian National Science Academy* **37**:11–30.
- 9 **Chakravarty HL. 1948.** Extrafloral glands of Cucurbitaceae. *Nature* **162**:576–577.
- 10 **Del Claro C, Torezan-Silingardi HM. 2012.** *Ecologia das interações plantas-animais:*
11 *uma abordagem ecológico-evolutiva.* 1ª ed. Rio de Janeiro, Technical Books.
- 12 **Delpino F. 1886.** Funzione mirmecofila nel regno vegetale. *In: Memoire della R.*
13 *Accademia delle Scienze dell'Istituto di Bologna* **7**:215–392.
- 14 **Dicke M, Sabelis MW, Takabayashi J, Bruin J, Posthumus MA. 1990.** Plant
15 strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals:
16 prospects for application in pest control. *Journal of Chemical Ecology* **16**:3091–
17 3118.
- 18 **Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants.* New York: Academic Press.
- 19 **Fahn A. 2000.** Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical*
20 *Research* **31**:37–75.
- 21 **Heil M, Fiala B, Baumann B, Linsenmair KE. 2000.** Temporal, spatial and biotic
22 variations in extrafloral nectaries secretion by *Macaranga tanarius*. *Functional*
23 *Ecology* **14**:749–757.
- 24 **Heil M, Koch T, Hilpert A, Fiala B, Boland W, Linsenmair KE. 2001.** Extrafloral
25 nectar production of the ant-associated plant, *Macaranga tanarius*, is an induced,
26 indirect, defensive response elicited by jasmonic acid. *Ecology* **38**:1083–1088.
- 27 **Heil M, McKey D. 2003.** Protective ant-plant interactions as model systems in
28 ecological evolutionary research. *Annual Review of Ecology and Systematics*
29 **34**:425–453.

- 1 **Heil M; Feil D; Hilpert A; Linsenmair KE. 2004.** Spatiotemporal patterns in indirect
2 defence of a South-East Asian ant-plant support the optimal defence hypothesis.
3 *Journal of Tropical Ecology* **20**:573–580.
- 4 **Janzen DH. 1966.** Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central
5 America. *Evolution* **20**:249–275.
- 6 **Keeler KH. 2016.** *World list of plants with extrafloral nectaries.*
7 <http://bioscilabs.unl.edu/Emeriti/keeler/extrafloral/worldlistfamilies.htm>. Acesso em
8 janeiro de 2016.
- 9 **Kersch MF, Fonseca CR. 2005.** Abiotic factors and the conditional outcome of an ant-
10 plant mutualism. *Ecology*, **86**:2117–2126.
- 11 **Leitão CA, Meira RMSA, Azevedo AA, Araujo JM de, Silva KLF, Collevatti RG.**
12 **2005.** Anatomy of the floral, bract, and foliar nectaries of *Triumfetta semitriloba*
13 (Tiliaceae). *Canadian Journal of Botany* **83**:279–286.
- 14 **Mondor EB, Tremblay MN, Messing RH. 2006.** Extrafloral nectary phenotypic
15 plasticity is damage- and resource dependent in *Vicia faba*. *Biology Letters* **2**:583–
16 585.
- 17 **Moran NA. 1992.** The evolutionary maintenance of alternative phenotypes. *American*
18 *Naturalist* **139**: 971–989.
- 19 **Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. 2007.** *Nectaries and nectar*. Springer-Verlag, The
20 Netherlands.
- 21 **Oliveira PS. 1997.** The ecological function of the extrafloral nectaries: herbivore
22 deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliense*
23 (Caryocaraceae). *Functional Ecology* **11**:323–330.
- 24 **Oliveira PS, Rico-Gray V, Díaz Castelazo C, Castillo-Guevara C. 1999.** Interactions
25 between ants, extrafloral nectaries and insects herbivores in neotropical coastal
26 sand dunes: herbivore deterrence by visiting ants increases fruit set in *Opuntia*
27 *stricta* (Cactaceae). *Functional Ecology* **13**:623–631.
- 28 **Pacini E, Nepi M, Vesprini JL. 2003** Nectar biodiversity: a short review. *Plant*
29 *Systematics and Evolution* **238**:7–22.
- 30 **Pulice CE, Packer AA. 2008.** Simulated herbivory induces extrafloral nectary
31 production in *Prunus avium*. *Functional Ecology* **22**:801-807.

- 1 **Schmid R. 1988.** Reproductive versus extra-reproductive nectaries – historical
2 perspective and terminological recommendations. *Botanical Review* **54**:179–232
- 3 **Stephenson AG. 1982.** The role of the extrafloral nectaries of *Catalpa speciosa* in
4 limiting herbivory and increasing fruit production. *Ecology* **63**:663–669.
- 5 **Weber MG, Keeler KH. 2013.** The phylogenetic distribution of extrafloral nectaries in
6 plants. *Annals of Botany* **111**:1251–1261.

Capítulo 1

**Anatomia, histoquímica e ultraestrutura dos nectários
extraflorais de *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem (Cucurbitaceae)**

1 RESUMO

2 A bucha vegetal, *Luffa cylindrica*, apresenta nectários extraflorais (NEFs) na face
3 abaxial do limbo foliar, nas estípulas, nos frutos, etc. Neste trabalho foram estudadas a
4 estrutura e ultraestrutura dos NEFs presentes no limbo foliar. Amostras foliares foram
5 coletadas em indivíduos cultivados em hidroponia com nutrição completa, fixadas,
6 processadas para estudos em microscopia de luz e microscopia eletrônica de
7 transmissão e varredura segundo técnicas convencionais. Testes histoquímicos foram
8 realizados para a caracterização dos tecidos e conteúdos celulares. Os nectários, que
9 se apresentam na porção abaxial da lâmina foliar, estão embebidos no mesófilo. A
10 atividade secretora não se limita a uma fase do desenvolvimento da folha, sendo o
11 néctar liberado por toda a vida útil do órgão, cessando apenas na fase senescente,
12 quando os NEFs tornam-se não funcionais. Estes NEFs são compostos por um tecido
13 secretor, camada limítrofe e tecido subglandular. O tecido secretor é envolvido pela
14 camada limítrofe e apenas o tecido subglandular tem contato com os feixes
15 vasculares. No tecido secretor as células são pequenas, apresentam citoplasma
16 denso, núcleo volumoso, inúmeras mitocôndrias, plastídios, gotas de óleo dispersas
17 no citosol, dictiossomos e segmentos de retículo endoplasmático liso. A camada
18 limítrofe apresenta células justapostas, vacuoladas e citoplasma pouco denso.
19 Observa-se nesta camada a presença de diversos grânulos elétron-densos
20 interpretados aqui como precursores da síntese de lignina. O tecido subglandular
21 apresenta células maiores quando comparado aos demais tecidos, citoplasma pouco
22 denso, cloroplastos e mitocôndrias. O néctar é liberado para o meio externo através de
23 rupturas cuticulares e não apresenta quantidade significativa de lipídios em sua
24 composição.

25 **Palavras-chave:** Nectários extraflorais, *Luffa cylindrica*, anatomia, ultraestrutura

1 **ABSTRACT**

2 The sponge gourd, *Luffa cylindrica*, has extrafloral nectaries (EFNs) in the abaxial side
3 of the leaf blade, the stipules, the fruits, etc. In the present work, the structure and
4 ultrastructure of the EFNs located in the leaf blade was studied. Leaf samples were
5 collected from specimens cultivated in a hydroponic system with complete nutrition,
6 fixated, processed for studies in light microscopy, scanning and transmission electron
7 microscopy. Histochemical tests were performed to characterize the plant tissues and
8 cellular content. The nectaries, that were located in the abaxial side of the leaf blade,
9 are embedded in the mesophyll. The secretory activity does not limit itself to one
10 specific stage of the leaf development, with the nectar secreted throughout the entire
11 lifespan of the organ, stopping only in the senescent stage, when the EFNs become
12 non-functional. These EFNs are composed of a secretory tissue, a boundary layer and
13 a sub glandular tissue. The secretory tissue is surrounded by the boundary layer and
14 only the sub glandular tissue is in contact with the vascular bundle. In the secretory
15 tissue the cells are small, with a dense cytoplasm, bulky nucleus, several mitochondria,
16 plastids, oil drops dispersed in the cytosol, dictyosomes and sections of smooth
17 endoplasmic reticulum. The boundary layer has juxtaposing cells, with vacuoles and a
18 not very dense cytoplasm. Several electron-dense granules can be noted in this layer,
19 interpreted here as precursors of lignin biosynthesis. The sub glandular tissue displays
20 bigger cells when compared to the other tissues, not very dense cytoplasm,
21 chloroplasts and mitochondria. The nectar is externally secreted through cuticular
22 ruptures and does not contain significant amount of lipids in its composition.

23 **Key words:** Extrafloral nectaries, *Luffa cylindrica*, anatomy, ultrastructure

1 INTRODUÇÃO

2 Nectários são estruturas secretoras envolvidas na secreção de néctar que
3 podem ser classificados conforme sua posição, sendo florais aqueles presentes em
4 peças florais, e extraflorais aqueles presentes em órgãos não reprodutivos (Schmid
5 1988). Os nectários florais estão diretamente associados ao processo de polinização e
6 são responsáveis pela síntese do néctar ofertado aos polinizadores (Fahn 1979). Já os
7 nectários extraflorais (NEFs) são glândulas que secretam néctar, não estando
8 diretamente ligados à polinização. Estes nectários apresentam grande diversidade
9 estrutural, bem como ampla ocorrência em vários táxons (Heil *et al.* 2000; Weber
10 2013) sendo mais abundantes em comunidades tropicais que em temperadas (Oliveira
11 *et al.* 1999). Muitas vezes os NEFs são utilizados como caracteres distintivos, de
12 grande valor diagnóstico, como em Leguminosae, onde podem ser úteis, por exemplo,
13 na distinção de espécies e variedades do gênero *Cassia* (Bhattacharyya e Maheshwari
14 1971).

15 Diversas espécies vegetais, distribuídas em pelo menos 109 famílias e 801
16 gêneros, produzem nectários extraflorais (Keeler 2016) que, embora não estejam
17 diretamente envolvidos com a polinização, são visitados por diversos insetos (Heil *et al.*
18 2001) e atuam como mediadores de interações simbióticas. Através destes
19 nectários, a planta é capaz de atrair predadores como formigas e vespas, ambas
20 defendendo-a contra herbívoros (Heil e McKey 2003; Leitão *et al.* 2005). Além destes,
21 outros insetos visitam os NEFs, se alimentam do néctar, mas não fornecem proteção à
22 planta, a esses visitantes damos o nome de pilhadores de néctar (Heil *et al.* 2004).

23 O néctar é o principal recurso ofertado pelas plantas como recompensa para a
24 polinização, sendo um recurso energético importante para diversos animais (Nicolson
25 *et al.* 2007). Evidências indicam que o néctar é proveniente do floema, sendo
26 modificado pelo parênquima especializado do nectário (Fahn 1979), porém essa visão
27 é muito simplificada e discutível (Nicolson *et al.* 2007). Alguns estudos propõem que o
28 açúcar pode ter origem nos produtos da fotossíntese do próprio nectário ou,
29 provavelmente, em outros órgãos da planta, em que o amido pode ser um produto
30 intermediário de armazenamento (Nicolson *et al.* 2007). A hidrólise do amido
31 armazenado torna possível a alta produção de néctar a qualquer momento do dia
32 (Pacini *et al.* 2003), sendo bastante comum nos nectários florais.

33 A família Cucurbitaceae é especialmente rica em espécies portadoras de
34 nectários extraflorais, entre elas *Luffa cylindrica* (Chakravarty 1948) que os apresenta
35 em forma de disco e localizados na lâmina foliar, estípulas, brácteas, bractéolas e
36 frutos (Agarwal e Rastogi 2010). Estes NEFs foram estudados inicialmente por

1 Chakravarty (1948) que, além de reportar a interação destas estruturas com insetos,
2 descreveu sua organização anatômica em microscopia de luz. Esta espécie é visitada
3 por insetos pertencentes a cinco diferentes ordens: Hemíptera, Díptera, Coleóptera,
4 Himenóptera e Lepidóptera, sendo as formigas o grupo mais expressivo (Agarwal e
5 Rastogi 2010).

6 Apesar dos estudos sobre a ecologia e anatomia dos nectários extraflorais de
7 *Luffa cylindrica*, inexistem dados acerca do processo de secreção de néctar nestes
8 nectários, bem como da organização ultraestrutural e das relações entre
9 características do protoplasto e síntese do néctar. O objetivo do presente trabalho
10 consiste em descrever os aspectos anatômicos, histoquímicos e ultraestruturais dos
11 NEFs encontrados na lâmina foliar de *Luffa cylindrica*.

12 **MATERIAIS E MÉTODOS**

13 Para os estudos anatômicos e ultraestruturais amostras foram obtidas de
14 indivíduos cultivados em hidroponia em casa de vegetação no campus da
15 Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) no período de dezembro de 2014 a
16 março de 2015.

17 Para microscopia de luz, fragmentos foliares contendo nectários extraflorais
18 foram coletados em folhas jovens totalmente expandidas, as amostras foram fixadas
19 em solução Karnovsky (Karnovsky 1965) por 24 horas, posteriormente desidratadas
20 em série etílica e incluídas em resina (2-hidroxi-etil)-metacrilato Leica®, conforme
21 indicações do fabricante. Cortes transversais e longitudinais, com 6 µm de espessura,
22 foram obtidos em micrótomo rotativo (Zeiss Hyrax M40) e corados com Azul de
23 Toluidina (0,05%, pH 6,8) (O'Brien *et al.* 1964). As lâminas histológicas foram então
24 montadas em resina sintética Entellan®. A observação foi feita em microscópio de luz
25 com câmera acoplada (Leica ICC50 HD), obtendo-se imagens digitais (software Leica
26 Application Suite LAS EZ).

27 Para microscopia eletrônica de transmissão as amostras foram fixadas em
28 solução Karnovsky (Karnovsky 1965) por 24 horas e pós-fixadas com tetróxido de
29 ósmio (1%, tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2). Após serem fixadas, as amostras foram
30 lavadas em tampão e desidratadas em série cetônica. Posteriormente foi feita a
31 inclusão em resina Spurr®, segundo protocolo modificado de Roland (1978). Secções
32 semifinas foram obtidas em ultramicrótomo, montadas em lâminas para microscopia e
33 coradas com azul de toluidina (0,05%, pH 4,7) (O'Brien *et al.* 1964). Cortes ultrafinos

1 foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e posteriormente
2 examinados em microscópio de transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI a 80kV.

