



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BOTÂNICA
TROPICAL**

RANIELLE DE ARAÚJO MENDONÇA

**TRAÇOS MORFOANATÔMICOS FOLIARES E A INFLUÊNCIA SOBRE A
HERBIVORIA E COEXISTÊNCIA DE DUAS ESPÉCIES DE *MICROGRAMMA*
(POLYPODIACEAE) EM UM FRAGMENTO FLORESTAL AMAZÔNICO**

BELÉM – PA

2023

**TRAÇOS MORFOANATÔMICOS FOLIARES E A INFLUÊNCIA SOBRE A
HERBIVORIA E COEXISTÊNCIA DE DUAS ESPÉCIES DE *MICROGRAMMA*
(POLYPODIACEAE) EM UM FRAGMENTO FLORESTAL AMAZÔNICO**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia e ao Museu Paraense Emílio Goeldi, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Botânica Tropical, para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Sistemática e Evolução de Plantas e Fungos Amazônicos

Orientadora: Dr^a. Ana Carla Feio dos Santos

Coorientador: Dr. Rafael de Paiva Farias

BELÉM – PA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MENDONÇA, RANIELLE DE ARAÚJO

TRAÇOS MORFOANATÔMICOS FOLIARES E A INFLUÊNCIA SOBRE A HERBIVORIA E A COEXISTÊNCIA DE DUAS ESPÉCIES DE MICROGRAMMA (POLYPODIACEAE) EM UM FRAGMENTO FLORESTAL AMAZÔNICO / RANIELLE DE ARAÚJO MENDONÇA. - 2023.

33 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Ciências Biológicas (CB), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2023.

Orientador: Profa. Dra. Ana Carla Feio

Coorientador: Prof. Dr. Rafael de Paiva Farias.

1. Anatomia Vegetal. I. Dos Santos, Ana Carla Feio, *orient.* II. Título

CDD 581.4

RANIELLE DE ARAÚJO MENDONÇA

TRAÇOS MORFOANATÔMICOS FOLIARES E A INFLUÊNCIA SOBRE A HERBIVORIA E COEXISTÊNCIA DE DUAS ESPÉCIES DE *MICROGRAMMA* (POLYPODIACEAE) EM UM FRAGMENTO FLORESTAL AMAZÔNICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia/Museu Paraense Emílio Goeldi como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas Botânica Tropical. Área de Concentração Sistemática e Evolução de Plantas para obtenção do título de mestre

Data da aprovação: 29 de março de 2023

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 ANA CARLA FEIO DOS SANTOS
Data: 28/06/2023 14:07:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a. Ana Carla Feio dos Santos – Presidente
Universidade Federal Rural da Amazônia

Documento assinado digitalmente
 RAFAEL DA SILVA CRUZ
Data: 28/06/2023 17:48:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Rafael da Silva Cruz – 1^o examinador
University of Edinburgh

Documento assinado digitalmente
 THAIS ELIAS ALMEIDA
Data: 28/06/2023 14:33:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a. Thais Elias Almeida – 2^a examinadora
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
 JEFERSON MIRANDA COSTA
Data: 28/06/2023 23:16:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Jeferson Miranda Costa – 3^o examinador
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará

Dr^a. Josiane Silva Araújo – Suplente
Universidade Estadual do Piauí

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), por sua bolsa de mestrado.

Agradeço à Deus, por todos os momentos difíceis que enfrentei durante esses dois anos, não foi nada fácil vencer a minha mente ansiosa.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas–Botânica Tropical UFRA/MPEG, onde me aperfeiçoei academicamente, graças aos seus pesquisadores e corpo docente.

À minha orientadora, Dr^a. Ana Carla Feio, por todo apoio e paciência durante o desenvolvimento do trabalho. Pela confiança, incentivo e acreditar em mim, pois mesmo sem eu ter qualquer experiência na anatomia vegetal, acreditou no meu potencial, até mais do que eu. Obrigada pela amizade e por dividir todos seus ensinamentos.