3 Para observação ao microscópio eletrônico de varredura as amostras foram
4 fixadas em solução Karnovsky (Karnovsky 1965) por 24 horas, desidratadas em série
5 etílica, submetidas à secagem ao ponto crítico utilizando CO₂ e metalizadas com ouro
6 (Robards 1978). As amostras foram examinadas ao microscópio eletrônico de
7 varredura modelo FEI Quanta 200.

8 Para a análise histoquímica os seguintes testes, com respectivos controles,
9 foram empregados: sudan red para lipídios (Pearse 1980), lugol para amido (Johansen
10 1940), azul de bromofenol para proteínas (Mazia *et al.* 1953), cloreto férrico para
11 compostos fenólicos, floroglucinol ácido para lignina (Johansen 1940) e NADI para
12 óleos essenciais e terpenos (David e Carde 1964).

13 Para detectar a presença de lipídios no néctar utilizou-se tiras de papel filtro
14 embebidas em néctar e posteriormente expostas ao vapor de tetróxido de ósmio por
15 60 segundos. Como grupo controle utilizou-se tiras de papel embebidas em óleo,
16 submetidas ao mesmo processo. Para detecção de quantidade significativa de
17 açúcares no exsudato, e assim comprovar se tratar mesmo de um nectário, a análise
18 química da secreção foi feita utilizando-se o método enzimático (Praxedes 2006).

19 **RESULTADOS**

20 ***Localização e atividade secretora***

21 Os nectários extraflorais de *Luffa cylindrica* se encontram principalmente na
22 lâmina foliar (Fig. 1A), distribuídos aleatoriamente. Estas estruturas ocorrem, ainda,
23 nas estípulas e caule. O polo secretor, por onde o néctar é liberado, está voltado para
24 a face abaxial da folha (Fig. 1B), entretanto os nectários podem ser reconhecidos
25 também pela face adaxial, como pontos de coloração distinta (Fig. 1C).

26 Observou-se que a secreção de néctar ocorre nos estágios iniciais de
27 desenvolvimento da folha, ao longo dos processos de diferenciação e expansão,
28 perdurando por toda a fase funcional, até que os primeiros sinais de senescência
29 sejam observados. A secreção de néctar é abundante, quando na ausência de
30 formigas e em ambiente protegido. As gotas de néctar apresentam, em apenas 12
31 horas de acúmulo, volume superior ao ocupado pelo tecido secretor do nectário. A
32 secreção é contínua e, em condições de campo e na presença de insetos
33 forrageadores, o volume de néctar sobre o polo secretor é suficiente apenas para

1 deixar úmida a superfície do nectário. Formigas são os forrageadores mais comuns
2 (Fig.1D-E).

3 O néctar produzido acumula-se no espaço subcuticular, distendendo a cutícula
4 até o limite estabelecido pela camada limítrofe, criando ampla bolsa subcuticular (Fig.
5 2A-B). No polo secretor a epiderme é desprovida de estômatos e a cutícula mostrou-
6 se íntegra e destituída de poros ou canais (Fig. 2B). Entretanto, dada a distensão
7 cuticular, foram observadas rupturas cuticulares (Fig. 2C) por meio das quais o néctar
8 extravasa, atingindo a superfície do nectário. Após a liberação do néctar a cutícula
9 acomoda-se novamente sobre as células secretoras; as rupturas raramente são
10 observadas neste estágio (Fig. 2D).

11 **Anatomia e Histoquímica**

12 Os NEFs presentes na lâmina foliar de *Luffa cylindrica* estão embebidos no
13 mesofilo, com o tecido secretor formando leve protuberância voltada para a porção
14 abaxial da folha (Fig. 3A). Estes NEFs consistem de uma região subglandular na qual
15 se observam tecidos vasculares (Fig. 3A-B), uma camada limítrofe e uma epiderme
16 pluriestratificada formando o tecido secretor, cuja camada externa é cuticulada.

17 O tecido subglandular apresenta células com citoplasma denso, núcleo
18 volumoso e amplos espaços intercelulares. Este tecido estabelece ainda o contato do
19 nectário com os feixes vasculares.

20 A camada limítrofe é unisseriada e formada por células justapostas, cujas
21 paredes celulares mostram-se ligeiramente espessadas e lignificadas (Fig. 3C-D);
22 nestas células a lignificação é mais evidente nas faces anticliniais. Testes
23 histoquímicos evidenciaram a presença de compostos fenólicos nas paredes celulares.
24 A camada limítrofe estabelece limite preciso entre o tecido secretor e o tecido
25 subglandular. Observou-se, ainda, que as células desta camada apresentam
26 incremento do vacuoma ao longo do desenvolvimento do nectário, mostrando
27 vacuoma desenvolvido quando completamente diferenciadas (Fig. 3C-D).

28 As células do tecido secretor apresentam núcleos volumosos e citoplasma
29 denso (Fig. 3B). De modo geral, este tecido é composto por aproximadamente cinco
30 camadas de células que, embora apresentem formas variadas, tendem a ser
31 predominantemente globosas. Foram observadas gotículas de natureza lipídica
32 dispersas no citoplasma.

1 No polo secretor as células epidérmicas que limitam a face externa do nectário
 2 são justapostas e não diferem das camadas subjacentes, entretanto apresentam
 3 cutícula íntegra e delgada (Fig. 3B). A integridade e caráter elástico da cutícula
 4 tornam-se evidente quando do acúmulo de néctar no espaço subcuticular, ocasião na
 5 qual a cutícula mostra-se distendida permitindo a formação de ampla bolsa
 6 subcuticular (Fig. 3A-B).

7 Tabela 1: Caracterização histoquímica dos nectários extraflorais de *Luffa cylindrica*

Caracterização histoquímica		Tecido			
Classe química	Teste	Mesofilo	Subglandular	Camada limítrofe	Secretor
Lipídeos totais	Sudan Red	++	++	+	+
Amido	Lugol	++	+	-	-
Proteínas	Azul de Bromofenol	++	++	+	+
Compostos fenólicos	Cloreto férrico	-	-	+	+
Lignina	Floroglucina ácida	-	-	++	-
Terpenos	NADI	-	+	-	+

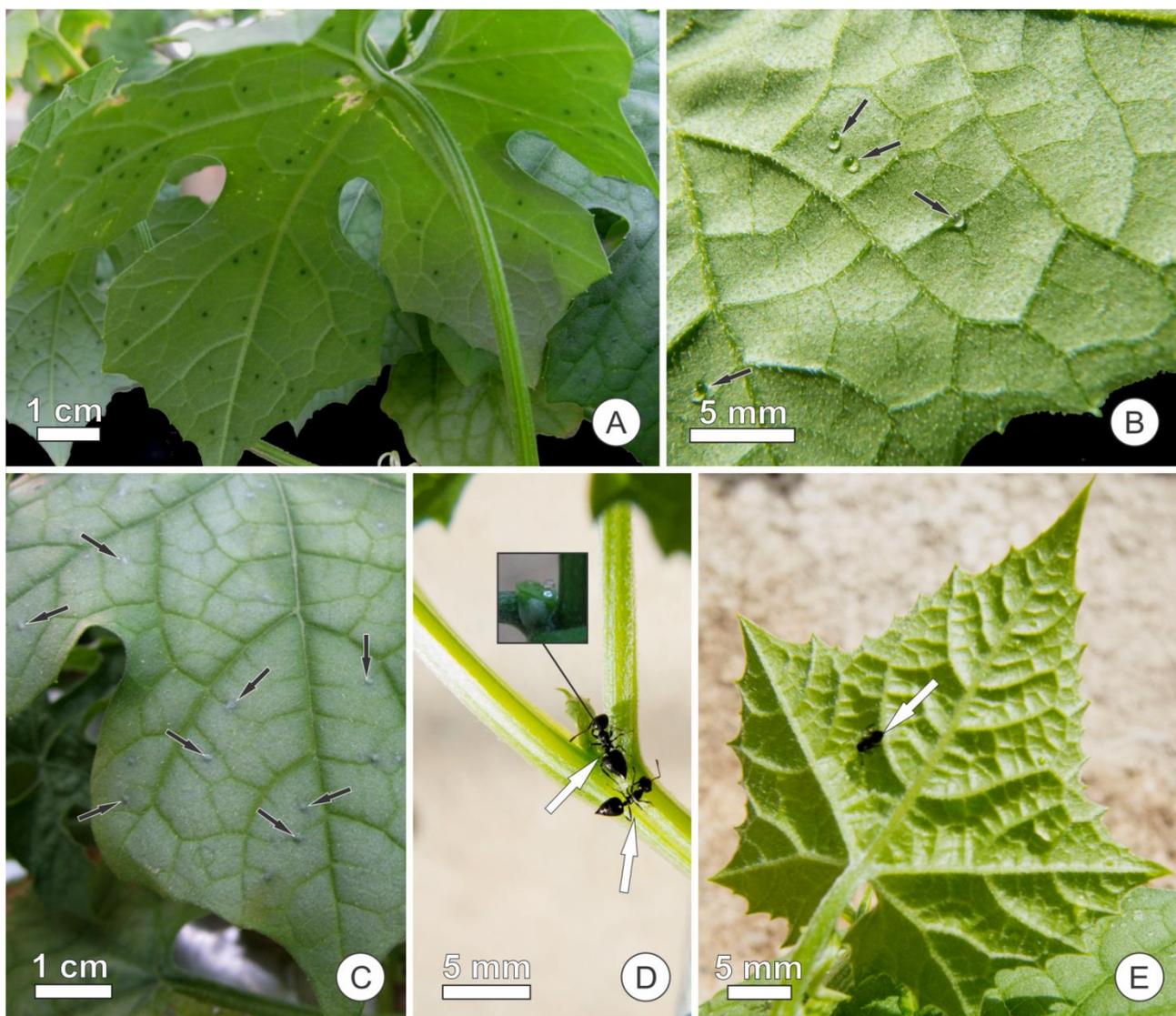
8 (++) presença, positivo intenso, (+) presença em menor concentração, positivo com coloração
 9 fraca, (-) ausência.

10 **Caracterização ultraestrutural**

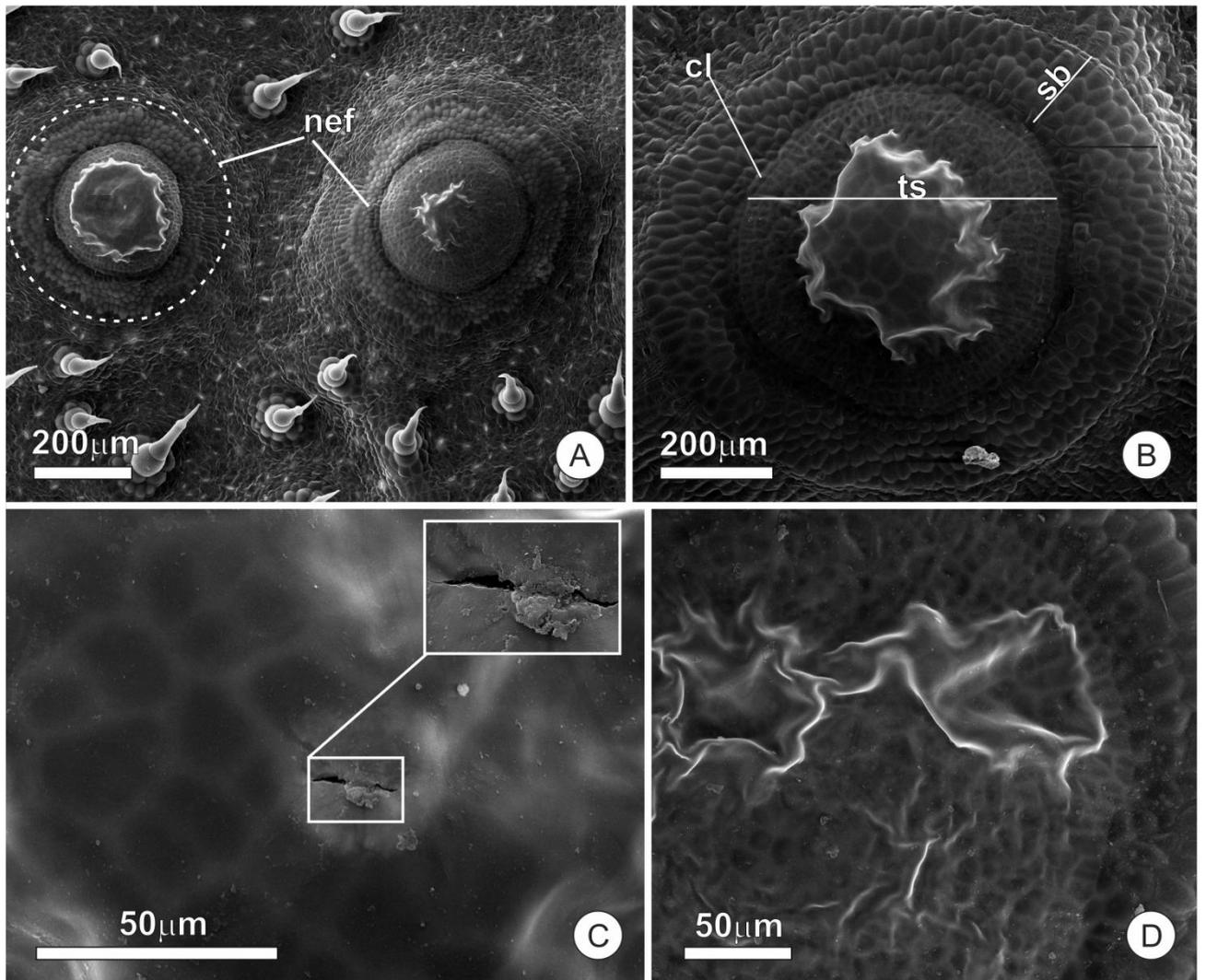
11 O tecido subglandular apresenta células com citoplasma pouco denso e
 12 amplos espaços intercelulares. Nestas células, as organelas predominantes são
 13 mitocôndrias e plastídios, sendo nestes frequente a presença de grãos de amido,
 14 geralmente solitários (Fig. 4A). No mesofilo, as células do parênquima clorofiliano
 15 próximas aos NEFs apresentam cloroplastos com grãos de amido volumosos,
 16 mitocôndrias e vacuoma desenvolvido (Fig. 4B).

17 A camada limítrofe apresenta células com vacuoma desenvolvido, paredes
 18 celulares espessas e citoplasma pouco denso, o que a torna distinta dos tecidos
 19 adjacentes. Há o acúmulo de grânulos elétron-densos nas paredes periclinais das
 20 células desta camada (Fig. 4C). Estes mesmos grânulos são também observados
 21 livres no citosol e dentro de vacúolos e plastídios (Fig. 4 F-H). Campos de pontuação
 22 primários, nos quais plasmodesmos estabelecem contato, são frequentes tanto entre
 23 células secretoras (Fig. 4D) quanto entre estas células e àquelas da camada limítrofe
 24 (Fig. 4E).

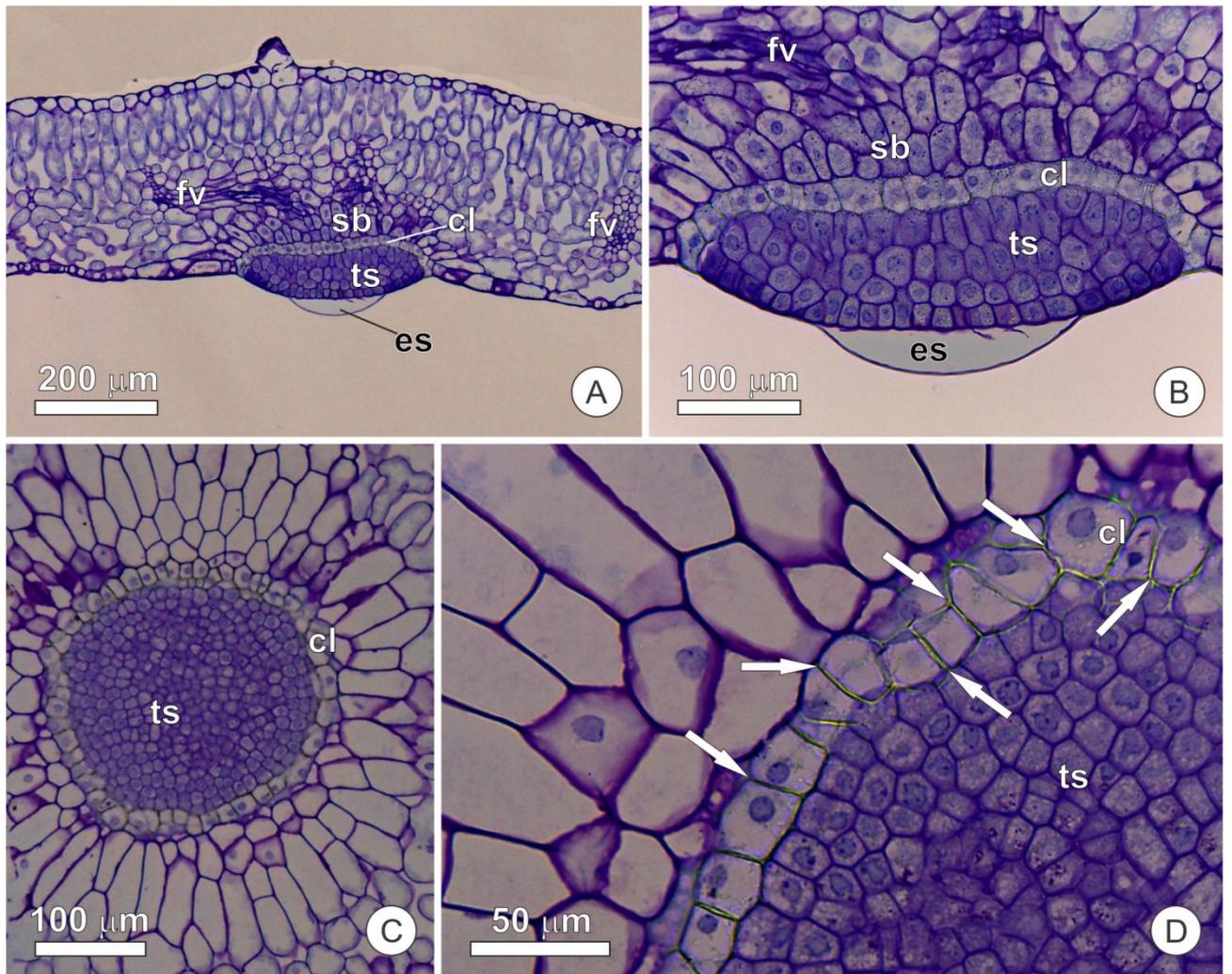
1 O tecido secretor, uma epiderme secretora típica, apresenta células pequenas,
2 em sua maioria globosas, com citoplasma denso e paredes celulares delgadas. Neste
3 tecido é possível observar a presença de inúmeras mitocôndrias, plastídios, retículo
4 endoplasmático rugoso e dictiossomas (Fig. 5A-C). Gotículas de óleo foram
5 observadas na matriz citoplasmática da maioria das células do tecido secretor (Fig. 5),
6 por vezes ocupando área expressiva e sem clara associação com organelas tais como
7 retículo endoplasmático ou plastídios. Observou-se, a presença de etioplastos com
8 corpos prolamelares característicos (Fig. 5C), inúmeras vesículas dispersas no
9 citoplasma, e acúmulo gradual de substâncias no espaço periplasmático (Fig. 5 D-G)
10 em alguns casos comprimindo o protoplasto para um volume menor que metade do
11 espaço anteriormente ocupado (Fig. 5G). Foram observados ainda diversos grânulos
12 eletrôn-densos tanto no interior de plastídios quanto no espaço periplasmático.



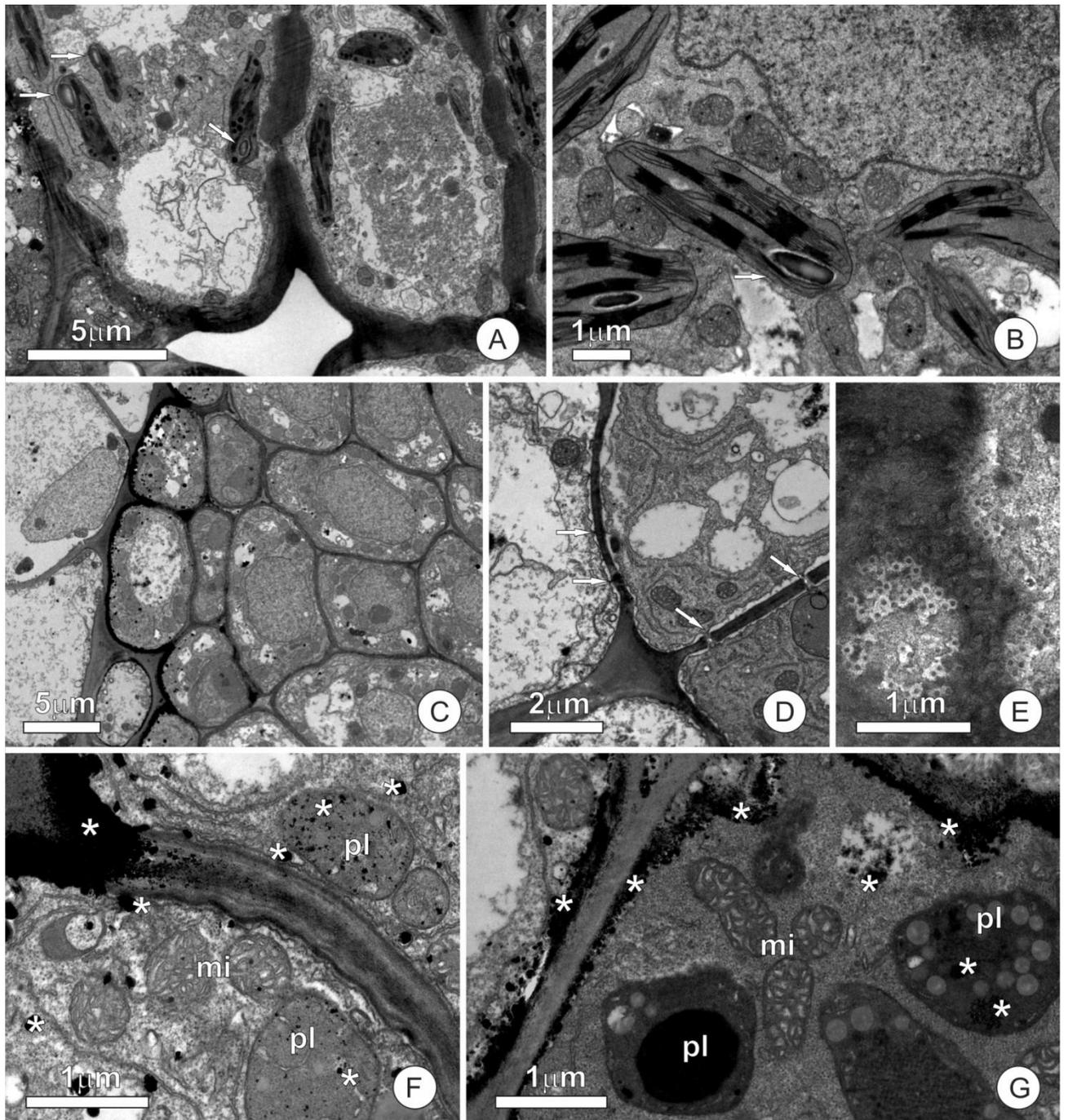
1 **Figura 1:** Localização dos nectários extraflorais de *Luffa cylindrica*. (A) Visão geral da
 2 lâmina foliar evidenciando os nectários extraflorais, note que estas estruturas podem ser vistas a olho
 3 nu como pontos de coloração mais escura. (B) Detalhe da face abaxial evidenciando acúmulo de néctar
 4 sobre o nectário (setas). (C) Visão geral da face adaxial, note que os nectários podem ser vistos mesmo
 5 desta face (setas). (D) Formigas (setas) visitando nectário extrafloral presente na estípula. Em destaque,
 6 gotícula de néctar sobre estípula. (E) Visão abaxial da folha, observe formiga (seta) visitando nectário
 7 extrafloral.



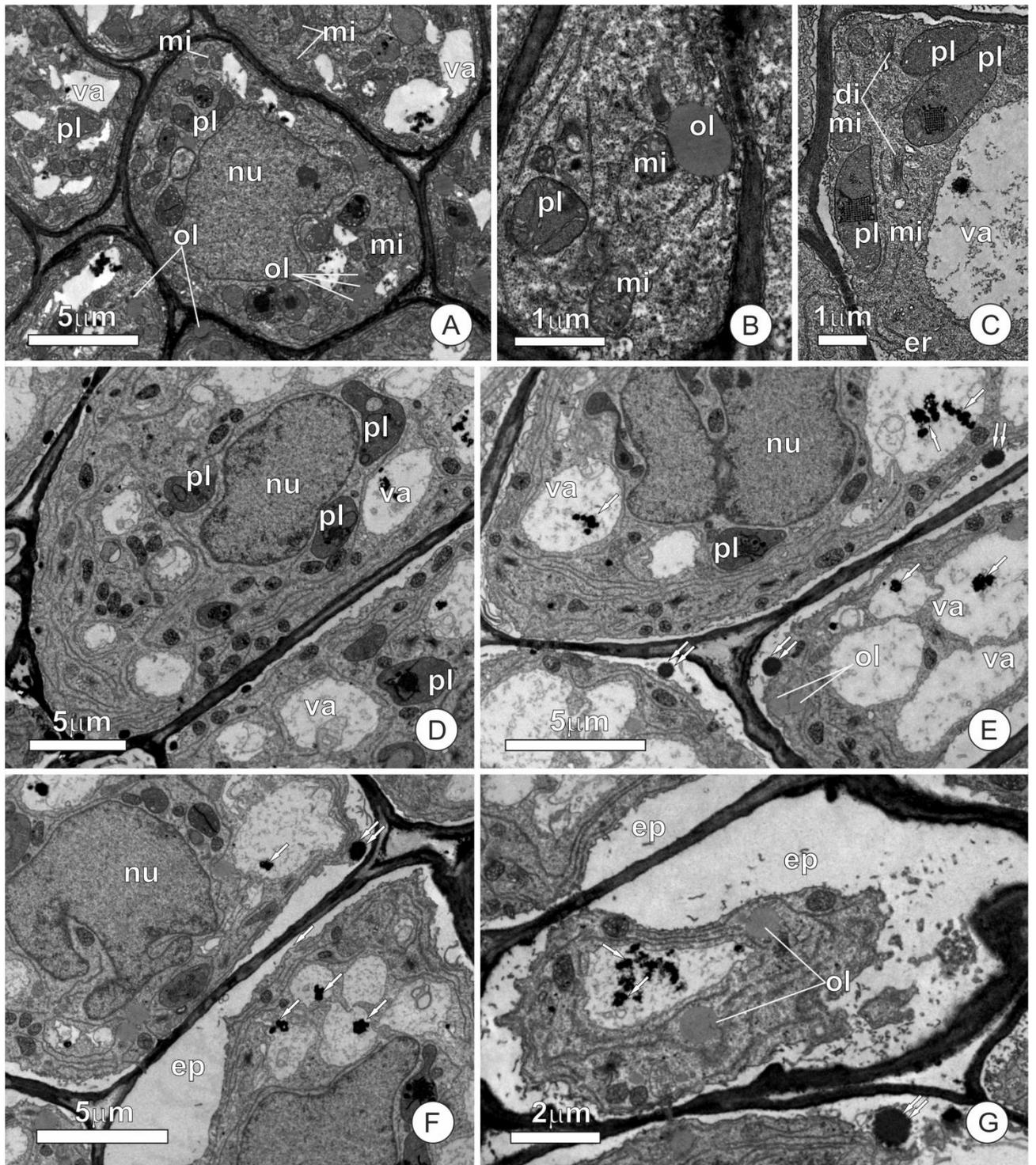
1 **Figura 2:** Caracterização micromorfológica dos nectários extraflorais de *Luffa cylindrica*. (A) Face adaxial
 2 da lâmina foliar evidenciando dois nectários extraflorais (nef) e diversos tricomas; o tracejado evidencia
 3 os limites do nectário. (B) Detalhe do nectário extrafloral, observe distensão da cutícula sobre o polo
 4 secretor para formação da bolsa subcuticular, note a delimitação formada pela camada limítrofe (cl) em
 5 torno do tecido secretor (ts). (C) Detalhe da cutícula distendida sobre o polo secretor. Em detalhe a
 6 ruptura cuticular. (D) Detalhe da cutícula acomodando-se novamente sobre o tecido secretor após
 7 liberação do néctar.