Ao meu coorientador, Dr. Rafael de Paiva Farias, por ter aceitado contribuir com meu trabalho, por ter compartilhado tantos ensinamentos sobre a herbivoria em samambaias, por todos os conselhos, amizade, paciência e incentivos durante os momentos mais difíceis.

Ao Dr. Hilton Túlio Costi por suas contribuições nas seções de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao meu companheiro de vida, Rodrigo Brito, por ter acompanhado e incentivado nessa caminhada acadêmica desde a graduação, por todo carinho e amor durante todo esse processo.

Aos meus amigos do laboratório de Anatomia vegetal, Zelina, Layse, César, Joana e Layla, por todas as conversas, experiências e por me receberem tão bem no laboratório.

A todos os amigos do MPEG, Antônio, Camila, Kenneri e Izabela, em especial Dheanny e Renan, por estarem comigo nos momentos em que mais precisei!

A todas minhas grandes amigas de Castanhal, que apesar da distância, sempre se mostraram presentes e me apoiando.

Por fim, obrigada a todos aqueles que acreditaram e me incentivaram nessa caminhada.

RESUMO

Cerca de 29% das espécies de samambaias são epífitas, representando um grupo diverso e importante no dossel das Florestas Tropicais. Samambaias epífitas tipicamente apresentam características de tolerância ao estresse hídrico, resistindo à dessecação. Todavia, esse conjunto de características de tolerância é pouco contemplado por estudos que objetivem verificar informações morfoanatômicas. Diante disso, esse estudo teve como objetivos determinar e comparar características morfoanatômicas de *Microgramma lycopodioides* (L.) Copel. e *M. reptans* (Cav.) A.R.Sm., realizando interpretações ecológicas da convergência ou divergência das características frente ao habitat epifítico, bem como seus efeitos na herbivoria. O estudo ocorreu no Parque Estadual do Utinga, um fragmento florestal urbano, situado dentro do Centro de Endemismo Belém. As espécies foram amostradas em forófitos próximos borda florestal. Cerca de 60 folhas foram coletadas e fixadas utilizando protocolos usuais para as análises anatômicas em microscopia de luz e eletrônica, bem como da histoquímica. Adicionalmente, 90 folhas foram coletadas para a mensuração de danos por herbivoria, classificando as folhas nas seguintes categorias estabelecidas: folhas intactas, 0.01-1%, 1-5%, 5-25%, 25-50%, 50-75% e 75-100% de área foliar removida. Os testes histoquímicos realizados nas estruturas secretoras das espécies estudadas foram positivos para compostos fenólicos, lipídios totais, mucilagens ácidas, alcaloides, proteínas e polissacarídeos totais. Esses resultados demonstraram que diversas características estruturais e histoquímicas estão relacionadas à adaptação dessas epífitas em ambientes extremos com alta luminosidade e déficit hídrico, como as bordas florestais, regulando assim a perda de água. Apesar de serem espécies pertencentes ao mesmo gênero, notou-se que indivíduos de *M. reptans* podem ter melhor se adaptado ao ambiente e aos herbívoros, desenvolvendo diferentes características. No entanto, é necessário investigar o conhecimento dos atributos morfofuncionais, especialmente no diagnóstico das estruturas secretoras e sua evolução nos diferentes grupos de samambaias.

Palavras-chaves: Epífitas, histoquímica, interações ecológicas, tricomas glandulares.