1 **Figura 3:** Caracterização anatômica de nectários extraflorais em *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem
2 (Cucurbitaceae). (A) Secção transversal de NEF localizado no limbo foliar, notar vascularização (fv) e
3 amplo espaço subcuticular (es), tecido secretor (ts), camada limítrofe (cl), tecido subglandular e feixe
4 vascular. (B) Nectário em secção transversal, notar cutícula espessa na região do polo secretor a camada
5 limítrofe em torno do tecido secretor. (C) Corte paradérmico mediano do nectário, observe a localização
6 da camada limítrofe, delimitando o tecido secretor. (D) Detalhe do corte paradérmico, observe a
7 camada limítrofe e o espessamento das paredes de suas células (setas).



1 **Figura 4:** Caracterização ultraestrutural dos nectários extraflorais de *Luffa cylindrica*. (A) Detalhe de
 2 células do tecido subglandular, notar plastídios com grãos de amido isolados (setas). (B) Detalhe de
 3 células do mesofilo, observe cloroplastos com grãos de amido (seta). (C) Visão geral dos tecidos:
 4 subglandular à esquerda, camada limítrofe ao centro e tecido secretor à direita. Note grade densidade
 5 citoplasmática do tecido secretor. Observe acúmulo de grânulos eletrôn-densos no espaço
 6 periplasmático das células da camada limítrofe. Note ainda como as células do tecido subglandular são
 7 maiores que aquelas da camada limítrofe e tecido secretor. (D) Detalhe de plasmodesmos (setas) em
 8 secção transversal na face periclinal da camada limítrofe estabelecendo contato com células do tecido
 9 secretor. (E) Secção mostrando parede celular na face de contato entre camada limítrofe e tecido
 10 secretor, em vista frontal. Observe plasmodesmos que estabelecem contato entre células da camada
 11 limítrofe e tecido secretor. (F) Detalhe de células da camada limítrofe evidenciando a síntese de
 12 grânulos eletrôn-densos (*). Observe que estes grânulos se encontram dentro de plastídios (pl), livres no
 13 citoplasma e no espaço periplasmático. Mitocôndria (mi). (G) Detalhe da camada limítrofe. Observe que
 14 as vesículas contendo os grânulos se fundem à membrana celular liberando seu conteúdo. Observe
 15 ainda o acúmulo de grânulos na parede.



1 **Figura 5:** Caracterização ultraestrutural do tecido secretor de nectários extraflorais de *Luffa cylindrica*.
2 (A) Visão geral do tecido secretor. Observe densidade citoplasmática e espaços intercelulares. Vacúolo
3 (va), plastídio (pa), mitocôndria (mi), núcleo (nu), gotículas de óleo (ol). (B) Detalhe evidenciando gota
4 de óleo no citoplasma. (C) Observe a presença de dictiossomos e plastídios com corpos prolamelares
5 característicos. Observe amplo vacúolo (va), retículo endoplasmático (er). (D-G) Visão geral do tecido
6 secretor. Observe gradual acúmulo de secreção no espaço periplasmático e compressão do protoplasto.
7 Observe grânulos elétron-densos ora no interior de plastídios (seta simples), ora no espaço
8 periplasmático (setas duplas) e gotas de óleo dispersas no citosol.

1 DISCUSSÃO

2 **Localização e atividade secretora**

3 A distribuição dos NEFs de *L. cylindrica* por toda a lâmina foliar, de modo
4 aleatório, resulta em um patrulhamento mais abrangente por parte das formigas em
5 busca de néctar, contribuindo para uma proteção mais eficaz. Padrão semelhante foi
6 encontrado por Agarwal e Rastogi (2010) que apontam ainda a correlação linear
7 positiva encontrada entre o número de nectários extraflorais e o tempo de
8 permanência das formigas no órgão. Esta é, portanto, uma importante estratégia de
9 defesa indireta.

10 A presença do polo secretor destes nectários na face abaxial, em detrimento
11 da face adaxial, assim como o observado em *Hymenaea stigonocarpa* (Paiva e
12 Machado 2006), pode ser interpretada como uma maneira eficaz de diminuir as perdas
13 de néctar por evaporação. Em *Luffa cylindrica* estes nectários foram encontrados não
14 apenas no limbo, mas também distribuídos em outras partes da folha como em
15 estípulas, e em folhas modificadas como brácteas e bractéolas. O mesmo foi
16 observado por Agarwal e Rastogi (2010) que apontam, ainda, a presença de nectários
17 frutos.

18 A fase secretora dos NEFs de *Luffa cylindrica* se inicia nos estágios iniciais de
19 desenvolvimento da folha, ao longo dos processos de diferenciação e expansão. O
20 fato destes nectários serem ativos logo no início da expansão foliar é benéfico para a
21 planta, pois tecidos jovens necessitam de grande proteção uma vez que defesas
22 químicas e físicas ainda não estão consolidadas.

23 A longa duração do período funcional que observamos ocorrer nos NEFs de *L.*
24 *cylindrica* difere do padrão que parece predominar na maioria das espécies portadoras
25 destas estruturas. Nectários extraflorais usualmente são ativos durante os estágios
26 iniciais de desenvolvimento dos órgãos aos quais estão associados, cessando a
27 secreção de néctar após completa diferenciação destes órgãos (Elias 1972), quando
28 defesas estruturais e químicas estão bem estabelecidas. O padrão encontrado nos
29 NEFs de *L. cylindrica* supostamente reflete a coevolução entre a espécie e os insetos
30 defensores que a patrulham, pois, mesmo portando defesas estruturais bem
31 estabelecidas, a defesa biótica foi poupada, mantendo esse traço por toda a vida útil do
32 órgão ao qual o NEF está associado. O final do período de secreção observado em *L.*
33 *cylindrica* é semelhante ao que foi relatado em *Pithecellobium macradenium*, onde os

1 nectários cessam a atividade secretora apenas com o fim da vida útil do órgão em que
2 estão presentes (Elias 1972).

3

4 **Anatomia, Histoquímica e Caracterização ultraestrutural**

5 Os NEFs de *Luffa cylindrica* são complexos e formados por diferentes tipos
6 celulares. As células da porção secretora apresentam citoplasma bastante denso, com
7 riqueza de mitocôndrias, dictiossomos, retículo endoplasmático, o que é um claro
8 demonstrativo da alta atividade metabólica destas células (Fahn 1979).

9 A liberação de néctar para o meio externo provavelmente se dá através de
10 rupturas na cutícula, como foi observado nas imagens obtidas através da microscopia
11 eletrônica de varredura. O acúmulo dos produtos de secreção dentro do espaço
12 subcuticular promove grande pressão, favorecendo a ruptura da cutícula e permitindo
13 a passagem da secreção para o meio externo (Paiva 2016). Pode-se observar no
14 tecido secretor, intensa atividade de dictiossomos e retículo endoplasmático rugoso.
15 Há ainda gradual acúmulo de secreção no espaço periplasmático e no vacuoma que
16 concomitantemente vai se fundindo à membrana celular e liberando seu conteúdo no
17 espaço periplasmático. Devido a isso, o protoplasto apresenta-se comprimido e
18 ocupando menos que um terço do volume celular. A pressão gerada por esse
19 processo comprime os produtos de secreção, forçando-os contra a parede celular
20 resultado na exsudação da secreção para o meio externo, neste caso, para a bolsa
21 subcuticular (Paiva 2016). Em *L. cylindrica* o exsudato é liberado pelas células
22 secretoras para o espaço intercelular e, através de pequenos canais formados por
23 estes espaços, é encaminhado para o polo secretor, forçando a formação da bolsa
24 subcuticular. O contínuo acúmulo de secreção neste espaço acaba por resultar no
25 rompimento da cutícula e consequente extravasamento da secreção para o meio
26 externo. Estes são eventos cíclicos e a cutícula se recompõe a cada ciclo, permitindo
27 novo acúmulo e liberação (Paiva 2016).

28 As gotículas de óleo dispersas no citosol das células dos tecidos secretor e
29 subglandular foram identificadas, em sua maioria, como terpenos, porém, também
30 foram observadas gotículas lipídicas de natureza não terpenóide. Sugere portanto, que
31 estas células apresentam tanto lipídios como elemento de defesa, quanto lipídios
32 destinado à reserva energética. No teste de néctar utilizando vapores de ósmio não
33 observamos quantidade significativa de óleo sendo liberada com o exsudato. Ou seja,
34 este óleo não é usado pela planta como recompensa aos insetos defensores. Isso

1 poderia sugerir que os lipídios produzidos pelas células dos NEFs tem papel na
2 reconstrução da cutícula após o rompimento desta para o extravasamento do néctar.

3 A presença de feixe vascular nas imediações do tecido subglandular é
4 interpretada como indício da participação do floema no aporte de precursores do
5 néctar. A presença de cloroplastos no tecido subglandular indica que pode haver
6 também a participação deste tecido no processo de produção de açúcares que irão
7 suprir de carboidratos o nectário. No tecido secretor estes plastídios encontram-se
8 indiferenciados e observa-se inclusive a presença de etioplastos com corpos
9 prolamelares característicos.

10 A camada limítrofe apresenta células justapostas, paredes celulares espessas
11 e impregnadas com lignina. A presença deste composto sugere a formação de uma
12 barreira hidrofóbica, que impede o refluxo da secreção para o tecido subglandular.
13 Com isso, há o direcionamento da passagem do exsudato para o meio externo. O
14 mesmo foi observado por Paiva e Machado (2006) e Fahn (2000). A camada limítrofe
15 atua de modo análogo à endoderme ou mesmo à estria de Caspary presente na célula
16 basal de tricomas secretores, sendo funcionalmente similares. Em *Erythrina speciosa*
17 (Fabaceae), por exemplo, a pressão causada pelo acúmulo de néctar na cabeça dos
18 tricomas secretores, como consequência do impedimento de refluxo pela estria de
19 Caspary, pode explicar o extravasamento pela cutícula (Paiva 2009).

20 Os grãos de amido observados nos tecidos subglandular e secretor são
21 menores que os encontrados no mesofilo adjacente. O fato de serem menores implica
22 em uma maior superfície específica, sendo este um indicativo da facilitação da
23 hidrólise, reforçando seu papel na síntese do néctar. Porém, o aporte de carboidratos
24 para o exsudato não proveria apenas da hidrólise de amido, mas também do floema
25 que se encontra adjacente ao tecido subglandular.

26 Os grânulos elétron-densos, encontrados nas paredes periclinais das células
27 da camada limítrofe, são interpretados aqui como precursores de lignina. Sendo uma
28 substância complexa, hidrofóbica, formada especialmente de fenólicos, a lignina não
29 tem biossíntese direta no citosol. Seu ciclo metabólico conta com vários passos,
30 catalisados por enzimas específicas (Taiz e Zeiger 2009). Sua síntese culmina em sua
31 deposição na parede celular, porém carecem estudos acerca da localização exata de
32 todos os passos de sua biossíntese (Boerjan 2003). Foi observado o possível
33 processo de liberação destes compostos fenólicos precursores de lignina. Ora
34 diretamente, sendo o composto liberado no citosol e encaminhado para a parede
35 celular, ora por meio da fusão dos vacúolos que os contêm, com a membrana celular,
36 ganhando assim o espaço periplasmático e sendo depositados na parede celular

1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2 **Agarwal VM, Rastogi N. 2010.** Ants as dominant insect visitors of the extrafloral
3 nectaries of sponge gourd plant, *Luffa cylindrica* (L.) (Cucurbitaceae). *Asian*
4 *Myrmecology* **3**:45–54.
- 5 **Bhattacharyya B, Maheshwart JK. 1971.** Studies on extrafloral nectaries of the
6 Leguminales I. Papilionaceae, with a discussion on the systematics of the
7 Leguminales. *Proceedings of the Indian National Science Academy* **37**:11–30.
- 8 **Boerjan W, Ralph J, Baucher M. 2003.** Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant*
9 *Biology* **54**:519–46.
- 10 **Chakravarty HL. 1948.** Extrafloral glands of Cucurbitaceae. *Nature* **162**:576–577.
- 11 **David R, Carde JP. 1964.** Coloration différentielle des inclusions lipidique et
12 terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi.
13 *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences*
14 *Paris. Série D* **258**:1338–1340.
- 15 **Elias TS. 1972.** Morphology and anatomy of foliar nectaries of *Pithecellobium*
16 *macradenium* (Leguminosae). *Botanical Gazette* **133**:38-42.
- 17 **Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. New York, NY: Academic Press.
- 18 **Fahn A. 2000.** Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical*
19 *Research* **31**:37-75.
- 20 **Heil M, Fiala B, Baumann B, Linsenmair KE. 2000.** Temporal, spatial and biotic
21 variations in extrafloral nectaries secretion by *Macaranga tanarius*. *Functional*
22 *Ecology* **14**:749–757.
- 23 **Heil M, Koch T, Hilpert A, Fiala B, Boland W, Linsenmair K. 2001.** Extrafloral nectar
24 production of the ant-associated plant, *Macaranga tanarius*, is an induced, indirect,
25 defensive response elicited by jasmonic acid. *Ecology* **38**:1083–1088.
- 26 **Heil M, McKey D. 2003.** Protective ant–plant interactions as model systems in
27 ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology, Evolution, and*
28 *Systematics* **34**:425–453.
- 29 **Heil M; Feil D; Hilpert A; Linsenmair KE. 2004.** Spatiotemporal patterns in indirect
30 defence of a South-East Asian ant-plant support the optimal defence hypothesis.
31 *Journal of Tropical Ecology* **20**:573–580.

- 1 **Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York, NY: McGraw Book Co.
- 2 **Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of light osmolality for
3 use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**:137A-138A.
- 4 **Keeler KH. 2016.** *World list of plants with extrafloral nectaries*.
5 <http://bioscilabs.unl.edu/Emeriti/keeler/extrafloral/worldlistfamilies.htm>. Acesso em
6 janeiro de 2016.
- 7 **Leitão CAE, Meira RMSA, Azevedo AA, Araújo JM, Silva KLF, Collevatti RG. 2005.**
8 Anatomy of the floral, bract, and foliar nectaries of *Triumfetta semitriloba*
9 (Tiliaceae). *Canadian Journal of Botany* **83**:279–286.
- 10 **Mazia D, Brewer PA, Alfert M. 1953.** The cytochemistry staining and measurement of
11 protein with mercuric bromophenol blue. *Biological Bulletin* **104**:57-67.
- 12 **Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. 2007.** *Nectaries and nectar*. Springer-Verlag, The
13 Netherlands.
- 14 **O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by
15 toluidine blue. *Protoplasma* **59**(2):368-373.
- 16 **Oliveira PS, Rico-Gray V, Díaz Castelazo C, Castillo-Guevara C. 1999.** Interactions
17 between ants, extrafloral nectaries and insects herbivores in neotropical coastal
18 sand dunes: herbivore deterrence by visiting ants increases fruit set in *Opuntia*
19 *stricta* (Cactaceae). *Functional Ecology* **13**:623–631.
- 20 **Pacini E, Nepi M, Vesprini JL. 2003.** Nectar biodiversity: a short review. *Plant*
21 *Systematics and Evolution* **238**:7–22.
- 22 **Paiva EAS, Machado SR. 2006.** Ontogênese, anatomia e ultra-estrutura dos nectários
23 extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae –
24 Caesalpinioideae). *Acta Botanica Brasílica* **20**(2):471-482.
- 25 **Paiva EAS. 2009.** Ultrastructure and post-floral secretion of the pericarpial nectaries of
26 *Erythrina speciosa* (Fabaceae). *Annals of Botany* **104**:937–944
- 27 **Paiva EAS. 2016.** How do secretory products cross the plant cell wall to be released?
28 A new hypothesis involving cyclic mechanical actions of the protoplast. *Annals of*
29 *Botany* (in press).

- 1 **Pearse AGE. 1980.** *Histochemistry theoretical and applied*. Vol.II, 4th ed. London,
2 Longman Press.
- 3 **Robards AW. 1978.** *An introduction to techniques for scanning electron microscopy of*
4 *plant cells*. In: J. L. Hall (ed). *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant*
5 *Cells*. NY: Elsevier, 343–403.
- 6 **Roland AM. 1978.** *General preparations and staining of thin sections*. In: *Electron*
7 *Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. J.L. Hall (eds.). New York, Elsevier.
- 8 **Schmid R. 1988.** Reproductive versus extra-reproductive nectaries – historical
9 perspective and terminological recommendations. *Botanical Review* **54**:179–232.
- 10 **Taiz L, Zeiger E. 2009.** *Fisiologia vegetal*. 4^a. ed. Porto Alegre, Artmed.
- 11 **Weber MG, Keeler KH. 2013.** The phylogenetic distribution of extrafloral nectaries in
12 plants. *Annals of Botany* **111**:1251–1261.

Capítulo 2

**As respostas estruturais e metabólicas dos nectários
extraflorais de *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem (Cucurbitaceae)
variam com o *status* nutricional e herbivoria**

1 RESUMO

2 Os nectários extraflorais (NEFs) atuam mediando relações simbióticas entre plantas e
3 insetos que, por sua presença e atividade, fornecem proteção à planta. A formação e a
4 atividade secretora dos NEFs podem ser induzidas por herbivoria, sendo considerada
5 como resposta de defesa induzida. Neste trabalho, noventa indivíduos de *Luffa*
6 *cylindrica* foram cultivados em diferentes concentrações de nutrientes na solução
7 nutritiva (10, 50 e 100%). Foram submetidos à herbivoria simulada metade dos
8 indivíduos cultivados em cada concentração, com o objetivo de avaliar os padrões de
9 resposta de defesa biótica tanto à herbivoria quanto ao *status* nutricional. Foram
10 avaliados a área foliar e o número e a densidade de nectários. O néctar secretado
11 pelos NEFs foi coletado e seu teor de açúcares avaliado. Observou-se interação
12 significativa entre nutrientes x herbivoria. Área foliar e número de NEFs aumentaram
13 nas plantas com o *status* nutricional elevado, porém na presença de dano foliar
14 observou-se maior crescimento foliar no grupo cultivado a 10%. Por ser o grupo com
15 recursos mais reduzido, quando sob efeito de herbivoria, respondeu de forma a
16 aumentar a área foliar, o que nos permite inferir a ocorrência de um efeito de
17 sobrecompensação, de modo a compensar os prejuízos causados pela ação dos
18 herbívoros. Plantas cultivadas com solução nutritiva completa e sob efeito da
19 herbivoria apresentaram maior densidade de nectários e maior concentração de
20 açúcares no néctar. Este estudo contribui para a compreensão de como o *status*
21 nutricional e a herbivoria influem nas defesas indiretas e induzidas das plantas.

22 **Palavras chaves:** área foliar, concentração de nutrientes, defesa indireta,
23 herbívoros, néctar, predadores.

1 **ABSTRACT**

2 Extrafloral nectaries (EFNs) are involved in symbiotic relationships between plants and
3 insects that, by their occurrence and activity, provide plant protection. The formation
4 and the secretory activity of EFNs are generally induced by herbivory, thus being
5 considered as an induced defence response. In this study, 90 plants of *Luffa cylindrical*
6 were grown under different nutrient concentrations (10, 50, 100%) in a nutritive
7 solution. The half of the plants per nutrient concentration was subjected to simulated
8 herbivory in order to examine the patterns of response of biotic defence by both
9 herbivory and nutritional *status*. Leaf area, number and density of nectaries were
10 analysed. Nectar secreted by EFNs was also collected and its sugar content was
11 subsequently determined. There was a significant interaction between nutrients and
12 herbivory. Leaf area and nectary number increased in plants with higher nutritional
13 *status*, but a greater leaf growth in plants growing to 10% of nutrients was detected
14 under leaf damage. The low-nutrient plants increasing leaf area under herbivory
15 pressure may be subjected to the overcompensation effect, thus balancing the costs
16 caused by herbivore incidence. Plants growing under a full nutrient concentration and
17 herbivory effect showed greater density of nectaries and higher sugar concentration.
18 This study contributes to the understanding of how nutrient *status* and herbivory
19 influence on induced indirect defence of plants.

20

21 **Key words:** leaf area, nutrient concentration, indirect defense, herbivores,
22 nectar, predators.

1 INTRODUÇÃO

2 As plantas têm que lidar com inimigos naturais, como herbívoros, que podem
3 consumir quantidades significativas de biomassa da planta e reduzir seu sucesso
4 reprodutivo (Crawley 1983; Coley e Barone 1996; Strauss *et al.* 2002). Devido a isso,
5 as plantas desenvolveram diversas estruturas e estratégias para se defender. Por
6 exemplo, diversos mecanismos atuam diretamente na defesa da planta, como
7 espinhos, tricomas, taninos ou látex, enquanto outros atuam ainda de forma indireta,
8 atraindo predadores naturais de herbívoros mediante uma resposta induzida pelo dano
9 causado por eles (Agrawal 1998; Karban e Baldwin 2007). Especialmente, as
10 estruturas que secretam de substâncias capazes de atrair predadores, constituem um
11 dos mecanismos mais habituais de defesa indireta induzida por herbívoros (Bentley
12 1977; Del Claro 2012; Weber 2013).

13 As plantas apresentam diversas estruturas secretoras, a maioria delas
14 desempenhando papel fundamental na defesa e desenvolvimento da planta. Algumas
15 destas estruturas possuem diversos mecanismos morfológicos e químicos que atuam
16 como resposta ao dano mecânico produzido por herbívoros (Stamp 2003; Heil 2008;
17 Nahas *et al.* 2012). A proteção indireta é uma defesa induzida que está envolvida na
18 atração de inimigos naturais dos herbívoros. Portanto, a atividade secretora promove a
19 proteção indireta da planta contra os herbívoros mediada pelos seus predadores (Heil
20 2008). Por exemplo, várias espécies de plantas se valem de estruturas como
21 domáceas e nectários extraflorais (NEFs) que atuam nesta atração de inimigos
22 naturais dos herbívoros (Pulice e Packer 2008; Hernández *et al.* 2013; Dáttilo *et al.*
23 2015). Diversas espécies vegetais, distribuídas em pelo menos 109 famílias e 801
24 gêneros, produzem nectários extraflorais (Keeler 2016) que atuam como mediadores
25 de interações simbióticas, sendo visitados por diversos insetos (Heil *et al.* 2001). Com
26 estes nectários a planta é capaz de atrair predadores como formigas e vespas, ambas
27 defendendo-a contra herbívoros (Leitão *et al.* 2005; Byk e Del Claro 2011; Del Claro
28 2012).

29 Nectários são estruturas secretoras envolvidas na secreção de néctar e podem
30 ser classificados conforme sua posição, sendo florais aqueles presentes em peças
31 florais, e extraflorais aqueles presentes em órgãos não reprodutivos (Schmid 1988).
32 Diferente dos nectários florais, presentes na estrutura da flor e atuando como
33 mediadores do processo de polinização (Oliveira 1997), os NEFs são glândulas
34 secretoras de néctar que ocorrem na superfície de órgãos não reprodutivos da planta
35 e não estando diretamente ligados à atração de polinizadores (Bentley 1977; Schmid
36 1988). Portanto, os NEFs estão comumente envolvidos na defesa indireta da planta

1 como um tipo de defesa biótica, aquela que representa a associação de uma espécie
2 com outra que, por sua presença e atividade, irá promover a proteção (Bentley 1977;
3 Del Claro 2012; Weber 2013). Essa função protetora se deve ao néctar, um valioso
4 recurso alimentar para diversos artrópodes. Sendo uma rica e nutritiva solução
5 açucarada, o néctar é responsável por mediar a relação das plantas com polinizadores
6 e defensores. Estes últimos conferem a redução da presença de herbívoros e
7 predadores de as sementes (Heil 2011). Deste modo, os NEFs e o néctar secretado
8 por eles são características chaves no aumento do crescimento e sobrevivência das
9 plantas.

10 Independente de serem diretas ou indiretas, as defesas contra herbívoros
11 requerem investimento de recursos por parte da planta (McKey 1974; Strauss e
12 Agrawal 1999; Pulice e Packer 2008). Como os indivíduos lidam com uma limitada
13 disponibilidade de recursos, a alocação a uma certa estrutura ou função limita o
14 investimento em outras (Lloyd 1980; de Jong e Klinkhamer 2005). Desta forma, já que
15 o compromisso na alocação de recursos frente a um gasto desnecessário pode limitar
16 o investimento em crescimento e reprodução, as plantas com maiores defesas podem
17 ter um menor *fitness* na ausência de herbívoros (Bentley 1977; Strauss *et al.* 2002). O
18 dano por herbívoros é temporal e espacialmente variável e, portanto, se torna
19 imprevisível (Lowman 1985; Strauss *et al.* 2002). Em face dessa imprevisibilidade, a
20 seleção natural mediada por limitação de recursos tem favorecido a aparição das
21 defesas induzidas, aquelas que podem surgir a partir do momento do dano (Zangerl e
22 Rutledge 1996; Karban e Baldwin 2007). Sendo esta a única forma de se defender
23 apenas quando é preciso, só haverá gasto de recursos quando estritamente
24 necessário.

25 O número de NEFs por folha, cálice, brácteas e bractéolas mantém uma
26 correlação linear significativamente positiva com o tempo de patrulhamento de
27 formigas predadoras em *Luffa cylindrica*, sendo esta uma valiosa estratégia de defesa
28 indireta da planta (Agarwal e Rastogi 2010). O padrão de patrulhamento e a interação
29 de espécies de formigas com herbívoros apoia a teoria de defesa ideal. Esta teoria
30 sugere que as partes das plantas que são caracterizadas por um alto valor energético
31 e, com isso, maior risco de serem atacadas pelos herbívoros, apresentarão os mais
32 elevados níveis de defesa (McKey 1974). Sendo a produção de NEFs adicionais e a
33 secreção de néctar algo custoso em termos de recursos, esta resposta é normalmente
34 dano-recurso-dependente (Stamp 2003; Mondor *et al.* 2006). Portanto, poderíamos
35 avaliar experimentalmente se a disponibilidade de recursos e a presença de dano
36 mecânico afetam significativamente a resposta defensiva em termos de produção
37 adicional de NEFs. Evidências neste sentido proporcionariam apoio às predições dos

1 argumentos baseados na limitação de recursos e o seu investimento pontual sob a
2 presença de herbívoros, o que potencialmente explicaria a presença de menos NEFs
3 na ausência de danos e sob condições estressantes em termos de recursos.

4 A família Cucurbitaceae é especialmente rica em espécies portadoras de
5 nectários extraflorais, entre elas *Luffa cylindrica* (Chakravarty 1948) que os apresenta
6 em forma de disco e localizados na lâmina foliar, estípulas, brácteas, bractéolas e
7 frutos (Agarwal e Rastogi 2010). Esta espécie tem uma alta diversidade específica e
8 funcional de insetos herbívoros e seus predadores pertencentes a cinco diferentes
9 ordens: Hemíptera, Díptera, Coleóptera, Himenóptera e Lepidóptera (Blüthgen *et al.*
10 2003). Dentre as espécies mais frequentes, as formigas são com certeza o grupo mais
11 expressivo (Agarwal e Rastogi 2010). Buscando entender as relações entre *status*
12 nutricional e investimento em defesa, este trabalho teve como objetivo avaliar as
13 respostas estruturais e metabólicas de *Luffa cylindrica* cultivada em solução nutritiva
14 com diferentes teores de nutrientes e sob efeito de herbivoria. Especificamente,
15 testamos as seguintes hipóteses:

16 -Plantas com melhor *status* nutricional apresentam maior número de NEFs e
17 maior área foliar;

18 -Plantas sob efeito de herbivoria apresentarão menor área foliar, porém maior
19 número de NEFs, especialmente com melhor *status* nutricional

20 -Plantas com melhor *status* nutricional, ao sofrerem herbivoria, terão resposta
21 de defesa (área foliar, número de nectários e densidade de nectários) maior nas
22 primeiras folhas que se desenvolverem logo após o dano.

23 MATERIAL E MÉTODOS

24 ***Obtenção das plântulas***

25 Noventa plântulas foram obtidas a partir da germinação de sementes. Para a
26 germinação foram utilizadas bandejas plásticas preenchidas com vermiculita e
27 regadas frequentemente de modo a manter a umidade do substrato. Quando as
28 plântulas apresentavam duas folhas, foram transferidas para potes com capacidade de
29 três litros preenchidos com solução hidropônica preparada segundo o proposto por
30 Hoagland e Arnon (1950) com algumas modificações nos sais utilizados mas
31 mantendo-se as concentrações molares (Tabela 1). Para facilitar o transplante, as
32 plântulas foram lavadas em água deionizada, de modo a retirar todos os sedimentos

1 das raízes. As plântulas foram então acondicionadas em potes plásticos revestidos
2 com tinta aluminizada, contendo três litros de solução nutritiva.