ABSTRACT

About 29% of fern species are epiphytes, representing a diverse and important group in the canopy of tropical forests. Epiphytic ferns normally show characteristics of tolerance to water stress, resisting desiccation. However, this set of tolerance characteristics is little contemplated by studies that aim to verify morphoanatomical information. Therefore, this study aimed to determine objectives and compare morphoanatomical characteristics of *Microgramma lycopodioides* (L.) Copel. and *M. reptans* (Cav.) A.R.Sm., interpreting the ecological aspects of the convergence or divergence of characteristics against the epiphytic habitat, as well as their effects on herbivory. The study took place in the Utinga State Park, an urban forest fragment, located within the Belém Endemism Center. The species were sampled in phorophytes close to the forest edge. About 60 leaves were collected and fixed using usual protocols for anatomical analyzes in light and electron microscopy, as well as histochemistry. In addition, 90 leaves were collected to measure herbivory damage, classifying leaves into the following protected categories: intact leaves, 0.01-1%, 1-5%, 5-25%, 25-50%, 50- 75% and 75-100% of leaf area removed. Histochemical tests performed on the secretory structures of the tested species were positive for phenolic compounds, total lipids, acidic mucilages, alkaloids, proteins and total polysaccharides. These results demonstrated that several characteristic and histochemical characteristics are related to the adaptation of these epiphytes in extreme environments with high luminosity and water deficit, such as forest edges, thus regulating water loss. Despite being species belonging to the same genus, it was noted that individuals of *M. reptans* may have better adapted to the environment and herbivores, developing different characteristics. However, it is necessary to investigate the knowledge of the morphofunctional attributes, especially in the diagnosis of secretory structures and their evolution in different groups of ferns.

Keywords: Epiphytes, histochemistry, ecological interactions, glandular trichomes.

SUMÁRIO

1.1. Epífitas e características morfoanatômicas	2
1.2. Relações entre traços morfoanatômicos e herbivoria	3
1.3. O gênero <i>Microgramma</i>	5
REFERÊNCIAS.....	7
CAPÍTULO 1.....	11
INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODOS	15
ÁREA DE ESTUDO	15
COLETA E AMOSTRAGEM.....	15
ANÁLISE ESTRUTURAL E HISTOQUÍMICA.....	16
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	16
ANÁLISE DA HERBIVORIA.....	17
RESULTADOS	17
CONCLUSÃO.....	21
AGRADECIMENTOS	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

1.CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. Epífitas e características morfoanatômicas

Estudos diversos têm descrito características morfoanatômicas de plantas epífitas e/ou buscado compreender suas funções ecológicas frente ao dossel florestal (BRAGA *et al.* 2021; COSTA *et al.* 2022). As epífitas são plantas não parasitárias que crescem sobre outras plantas, presas aos troncos e galhos de árvores e arbustos, onde germinam e permanecem dependentes estruturalmente, sendo uma das formas de vida mais proeminentes nas copas das florestas tropicais (ZOTZ, 2013; TAYLOR, 2022). Dentre os principais representantes das epífitas estão Orchidaceae com 45,8%, Bromeliaceae com 12,9%, Araceae com 5,0%, e Polypodiaceae com 5,5% (ZOTZ; BADER, 2009; KERSTEN, 2010).

As epífitas possuem diversos mecanismos de absorção e armazenamento de água (OLIVEIRA; SAJO, 1999). Em algumas espécies de Bromeliaceae, a presença de parênquima aquífero e parênquima clorofiliano distintos pode indicar metabolismo CAM, uma adaptação a ambientes escassos de água e que estão sujeitos à desidratação, contribuindo para a economia hídrica devido à abertura estomática preferencialmente à noite (SCATENA; SEGECIN, 2005). Zhang *et al.* (2015) demonstraram um conjunto de características morfoanatômicas e fisiológicas que possibilitam a diferenciação do uso de água entre plantas epífitas e terrestres. Dentre as características morfoanatômicas, destacou-se que a espessura foliar e a espessura da epiderme apresentam maiores valores nas plantas epífitas.

A adaptação em determinados tipos de ambientes, como com alta temperatura, disponibilidade de água reduzida e baixa umidade atmosférica, estimularam as plantas a desenvolverem características morfológicas, anatômicas e fisiológicas importantes na evolução adaptativa à escassez hídrica (FAHN; CUTLER,1992). Dentre as adaptações importantes que plantas xerofíticas apresentam, está a esclerofilia, onde suas folhas são denominadas esclerófilas, processo em que há a lignificação, cutinização, em seus tecidos (DICKSON, 2000). A redução da área foliar, estômatos protegidos, tecidos armazenadores de água, idioblastos com compostos fenólicos e cristais, também são alguns exemplos de caracteres morfoanatômicos que determinam a tolerância e resistência ao estresse hídrico (FAHMY, 1997; FAHN; CUTLER, 1992; ROTONDI *et al.*, 2003).

Pereira *et al.* (2022) relataram que características anatômicas, como o mesófilo espesso, são diretamente influenciadas pelas diferenças de altura ao longo dos forófitos e pela consequente variação da intensidade da luz ao longo da estratificação vertical. Adicionalmente, os autores evidenciaram que características como tecidos de armazenamento de água e células parenquimatosas com espessamentos de paredes podem ser diretamente relacionadas ao hábito epífítico, especialmente aos déficits de água e nutrientes impostos por ele, ou ao grupo taxonômico, como ocorre nas samambaias (PEREIRA *et al.*, 2022).

As condições ambientais são um dos fatores que afetam os traços morfoanatômicos, como disponibilidade hídrica, temperatura e intensidade luminosa, podendo influenciar modificações na composição e estrutura da planta (NEVO *et al.*, 2000; GUERFEL *et al.*, 2009). Samambaias epífitas tendem a economizar água nos períodos de seca, armazenando-a para regular sua perda, indicando que ambientes secos são cruciais para o desenvolvimento de estratégias de controle hídricos de epífitas (LI *et al.*, 2020). Algumas samambaias epífitas, como *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston, têm a capacidade de enrolar e desenrolar suas folhas (poiquiloidria), reduzindo a área foliar, representando uma adaptação importante para diminuir a perda de água e danos ocasionados pela luz (VOYTENA *et al.*, 2015).

Campany *et al.* (2021) evidenciaram a prevalência do conservadorismo hídrico em samambaias epífitas e hemiepífitas, por meio da seleção de características anatômicas e estruturais como área de xilema reduzida, comprimentos de estipe mais curtos, lâminas mais espessas e densidade estomática reduzida, que consequentemente evitam o estresse hídrico foliar. Ainda segundo os autores, essas epífitas exibiram pontos de perda de turgor semelhantes, maior potencial osmótico na saturação e menor capacitância tecidual após a perda do turgor, comparadas com as samambaias terrestres (CAMPANY *et al.*, 2021).

1.2. Relações entre traços morfoanatômicos e herbivoria

A herbivoria é a interação onde um animal se alimenta de uma planta e pode resultar em efeitos negativos para a sobrevivência e crescimento de uma população, ou efeitos positivos contribuindo na defesa posterior dessas plantas (MELO; SILVA-FILHO, 2002). Os herbívoros exercem uma pressão sobre as plantas, pressionando-as para se adaptarem em meio aos ataques que sofrem por eles (STAMP, 2003). Entretanto, durante o processo de seleção de plantas, os herbívoros interagem com uma série de atributos da planta – tais

como anatomia, composição química e fenologia - que funcionam como defesas, que podem reduzir a digestibilidade e dificultar o acesso ao recurso alimentar, como a baixa qualidade nutricional (COLEY; BARONE, 1996; RUIZ; WARD; SALTZ, 2008; LAMARRE *et al.*, 2014).

Em samambaias, a herbivoria vêm sendo relatada por Farias *et al.* (2018) e Santos *et al.* (2019) com a ocorrência de galhas. Adicionalmente, Farias *et al.* (2019) determinaram as síndromes de defesas dessas plantas (i.e. conjunto de traços covariantes), onde espécies que apresentavam baixa qualidade nutricional, com folhas glabras e com densidade baixa de tricomas, usavam defesas químicas para proteger suas folhas. Por outro lado, espécies que muitas vezes exibiam uma alta densidade de tricomas e tinham altas concentrações de fenóis, demonstravam uma grande proteção de defesa química através da baixa qualidade nutricional, incluindo altas concentrações de tricomas e fenóis, relacionando os danos foliares numa variação total de 71,74% (FARIAS *et al.* 2019).