3 **Solução nutritiva**

4 Para avaliar se a produção de NEFs era dano e recurso dependente foram
5 utilizadas três diferentes concentrações da solução nutritiva, cada uma nutrindo 30
6 plântulas aleatoriamente selecionadas: 10%, 50% e 100% de nutrientes, sendo este
7 último, o grupo controle e no qual as plantas dispõem dos níveis adequados de
8 nutrientes minerais. Portanto, as soluções de 10 e 50% atuaram como uma redução
9 experimental dos recursos. Diariamente o volume da solução nos potes foi completado
10 com água deionizada, de modo a repor perdas por evaporação. Semanalmente a
11 solução era renovada de modo a se manter as condições experimentais de nutrição.

12 **Tabela 1:** Composição da solução nutritiva segundo Hoagland e Arnon (1950)

Composto	Quantidade para o preparo de 1L de solução Estoque	Alíquota da solução Estoque para o preparo da solução a 100%
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	236 g	5 ml
KNO ₃	101 g	5 ml
MgSO ₄ 7H ₂ O	246,5 g	2 ml
KH ₂ PO ₄	136 g	1 ml
FeSO ₄ 7H ₂ O	7,45 g	2 ml
EDTA	5,57 g	2 ml
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,079 g	1 ml
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,215 g	1 ml
MnSO ₄	0,76899 g	1 ml
H ₃ BO ₃	2,844 g	1 ml
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,0174 g	1 ml

13 **Herbivoria**

14 Para avaliar se a produção de NEFs é dano dependente simulamos a
15 herbivoria 60 dias após o transplante das plântulas e em 15 plântulas para cada uma
16 das concentrações de solução nutritiva. Nesta simulação 15% da área foliar foi

1 removida com auxílio de um perfurador metálico. Portanto, por concentração de
2 solução nutritiva, 15 plântulas foram submetidas à herbivoria e outras 15 foram
3 mantidas como controle (Fig. 1). A área do limbo foi previamente estimada em 50
4 folhas de *L. cylindrica*. De posse da relação área foliar e comprimento da nervura
5 mediana nestas 50 folhas, estimou-se a área das folhas que sofreriam herbivoria a
6 partir do comprimento de sua nervura mediana. Desse modo, determinou-se a área
7 foliar e assim a quantidade de perfurações necessárias, de modo a eliminar 15% da
8 área do limbo em cada folha submetida à herbivoria simulada.

9 O número de folhas completamente expandidas em cada planta foi
10 contabilizado. Foram submetidos à herbivoria simulada 50% das folhas de cada
11 indivíduo, selecionando-se exclusivamente aquelas dispostas na porção distal do
12 eixo caulinar. As folhas jovens, ainda não expandidas, foram eliminadas da planta.
13 Dessa forma, garantimos que as 10 folhas expandidas que foram coletadas após o
14 experimento se desenvolveram sob os possíveis efeitos da herbivoria. Após o
15 desenvolvimento das plantas e a simulação da herbivoria, as dez folhas que se
16 expandiram foram coletadas. Nas plantas que não sofreram herbivoria coletou-se as
17 dez últimas folhas expandidas. A área foliar foi mensurada através do *software*
18 AxioVision SE64 (AxioVision Microscopy Software 2009, ZEISS, Alemanha)

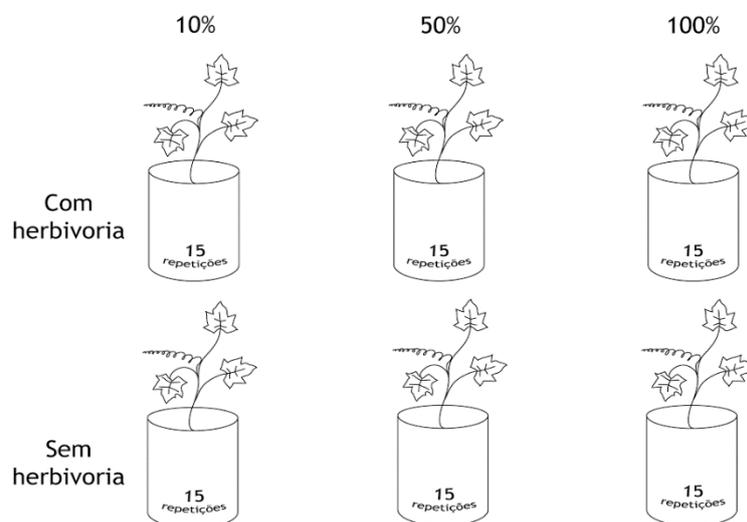


Figura 1: Desenho experimental cruzado para avaliar o efeito do *status* nutricional e a herbivoria sobre a resposta estrutural e metabólica dos NEFs de *Luffa cylindrica*

19 **Análise química do néctar**

20 O néctar secretado foi coletado em todos os NEFs de uma mesma folha, em
21 três diferentes indivíduos, de cada uma das concentrações nutricionais e tratamento

1 de herbivoria, totalizando assim 18 amostras. Para a coleta de néctar as formigas
2 foram excluídas da planta, as folhas foram previamente lavadas e ensacadas ao
3 anoitecer objetivando formar uma câmara úmida e impedir o acesso de pilhadores de
4 néctar. O néctar foi coletado na manhã seguinte, cerca de 12 horas após o isolamento
5 das folhas, com auxílio de tubo capilar. As amostras foram acondicionadas em
6 microtubos plásticos, congeladas e armazenadas em freezer a -10°C.

7 As análises do néctar foram realizadas no Laboratório de Nutrição e
8 Metabolismo de Plantas, Departamento de Biologia Vegetal – UFV (Viçosa, MG,
9 Brasil). Para tais análises foi utilizado o método enzimático para quantificação de
10 açúcares (Praxedes 2006). Foram utilizadas as seguintes enzimas: sacarose-fosfato
11 sintase (sacarose), frutose-1,6-bifosfatase (frutose) e ADP-glicose pirofosforilase
12 (glicose). Os ensaios foram executados em um leitor de placa “Elisa” e seguiram a
13 metodologia proposta por Praxedes (2006). Esta análise foi feita em um pequeno
14 tamanho amostral e por isso não foi analisada estatisticamente.

15 **Análise estatística**

16 Para determinar se a área foliar, o número de NEFs e sua densidade foram
17 alterados pelo *status* nutricional e o efeito da herbivoria, foram aplicadas três ANOVAs,
18 uma para cada variável resposta, considerando nutrientes e herbivoria (fatores fixos),
19 planta (fator aleatório) e a interação nutrientes × herbivoria como variáveis
20 independentes. Uma interação significativa indica um efeito diferencial da herbivoria
21 sobre a área foliar, o número de NEFs e a sua densidade dependendo da
22 concentração de nutrientes. Para calcular diferenças significativas entre concentrações
23 de nutrientes sob os tratamentos de herbivoria para cada variável resposta, as médias
24 foram comparadas usando post-hoc Tukey HSD. Os supostos de normalidade e
25 homogeneidade da variância foram testados usando os testes de Shapiro-Wilk e
26 Levene, respectivamente. Os dados para densidade de NEFs foram transformados
27 pela logaritmização. Naqueles dados cujo valor era menor que um, foi somado um
28 para que não se obtivesse resultado negativo após logaritmizar.

29 Para testar a variação temporal e assim determinar se existem picos de
30 resposta dentro de cada planta em termos de área foliar, número de NEFs e a sua
31 densidade, regressões lineares e curvilíneas (polinomial quadrática) foram analisadas
32 para cada tratamento (nutrientes e herbivoria). As dez folhas coletadas após o
33 experimento foram regressadas contra a área foliar, número de NEFs e a sua
34 densidade para cada *status* nutricional com e sem herbivoria. Além disso, *t*-tests de

1 amostras pareadas para cada tratamento (nutrientes e herbivoria) foram analisados
2 para avaliar diferenças na área foliar, número de NEFs e a sua densidade entre a
3 primeira e a última folha expandidas que foram coletadas após o experimento (ou seja,
4 as folhas 1 e 10). As médias dos valores de todos os indivíduos para cada folha foram
5 usadas (n=15 indivíduos para cada folha). No total, seis regressões e seis *t*-tests foram
6 analisados (10, 50 e 100% de solução de nutrientes com e sem herbivoria) para cada
7 variável resposta. Todas as análises foram realizadas em SPSS v22 (IBM SPSS
8 Statistics 2013; IBM Corp, Armonk, NY, USA).

RESULTADOS

9 Os três tipos de respostas analisadas (área foliar, número de NEFs e
10 densidade de NEFs) variaram significativamente com o *status* nutricional, herbivoria e
11 planta. No entanto, todas as variáveis diferiram significativamente em resposta à
12 interação *status* nutricional × herbivoria (Tabela 2). Na ausência de herbivoria o
13 incremento da área foliar e número de NEFs foi proporcional ao aumento do *status*
14 nutricional, ou seja, as respostas em termos de tamanho e número aumentaram de
15 acordo com o aumento de nutrientes (Fig. 2). Conforme isso, a densidade de nectários
16 seguiu uma tendência a se manter estável entre as concentrações de nutrientes,
17 exceto para 50% (Fig. 2C). Quanto ao efeito da herbivoria, as respostas estruturais e
18 metabólicas foram significativamente dependentes do *status* nutricional (interação
19 nutriente × herbivoria significativo; Tabela 2, Fig. 2). Quando comparada aos efeitos
20 sem herbivoria, a área foliar aumentou significativamente à concentração de 10% mas
21 diminuiu à de 100% (Fig. 2A). O número de NEFs aumentou significativamente com o
22 aumento do *status* nutricional e sob o efeito de herbivoria, porém diminuiu em relação
23 à ausência de herbivoria nas concentrações de 50 e 100% (Fig. 2B). A densidade de
24 NEFs seguiu os padrões para a relação tamanho vs número, ou seja, aumentou
25 significativamente com o aumento do *status* nutricional e teve uma tendência a
26 diminuir quando comparado aos efeitos sem herbivoria (Fig. 2C).

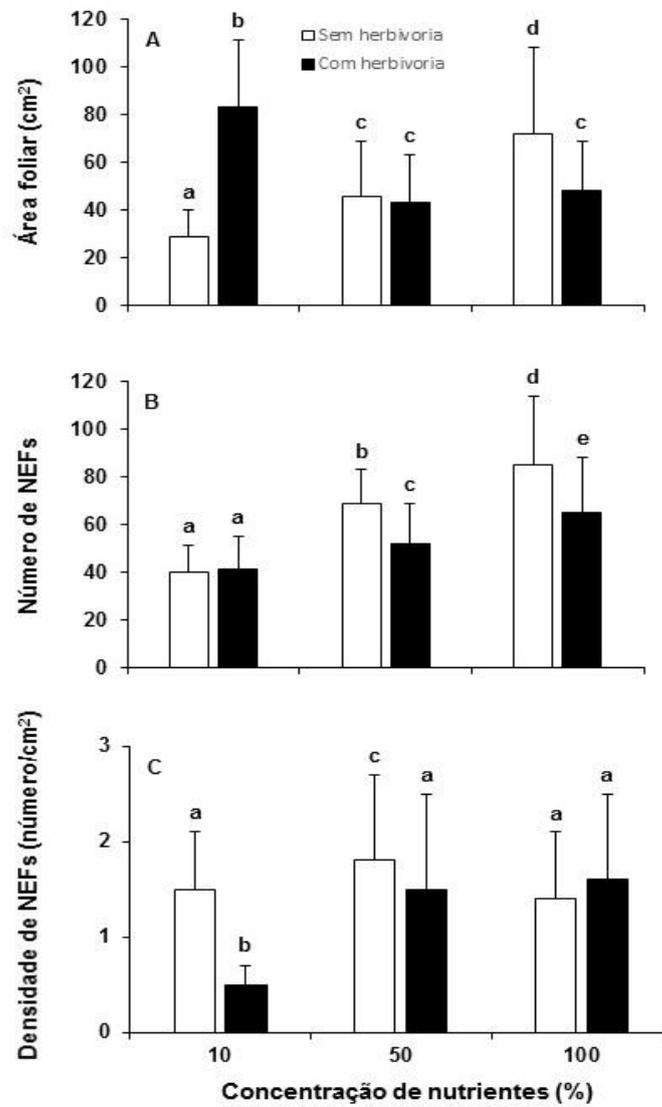
27 Em relação à variação temporal, os resultados diferiram em função da variável
28 resposta analisada e o efeito do *status* nutricional e a herbivoria (Fig. 3). Com
29 herbivoria, a área foliar diminuiu temporalmente à concentração de 10%, mas
30 aumentou sem herbivoria, e teve pico de resposta à 50% de concentração de
31 nutrientes. Para 100% a área foliar segue uma distribuição estabilizadora sem
32 herbivoria, ou seja, primeiro aumenta e depois diminui (Fig. 3A-C). Portanto, a área
33 foliar entre a primeira folha e a última só diferiu significativamente com o *status*
34 nutricional de 10% (média ± DP: 21,34 ± 3,86 vs 28,90 ± 10,24, *t*-test_{1,14} pareado = -

1 2,68, $P = 0,018$ sem herbivoria; média \pm DP: $90,16 \pm 21,40$ vs $58,43 \pm 16,26$, t -test_{1,14}
2 pareado = 4,92, $P < 0,001$ com herbivoria). Quanto ao número de NEFs, houve uma
3 tendência a aumentar sob o efeito de herbivoria, mas o incremento só foi significativo a
4 10% de nutrição (média \pm DP: $37,80 \pm 12,56$ vs $48,00 \pm 16,99$, t -test_{1,14} pareado = -
5 2,67, $P = 0,018$; Fig. 3D-F). Sem herbivoria, o número de NEFs também aumentou
6 significativamente a 10% de nutrição (média \pm DP: $32,40 \pm 5,78$ vs $58,07 \pm 6,16$, t -
7 test_{1,14} pareado = -12,29, $P < 0,001$; Fig. 3D) e à 100% de nutrientes, com uma
8 tendência significativa a atingir um pico de resposta (média \pm DP: $72,27 \pm 23,98$ vs
9 $92,00 \pm 32,37$, t -test_{1,14} pareado = -2,25, $P = 0,041$; Fig. 3F). Finalmente, a densidade
10 de NEFs é uma função da área foliar e o número de NEFs, onde só foi detectável uma
11 variação significativa na concentração de 10% de nutrientes (Fig. 3G). Sem herbivoria,
12 a variação temporal foi oscilante com valores significativamente maiores na folha 10
13 em relação à folha 1 (média \pm DP: $1,57 \pm 0,40$ vs $2,21 \pm 0,69$, t -test_{1,14} pareado = -2,80,
14 $P = 0,014$). Com herbivoria, houve uma tendência significativa a aumentar a densidade
15 ao longo do tempo (média \pm DP: $0,45 \pm 0,21$ vs $0,86 \pm 0,34$, t -test_{1,14} pareado = -4,78,
16 $P < 0,001$).