Em *Cyathea phalerata* Mart., a rápida expansão foliar pode ser uma estratégia para reduzir os danos às folhas jovens, minimizando a probabilidade de perda total das folhas e acelerando a produção de elementos de defesa (CUNHA *et al.*, 2023). A predação de samambaias é bastante ocorrente e para evitar esses ataques, as plantas desenvolveram alguns mecanismos de defesas, como por exemplo tricomas, domácias (servem de abrigo para formigas patrulharem a planta hospedeira, afastando possíveis predadores), espinhos e armazenamento/secreção de substâncias (compostos fenólicos, mucilagens, óleos, dentre outros) (DELLA; CANESTRARO; DO ROSÁRIO, 2018).

Dentre as características citadas, os tricomas possuem múltiplas funções na adaptação e sobrevivência das plantas, auxiliando também na defesa contra os herbívoros. Dependendo da densidade e tamanho, os tricomas tectores podem atuar diretamente sobre os herbívoros, afetando sua locomoção, alimentação e oviposição (SILVA *et al.*, 2005). Já os tricomas glandulares estão envolvidos com secreção de várias substâncias, como óleos, néctar, sais, resinas, mucilagens ácidas, alcaloides e taninos (HIETZ, 2010). Outros mecanismos de defesas, são a esclerofilia, que torna as folhas mais rígidas afetando diretamente na palatabilidade e na digestibilidade; e inclusões minerais, como os corpos silicosos, que tornam as folhas mais resistentes e endurecidas, aumentando o desgaste do aparelho bucal e reduzindo a digestibilidade das forragens (HANLEY *et al.*, 2007).

Em *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel., compostos fenólicos (taninos e flavonóides) secretados por tricomas glandulares se demonstraram como

adaptação contra a herbivoria, dificultando a predação dessas plantas (MELLO; SILVA-FILHO, 2002). As epífitas possuem importantes relações ecológicas interespecíficas, e algumas samambaias desenvolveram nectários em suas frondes para atrair formigas, demonstrando uma interação positiva para ambas (LANCELLOTTI *et al.*, 2023). Estas características morfológicas contribuem para interações entre esses organismos (WATKINS JR; CARDELÚS; MACK, 2008).

A presença de nectários foliares também pode atuar como uma defesa contra herbívoros, atraindo possíveis predadores, como as formigas, que auxiliam na defesa dessa planta (KOPTUR; RICO-GRAY; PALACIOS-RIOS, 1998). Esses nectários foliares são bem representados em Polypodiaceae, modelo em que pesquisas foram realizadas para confirmar se os nectários promoviam proteção às samambaias contra herbívoros. Experimentos comparando samambaias portadoras de nectários (*Polypodium plebeium* Schldl. & Cham.) e outras samambaias sem nectários (*P. plesiosorum* Kunze, *P. furfuraceum* Schldl. & Cham. e *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger) demonstraram que ao excluir as formigas das folhas em desenvolvimento de *P. plebeium*, os danos causados por herbívoros foram maiores do que as samambaias sem nectários (KOPTUR; RICO-GRAY; PALACIOS-RIOS, 1998). Diante disso, as samambaias apresentam uma variedade de defesas, que auxiliam em sua sobrevivência no ambiente (MEHLTRETER; WALKER; SHARPE, 2010; SAMPAIO; DE SOUZA; PIETROBOM, 2015).