17 A concentração de açúcares no néctar extrafloral variou consideravelmente. Na
18 presença de herbivoria houve maior quantidade de açúcares secretados, exceto para
19 as plantas cultivadas a 50% de nutrientes, onde se observa decaimento. Na ausência
20 de herbivoria observa-se diminuição gradual de açúcares no néctar de acordo com o
21 aumento da concentração de nutrientes na solução nutritiva. As médias das
22 concentrações são mostradas na Figura 4.

- 1 **Tabela 2:** ANOVAs para o efeito do *status* nutricional, a herbivoria (fatores fixos), planta (fator
- 2 aleatório) e a interação do *status* nutricional X herbivoria (fator fixo) sobre a área foliar,
- 3 número de NEFs e densidade de NEFs em *Luffa cylindrica*.

Resposta	Efeito	g.l.	Média quadrática	F	P
Área foliar	Nutriente	2	1,88x10 ⁴	34,1	<0,001
	Herbivoria	1	1,76x10 ⁴	32,0	<0,001
	Nutriente x herbivoria	2	3,12x10 ⁴	225,0	<0,001
	Planta	14	1,24x10 ⁵	56,6	<0,001
	Erro	880	5,50x10 ²		
Número de NEFs	Nutriente	2	9,19x10 ⁴	278,1	<0,001
	Herbivoria	1	3,16x10 ⁴	96,0	<0,001
	Nutriente x herbivoria	2	1,00x10 ⁴	30,5	<0,001
	Planta	14	2,34x10 ³	7,11	<0,001
	Erro	880	3,29x10 ²		
Densidade de NEFs	Nutriente	2	2,90x10	51,4	<0,001
	Herbivoria	1	3,50x10	62,0	<0,001
	Nutriente x herbivoria	2	2,77x10	49,0	<0,001
	Planta	14	2,43	4,29	<0,001
	Erro	880	0,56		



1 **Figura 2:** Alterações na área foliar, número de NEFs e densidade de NEFs produzidos por *Luffa*
2 *cylindrica* em resposta à interação do efeito do *status* nutricional e herbivoria. Colunas
3 mostram as médias e barras o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças
4 significativas entre tratamentos usando um post-hoc Tukey HSD ($P < 0.05$).

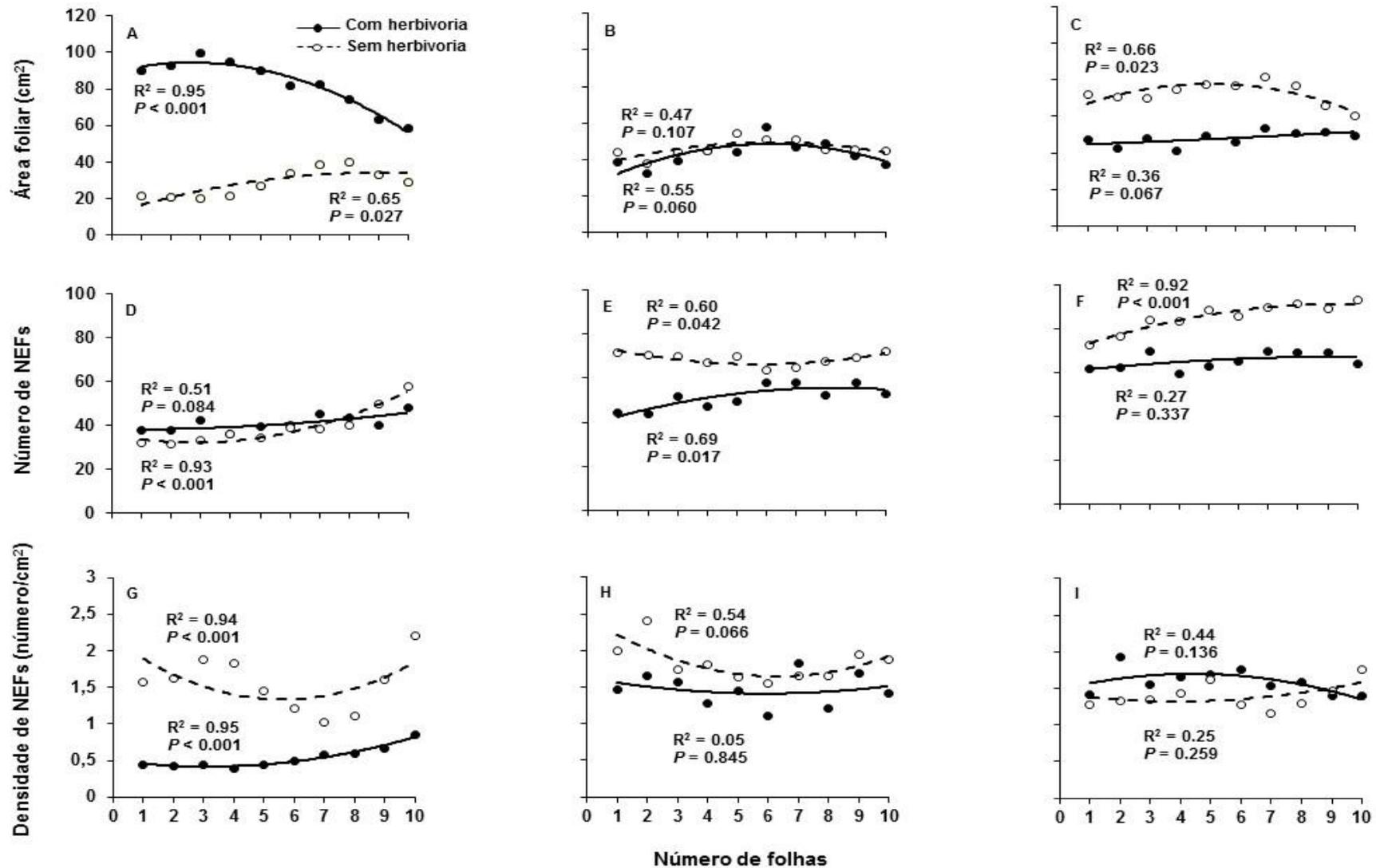
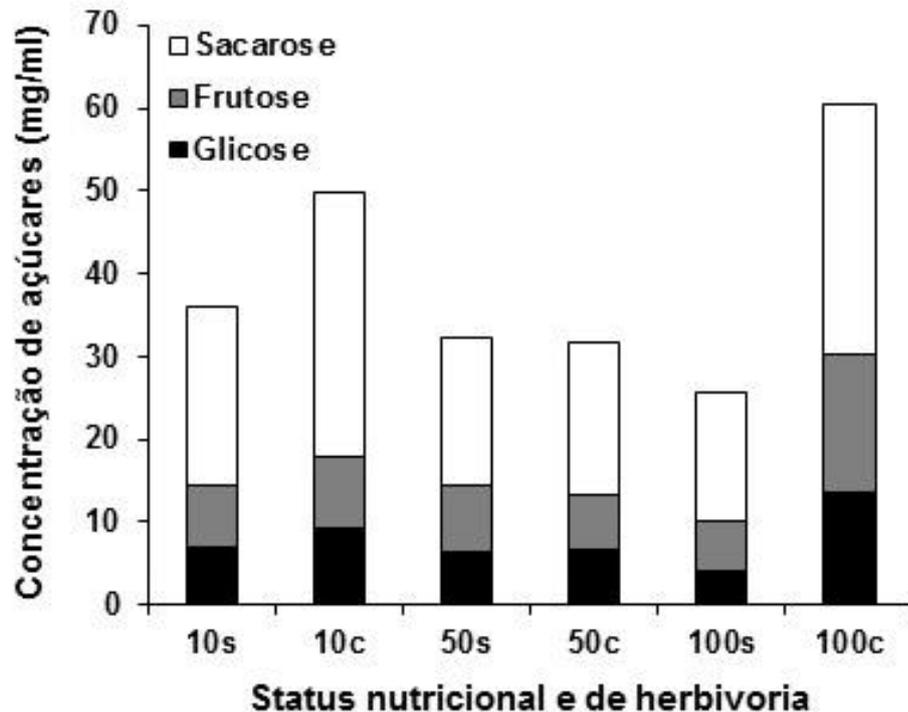


Figura 3: Magnitude e forma das regressões curvilíneas entre área foliar, número de NEFs e densidade de NEFs, e as dez folhas expandidas temporalmente que foram coletadas após o experimento em relação ao *status* nutricional (10%, esquerda, A, D e G; 50%, centro, B, E e H; 100%, direita, C, F e I). e presença ou ausência de herbivoria.



1 **Figura 4:** Concentrações de açúcares no néctar em resposta ao *status* nutricional, com (10c,
2 50c e 100c) e sem (10s, 50s e 100s) herbivoria.

3 DISCUSSÃO

4 Nós demonstramos aqui que a produção de estruturas secretoras, tais como
5 NEFs, relacionadas à defesa indireta da planta e induzida por herbívoros é uma
6 resposta estrutural e metabólica dano-recurso-dependente em *Luffa cylindrica*, uma
7 espécie com uma alta interação biótica com diversos insetos herbívoros e seus
8 predadores. É bem conhecido que a indução do incremento de respostas defensivas
9 nas plantas implica custos diretos em termos de alocação de recursos e que, portanto,
10 a sua disponibilidade pode limitar a defesa e com isso, o sucesso reprodutivo dos
11 indivíduos. Também existem vários estudos que mostram que as defesas indiretas
12 relacionadas na atração de predadores aumentam com a incidência de herbívoros e,
13 portanto, são dependentes do dano. No entanto, pouco é conhecido sobre o efeito
14 combinado da disponibilidade de recursos e a presença/ausência de herbivoria na
15 produção de estruturas secretoras de defesa como os NEFs (Mondor *et al.* 2006).
16 Além disso, acrescentamos informações sobre a escassa pesquisa focada na variação
17 temporal das respostas estruturais e metabólicas relacionadas com a defesa indireta
18 induzida por herbivoria (Dáttilo *et al.* 2015 e suas referências). Nós discutimos o tipo e
19 a intensidade das respostas estruturais e metabólicas dos NEFs em função da

1 variação no *status* nutricional e a herbivoria em *Luffa cylindrica* e as suas implicações
2 ecológicas nas interações planta-herbívoros.

3 Em *Luffa cylindrica* a área foliar e número de NEFs por folha aumentaram com
4 o incremento de nutrientes na ausência de herbivoria. É esperado que plantas com
5 maior aporte de nutrientes apresentem maior área foliar, simplesmente pelo aumento
6 de recursos (Knops e Reinhart 1999; Fageria *et al.* 2009). Além disso, como não há
7 herbivoria, não existe pressão seletiva negativa sobre o tamanho foliar. Vários
8 trabalhos apontam que sob o efeito de herbivoria, as plantas apresentam menor
9 biomassa (revisado em Strauss *et al.* 2002). Era esperado que o número de NEFs
10 aumentasse, acompanhando o incremento de recursos (Stamp 2003; Mondor *et al.*
11 2006). Porém, não era esperado que houvesse aumento no número de NEFs
12 temporalmente na ausência de herbivoria, ou seja, não era esperado que, sem
13 herbivoria, a primeira folha apresentasse menos nectários que a folha décima folha de
14 um mesmo ramo. Então, interpretamos esse aumento no número de NEFs como uma
15 função da área foliar. Assim, com o aumento da área foliar, o número de nectários
16 tende a aumentar para manter a proporção de nectários/cm² e assim a densidade se
17 mantém praticamente estável em quase todos os tratamentos.

18 Quando sob efeito de herbivoria, a área foliar só foi significativamente reduzida
19 a 100% de nutrição em relação à ausência de herbivoria e, em geral, a área foliar foi
20 maior nas plantas cultivadas a 10% de nutrientes quando comparadas às plantas
21 cultivadas a 50 e 100%. Estes resultados são só esperáveis em partes. A redução do
22 tamanho dos órgãos é provável acontecer sob pressões seletivas impostas por
23 inimigos da planta como os herbívoros (ver Strauss *et al.* 2002). No entanto, o maior
24 tamanho foliar a 10% de nutrição confronta as hipóteses iniciais de que este caráter se
25 reduz sob o efeito de herbivoria e que a alocação para crescimento seria tanto menor
26 quanto menor fosse a nutrição (Bentley 1977; Stamp 2003; Mondor *et al.* 2006).
27 Porém, o que observamos ocorrer nesta espécie pode ser interpretado como um efeito
28 da sobrecompensação. Este fenômeno ocorre quando as plantas apresentam maior
29 aptidão quando danificadas em comparação a plantas que não sofreram o dano (Paige
30 e Whitham 1987; Agrawal 2000). A sobrecompensação vai além dos conceitos de
31 resistência e tolerância, porque exige uma relação mutuamente benéfica entre plantas
32 e seus herbívoros (Agrawal 2000). Os benefícios para a planta podem se dar através
33 da liberação da dominância apical, fuga fenológica e até a promoção de crescimento
34 (Agrawal 2000). Foi justamente este último benefício da sobrecompensação que
35 observamos ocorrer no grupo cultivado a 10% da força nutricional. Quando sobre a
36 influência da herbivoria, as plantas sob *stress* nutricional responderam positivamente,

1 incrementando a área foliar. No entanto, vale lembrar que peso seco e comprimento
2 das plantas não foram avaliados neste trabalho.

3 Quanto ao número de NEFs sob o efeito de herbivoria, observamos redução
4 nas plantas cultivadas a 50 e 100% de nutrientes quando comparado ao grupo
5 controle sem herbivoria. Devido à maior disponibilidade de recursos, esperávamos que
6 as plantas cultivadas a 100% de nutrientes apresentassem o maior número de NEFs,
7 seguidas por 50 e 10%, respectivamente. Portanto, este resultado é difícil de explicar
8 baseado na teoria de dano-dependência para produção de NEFs relacionados na
9 defesa indireta induzida por herbívoros (Stamp 2003; Mondor *et al.* 2006). Porém,
10 duas possíveis explicações poderiam ser potencialmente viáveis para entender os
11 nossos resultados. Primeiro, sobre a mesma incidência de herbivoria (15% da área
12 foliar), os efeitos deletérios seriam os mesmos para todas as concentrações
13 nutricionais? Por dispor de menos recursos, o grupo de plantas cultivadas a 10% de
14 nutrientes sofreu maior prejuízo ao perder 15% da área foliar, assim, responderam de
15 forma mais concisa. Talvez, um dano de 15% da área foliar é ainda pequeno para as
16 plantas cultivadas a 50 e 100% de concentração de nutrientes e uma resposta maior
17 poderia acontecer com uma maior incidência de herbivoria. Nesse sentido, sugerimos
18 testar níveis diferentes de dano (25, 50 e 75% por exemplo) em trabalhos futuros, e
19 assim seria possível avaliar se a resposta será a mesma em diferentes concentrações
20 nutricionais. Segundo, a redução no número de NEFs observada nas plantas
21 cultivadas a 50 e 100% de *status* nutricional reflete o decaimento em termos de área
22 foliar. Quanto maior a área foliar, mais provável ter aumento no número de NEFs, pelo
23 simples fato de ter mais espaço. Como a herbivoria resultou em uma redução
24 significativa do tamanho foliar, conseqüentemente, reduziu-se o número de nectários
25 simplesmente por uma questão física de espaço disponível.

26 Um importante achado neste trabalho é a variação temporal nas respostas
27 relacionadas com a defesa indireta induzida por herbivoria. Neste sentido, nas plantas
28 cultivadas a 10% de nutrientes, a área foliar diminui temporalmente da primeira à
29 última das 10 folhas analisadas após o dano. Porém, na ausência de dano, observa-se
30 um incremento na área foliar. A 100% de nutrição e sem herbivoria observa-se uma
31 distribuição estabilizadora da área foliar, com aumento inicial seguido de decréscimo.
32 Acreditamos que estes resultados refletem a deficiência nutricional do grupo cultivado
33 a 10% de nutrientes. Na ausência de dano, a falta de recursos leva ao decaimento da
34 área foliar, o que apoia os argumentos baseados nos compromissos de alocação de
35 recursos em plantas (Lloyd 1980; de Jong e Klinkhamer 2005). Já a 100% de nutrição,
36 as plantas têm nutrientes em abundância e a curva estabilizadora talvez seja o reflexo
37 de um certo compromisso entre tamanho e número de folhas.

1 O número de NEFs tende a aumentar temporalmente quando as plantas
2 sofrem herbivoria. Porém, com 10% de nutrientes esse aumento foi maior. Há ainda
3 um pico de resposta nas plantas cultivadas a 100% de nutrição. Estes padrões são
4 esperáveis já que nas zonas apicais dos ramos, onde as folhas são mais jovens, são
5 mais susceptíveis de serem atacadas por herbívoros e, portanto, a planta otimiza a
6 alocação de recursos à produção de maior número de NEFs nas últimas folhas (Dáttilo
7 *et al.* 2015). Além disso, a incrementada resposta a 10% de nutrição concorda com a
8 possível teoria de sobrecompensação concretizada anteriormente para este *status*
9 nutricional sob o efeito de herbivoria (Agrawal 2000). Finalmente, picos de respostas
10 na atividade de NEFs foram detectados durante o desenvolvimento temporal das
11 folhas em outras espécies (e.g. *Qualea multiflora*, Calixto *et al.* 2015). Era mesmo
12 esperado que ao sofrerem herbivoria as plantas apresentassem maior número de
13 NEFs por folha, porém, o que chama-nos a atenção é a curva ascendente
14 apresentada pelas plantas cultivadas a 10% de nutrição e sem herbivoria pois lhes
15 falta nutrientes e o estímulo do dano. Contudo, ao se analisar a curva de área foliar
16 observa-se certa semelhança com a curva de número de nectários. Portanto, o que se
17 observa é apenas a manutenção da proporção de nectários por unidade de área. Com
18 o aumento espacial houve o aumento de área a ser defendida e com isso a
19 necessidade de se produzir maior número de nectários.

20 No tocante ao néctar, observamos a tendência de maiores quantidades de
21 açúcares totais no grupo de plantas cultivadas a 100% e sob efeito de herbivoria,
22 como era esperado. Já aquelas cultivadas a 100% de nutrição e sem dano foliar
23 apresentam o néctar mais pobre em açúcares dentro deste comparativo, o que apoia a
24 ideia de que estas plantas são aquelas sob menor risco real. O que nos chamou a
25 atenção é que as plantas cultivadas a 10% de força nutricional apresentaram néctar
26 com grande concentração de açúcares. De novo, a teoria de sobrecompensação
27 (Agrawal 2000) e o aumento de risco a perder *fitness* sob este baixo *status* de
28 recursos poderiam explicar este resultado. Um aumento na secreção de açúcares no
29 néctar é associado ao maior risco de ataque por herbívoros (Heil e McKey 2003). Além
30 disso, a qualidade do néctar também é um caráter de defesa, pois ao atrair formigas a
31 planta se beneficia da proteção fornecida por estas (Leitão *et al.* 2005; Pulice e Packer
32 2008; Byk e Del-Claro 2011; Del Claro 2012; Dáttilo *et al.* 2015). Dessa forma, as
33 plantas com deficiência nutricional, aquelas que não podem se dar ao luxo de perder
34 tecido fotossintético, investem na atração de insetos patrulheiros. Quando sofrem
35 herbivoria, intensificam esse apelo, secretando ainda mais açúcar no néctar. Este
36 resultado apoia a teoria de defesa ideal (McKey 1974; Dáttilo *et al.* 2015) uma vez que

1 plantas com recursos em abundância e sob os efeitos de dano foliar apresentam
2 maiores defesas a nível de açúcares no néctar.

3 Em conclusão, nosso trabalho contribui para a compreensão de fatores que
4 moldam a defesa indireta em plantas como o *status* nutricional e a herbivoria através
5 da plasticidade dos nectários extraflorais de *Luffa cylindrica*, mostrando que a resposta
6 de defesa a nível de NEFs é dano-recurso-dependente. Adicionalmente,
7 apresentamos evidência de que a dita resposta mostra variação temporal sob
8 diferentes *status* nutricionais e presença/ausência de herbivoria, um tópico
9 subvalorizado nos estudos de interações multi-tróficas planta-herbívoro-predador. Para
10 trabalhos futuros, sugerimos testar a interferência de níveis diferentes de dano
11 combinados com diferentes concentrações nutricionais. Sugerimos ainda avaliar com
12 mais detalhes a quantidade e a qualidade do néctar secretado pelas plantas em
13 diferentes concentrações nutricionais com ausência e presença de danos. Ainda,
14 nossos resultados contribuem para o conhecimento das implicações ecológicas e
15 evolutivas da combinação da disponibilidade de recursos e a ação da herbivoria sobre
16 o desenvolvimento de respostas induzidas das defesas indiretas das plantas.

17 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

18 **Agarwal VM, Rastogi N. 2010.** Ants as dominant insect visitors of the extrafloral
19 nectaries of sponge gourd plant, *Luffa cylindrica* (L.) (Cucurbitaceae). *Asian*
20 *Myrmecology* **3**:45–54.

21 **Agrawal AA. 1998.** Induced responses to herbivory and increased plant performance.
22 *Science* **279**:1201–1202.

23 **Agrawal AA. 2000.** Overcompensation of plants in response to herbivory and the by-
24 product benefits of mutualism. *Trends in Plant Science* **5**:309–313.

25 **Bentley BL. 1977.** Extrafloral Nectaries and Protection by Pugnacious Bodyguards.
26 *Annual Review of Ecology and Systematics* **8**:407–427.

27 **Blüthgen N, Reifenrath K. 2003.** Extrafloral nectaries in an Australian rainforest:
28 structure and distribution. *Australian Journal of Botany* **51(5)**:515–527

29 **Byk J, Del-Claro K. 2011.** Ant–plant interaction in the neotropical savanna: direct
30 beneficial effects of extrafloral nectar on ant colony fitness. *Population Ecology*
31 **53**:327–332.

- 1 **Calixto ES, Lange D, Del-Claro K. 2015.** Foliar anti-herbivore defenses in *Qualea*
2 *multiflora* Mart. (Vochysiaceae): Changing strategy according to leaf development.
3 *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **212**:19-23.
- 4 **Coley PD, Barone J A. 1996.** Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual*
5 *review of ecology and systematics* **27**:305–335.
- 6 **Crawley MJ. 1983.** Herbivory: The dynamics of animal-plant interactions. *Journal of*
7 *Ecology* **72**(2):703–705.
- 8 **Dáttilo W, Aguirre A, Flores-Flores RV, Fagundes R, Lange D, García-Chavez J,**
9 **Del-Claro K, Rico-Gray V. 2015.** Secretory activity of extrafloral nectaries shaping
10 multitrophic antplant-herbivore interactions in an arid environment. *Journal of Arid*
11 *Environments* **114**:104–109
- 12 **Del Claro C. 2012.** *Ecologia das interações plantas-animais: uma abordagem*
13 *ecológico-evolutiva*. Torezan-Silingardi, H. M. 1ª ed. Rio de Janeiro, Technical
14 Books.
- 15 **Fageria NK, Barbosa Filho MP, Moreira A, Guimaraes CM. 2009.** Foliar Fertilization
16 of Crop Plants. *Journal of Plant Nutrition* **32**:1044–1064
- 17 **Heil M. 2008.** Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* **178**:41–61
- 18 **Heil M. 2011.** Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant*
19 *Science* **16**(4):1360–1385.
- 20 **Heil M; Feil D; Hilpert A; Linsenmair KE. 2004.** Spatiotemporal patterns in indirect
21 defence of a South-East Asian ant-plant support the optimal defence hypothesis.
22 *Journal of Tropical Ecology* **20**:573–580.
- 23 **Heil M, Koch T, Hilpert A, Fiala B, Boland W, Linsenmair K. 2001.** Extrafloral nectar
24 production of the ant-associated plant, *Macaranga tanarius*, is an induced, indirect,
25 defensive response elicited by jasmonic acid. *Ecology* **38**:1083–1088.
- 26 **Hernandez LM, Tupac Otero J, Manzano MR. 2013.** Biological control of the
27 greenhouse whitefly by *Amitus fuscipennis*: Understanding the role of extrafloral
28 nectaries from crop and non-crop vegetation. *Biological Control* **67**:227-234
- 29 **Hoagland DR, Arnon DI. 1950.** The water-culture method for growing plants without
30 soil. *California Agricultural Experiment Station. Circular* 347.

- 1 **de Jong T, Klinkhamer P. 2005.** *Evolutionary ecology of plant reproductive strategies.*
2 Cambridge Univ. Press.
- 3 **Karban R, Baldwin IT. 2007.** *Induced responses to herbivory.* University of Chicago
4 Press.
- 5 **Keeler KH. 2016.** *World list of plants with extrafloral nectaries.*
6 <http://bioscilabs.unl.edu/Emeriti/keeler/extrafloral/worldlistfamilies.htm>. Acesso em
7 janeiro de 2016.
- 8 **Knops JMH, Reinhart K. 1999.** Specific leaf area along a nitrogen fertilization
9 gradient. *The American Midland Naturalist* **144**:265–272
- 10 **Leitão CAE, Meira RMSA, Azevedo AA, Araújo JM, Silva KLF, Collevatti RG. 2005.**
11 Anatomy of the floral, bract, and foliar nectaries of *Triumfetta semitriloba*
12 (Tiliaceae). *Canadian Journal of Botany* **83**:279–286.
- 13 **Lloyd, D.G. 1980.** Sexual strategies in plants. I: An hypothesis of serial adjustment of
14 maternal investment during one reproductive session. *New Phytologist* **86**:69–79.
- 15 **Lowman MD. 1985.** Temporal and spatial variability in insect grazing of the canopies
16 of five Australian rainforest tree species. *Australian Journal of Ecology* **10**:7–24.
- 17 **McKey D. 1974.** Adaptive Patterns in Alkaloid Physiology. *The American Naturalist*
18 **108(961)**:305–320.
- 19 **Mondor EB, Tremblay MN, Messing RH. 2006.** Extrafloral nectary phenotypic
20 plasticity is damage- and resource dependent in *Vicia faba*. *Biology Letters* **2**:583–
21 585.
- 22 **Nahas L, Gonzaga MO, Del-Claro K. 2012.** Emergent impacts of ant and spider
23 interactions: herbivory reduction in a tropical savanna tree. *Biotropica* **44**:498–505.
- 24 **Oliveira PS. 1997.** The ecological function of the extrafloral nectaries: herbivore
25 deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliense*
26 (Caryocaraceae). *Functional Ecology* **11**:323–330
- 27 **Paige KN, Whitham TG. 1987.** Overcompensation in Response to Mammalian
28 Herbivory: The Advantage of Being Eaten. *The American Naturalist* **129**(3): 407-
29 416.

- 1 **Praxedes SC, DaMatta FM, Loureiro ME, Ferrao MAG, Cordeiro AT. 2006.** Effects
2 of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in
3 mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. kouillou) leaves.
4 *Environmental and Experimental Botany* **56**:263–273.
- 5 **Pulice CE, Packer AA. 2008.** Simulated herbivory induces extrafloral nectary
6 production in *Prunus avium*. *Functional Ecology* **22**:801–807.
- 7 **Schmid R. 1988.** Reproductive versus extra-reproductive nectaries – historical
8 perspective and terminological recommendations. *Botanical Review* **54**:179–232.
- 9 **Stamp N. 2003.** Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *The Quarterly*
10 *Review of Biology* **78**:23–55.
- 11 **Strauss SY, Agrawal AA. 1999.** The ecology and evolution of plant tolerance to
12 herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* **14**(5):179-185.
- 13 **Strauss SY, Rudgers JA, Lau JA, Irwin RE. 2002.** Direct and ecological costs of
14 resistance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* **17**(6):278–285.
- 15 **Weber MG, Keeler KH. 2013.** The phylogenetic distribution of extrafloral nectaries in
16 plants. *Annals of Botany* **111**:1251–1261.
- 17 **Zangerl R, Rutledge CE. 1996.** The probability of attack and patterns of constitutive
18 and induced defense: a test of optimal defense theory. *The American Naturalist*
19 **147**(4):599–608.