1.3. O gênero *Microgramma*

Microgramma C. Presl é um gênero com 29 espécies neotropicais e uma espécie na África e ilhas do Oceano Índico, sendo um grupo epifítico expressivo (ALMEIDA, 2014). Pertencente à família Polypodiaceae, encontra-se amplamente distribuído nas regiões nas regiões do Brasil, onde ocorrem 18 espécies (ALMEIDA, 2023). *Microgramma* é caracterizada por apresentar folhas pequenas, não divididas, que podem ser monomorfas a dimorfas; venação anastomosada; rizoma com escamas peltadas e opacas; soros arredondados, oblongos a lineares, em uma ou raramente várias fileiras entre a costa e a margem da lâmina (ALMEIDA *et al.*, 2017).

O gênero é composto por espécies epífitas, que dispõem de raízes superficiais que se espalham pelas cascas das árvores e arbustos (TRYON; TRYON, 1982). *Microgramma* é um gênero que vem sendo observado em florestas com os mais variados graus de

perturbação, sendo capaz de suportar diferentes estados de conservação, tornando interessante o seu uso em ações de restauração ecológica e enriquecimento de ambientes degradados (TERCEIRO *et al.*, 2012). Alguns estudos com *M. vacciniifolia* e *M. squamulosa* (Kaulf.) de la Sota destacam a importância ecológica dessas epífitas, que contribuem na manutenção da diversidade biológica e no equilíbrio das interações, resultando na sua grande distribuição, cobrindo extensas áreas da maioria dos forófitos e copas (GONÇALVES; WAECHTER, 2003; GERALDINO; CAXAMBÚ; SOUZA, 2010).

Microgramma possui grande potencial de interações, principalmente com insetos galhadores, além de ser rico em propriedades químicas, que podem contribuir em sua defesa contra a herbivoria (MAIA; SANTOS, 2011). A presença de compostos fenólicos em espécies como *M. vacciniifolia* é uma adaptação contra a herbivoria (VILLELA; CHAVES; DE ALMEIDA OLIVEIRA, 2020). A relação das galhas com o gênero tem sido estudada ao longo dos anos (SOLORZANO-FILHO; KRAUS, 1996; MAIA; SANTOS, 2011; ROCHA; RODRIGUES LANCELLOTTI; GUERRA SANTOS, 2020), e, em pesquisa recente, Santos *et al.* (2021) relataram que *M. vacciniifolia* tem a capacidade de hospedar duas galhas caulinares, induzidas por duas espécies diferentes de insetos, que promoveram alterações específicas na composição de substâncias fenólicas da samambaia hospedeira. Essa grande capacidade de adaptação e tolerância aos ambientes torna o grupo interessante para ser investigado, principalmente do ponto de vista dos atributos morfoanatômicos e funcionais relacionados às defesas contra a herbivoria.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, T. E. **Estudos sistemáticos e filogenéticos no gênero *Microgramma* C.** 2014. Tese de Doutorado. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Presl (Polypodiaceae-Polypodiopsida).
- ALMEIDA, T. E. *et al.* Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Polypodiaceae. **Rodriguésia**, v.68, p.871-880, 2017.
- ALMEIDA, T.E. *Microgramma* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB91654>>. Acesso em: 10 abr. 2023
- BRAGA, A. C. R. *et al.* Epiphytes and forest restoration in the atlantic forest: what do we know so far?. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v.4, n.3, p.4644-4660, 2021.
- CAMPANY, C. E. *et al.* Leaf water relations in epiphytic ferns are driven by drought avoidance rather than tolerance mechanisms. **Plant Cell Environ**, v.44, n.6, p.1741-1755, 2021.
- COLEY, P. D.; BARONE, J. A. Herbivory and plant defenses in tropical forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.27, n.1, p.305-335, 1996.
- COSTA, P. F. *et al.* Regeneração natural em três áreas de restauração florestal no Mato Grosso do Sul, Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 42, 2022.
- CUNHA, S. *et al.* Herbivory and leaf expansion of *Cyathea phalerata* Mart. (Cyatheaceae) in subtropical Atlantic Forest, southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.83, e245386, p.18, 2023.
- DELLA, A. P.; CANESTRARO, B. K.; DO ROSÁRIO, S. M. Tópicos gerais sobre licófitas e samambaias. **BOTÂNICA NO INVERNO 2018 Organizadores Laboratório de Algas Marinhas**. p.77, 2018.
- FARIAS, R. P. *et al.* First record of galls in the tree fern *Cyathea phalerata* (Cyatheaceae) from a Tropical Rainforest in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.78, n.4, p.799-801, 2018.
- FARIAS, R. P. *et al.* Leaf defense syndromes in tropical ferns. **Plant Ecology**, v.221, n.10, p.853-865, 2019.

GERALDINO, H. C. L.; CAXAMBÚ, M. G.; SOUZA, D. C. Composição florística e estrutura da comunidade de epífitas vasculares em uma área de ecótono em Campo Mourão, PR, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.24, n.2, p.469-482, 2010.

GONÇALVES, C. N.; WAECHTER, J. L. Aspectos florísticos e ecológicos de epífitas vasculares sobre figueiras isoladas no norte da planície costeira do Rio Grande do Sul. **Acta Botanica Brasilica**, v.17, n.1, p.89-100, 2003.

GUERFEL, M. *et al.* Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. **Scientia Horticulturae**, v.119, n.3, p.257-263, 2009.

HIETZ, P. Fern adaptations to xeric environments. *In*: Mehltreter, K.; Walker, L. R.; Sharpe, J. M. **Fern Ecology**. New York: Cambridge University Press. p.140–170, 2010.

KERSTEN, R. A. Epífitas vasculares: histórico, participação taxonômica e aspectos relevantes, com ênfase na Mata Atlântica. **Hoehnea**, v.37, n.1, p.9-38, 2010.

KOPTUR, S.; RICO-GRAY, V.; PALACIOS-RIOS, M. Ant protection of the nectaried fern *Polypodium plebeium* in central Mexico. **American Journal of Botany**, v.85, n.5, p.736-739, 1998.

LAMARRE, G. P. A. *et al.* Leaf synchrony and insect herbivory among tropical tree habitat specialists. **Plant Ecology**, v.215, n.2, p.209-220, 2014.

LANCELLOTTI, I. R. *et al.* Formigas associadas às frondes da samambaia *Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum*. **Biota Neotropica**, v.22, n.4, e20221416, 2023.

MAIA, V. C.; SANTOS, M. G. Um novo gênero e espécie de galhador (Diptera, Cecidomyiidae) associado a *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel. (Polypodiaceae) do Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.55, n.1, p.40-44, 2011.

MELLO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. Interações planta-inseto: uma corrida armamentista evolutiva entre dois mecanismos de defesa distintos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.14, n.2, p.71-81, 2002.

MEHLTRETER, K.; WALKER, L. R.; SHARPE, J. M. (Ed.). **Fern ecology**. Cambridge University Press, 2010.

NEVO, E. *et al.* Drought and light anatomical adaptive leaf strategies in three woody species by microclimatic selection at “Evolution Canyon”. **Israel Journal Plant Sciences**, v.48, n.1 p.33-46, 2000.

OLIVEIRA, V. D. C.; SAJO, M. D. G. Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, p.365-374, 1999.

PEREIRA, J. D. *et al.* Structural adaptations in vascular epiphytes from the Atlantic rainforest along phorophyte vertical stratification. **Flora**, v.288, p.152022, 2022.

ROCHA, M.; RODRIGUES LANCELLOTTI, I.; GUERRA SANTOS, M. Cyanogenesis prospection in galled and non-galled tissues of *Microgramma squamulosa* (Polypodiaceae). **Lilloa**, v.57, n.2, p.156-163, 2020.

RUIZ, N. R.; WARD, D.; SALTZ, D. Leaf compensatory growth as a tolerance strategy to resist herbivory in *Pancratium sickenbergeri*. **Plant Ecology**, v.198, n.1, p.19-26, 2008.

SAMPAIO, A. F.; DE SOUZA, M. G. C.; PIETROBOM, M. R. Samambaias da Província Petrolífera de Urucu, Coari, Amazonas, Brasil: Cyatheaceae, Gleicheniaceae, Lygodiaceae, Schizaeaceae, Marattiaceae e Metaxiaceae. **Acta Biológica Catarinense**, v.2, n.1, p.55-69, 2015.

SANTOS, M. G. *et al.* Uma revisão de galhas em samambaias e licófitas. **Entomologia Ambiental**, v.48, p.53-60, 2019.

SANTOS, M. G. *et al.* Substâncias fenólicas e cianogênese em tecidos galhados e não galhados da samambaia *Microgramma vacciniifolia*. **Brazilian Journal of Biology**, v.82, e236151, 2021.

SCATENA, V. L.; SEGECIN, S. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v.28, n.3, p.635-649, 2005.

SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasilica**, v.19, n.1, p.183-194, 2005.

SOLÓRZANO-FILHO, J. A.; KRAUS, J. E. Biologia de galha de *Microgramma squamulosa* (Sota) Kauf. (Polypodiaceae). 1994, Anais. Mar Del Plata: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1994.

STAMP, N. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. **The Quarterly review of biology**. v.78, n.1, p.2355, 2003.

TAYLOR, A. *et al.* Vascular epiphytes contribute disproportionately to global centres of plant diversity. **Global Ecology and Biogeography**, v.31, n.1, p.62-74, 2022.

TERCEIRO, R. G. D. *et al.* Estrutura populacional de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel em um fragmento de Floresta Ombrófila Aberta no nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Biociências**, v.10, n.1, p.5-5, 2012.

TRYON, R. M.; TRYON, A. F. **Ferns and Allied Plants with Special Reference to Tropical America**, Spring-Verlag: New York, 1982.

VILLELA, J. S.; CHAVES, A. L. F.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, L. Estudo de morfologia e histoquímica da espécie *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel, PolypodiaceaePteridófita-corrente no campus da Universidade Estadual de Santa cruz (UESC). **Ciências Biológicas: Campo Promissor em Pesquisa**, v.3, p.191-201, 2020.

VOYTENA, A. P. L. *et al.* *Pleopeltis pleopeltifolia* (Polypodiopsida, Polypodiaceae), a poikilochlorophyllous desiccation-tolerant fern: anatomical, biochemical and physiological responses during water stress. **Australian Journal of Botany**, v.62, n.8, p.647-656, 2015.

WATKINS JR, J. E.; CARDELÚS, C. L.; MACK, M. C. Ants mediate nitrogen relations of na epiphytic fern. **New Phytologist**, v.180, n.1, p.5-8, 2008.

ZHANG, S. B. *et al.* Differentiation of water-related traits in terrestrial and epiphytic Cymbidium species. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p.260, 2015.

ZOTZ, G.; BADER, M. Y. Plantas epífitas em um mundo global em mudança: Efeitos da mudança em epífitas vasculares e não vasculares. **Progress in Botany**, v.70, p.147–170, 2009.

ZOTZ, G. A distribuição sistemática de epífitas vasculares – uma atualização crítica. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.171, n.3, p.453-481, 2013

CAPÍTULO 1

Traços morfoanatômicos foliares de duas espécies de *Microgramma* (Polypodiaceae): novos registros e interpretações de sua influência sobre a herbivoria em um fragmento florestal amazônico

Traços morfoanatômicos foliares de duas espécies de *Microgramma* (Polypodiaceae): novos registros e interpretações de sua influência sobre a herbivoria em um fragmento florestal amazônico

RANIELLE DE ARAÚJO MENDONÇA¹, RAFAEL DE PAIVA FARIAS², ANA CARLA FEIO^{1*}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas–Botânica Tropical, Universidade Federal Rural da Amazônia/Museu Paraense Emílio Goeldi, Avenida Perimetral, 1901, Terra Firme, CEP 66077-830, Belém, PA, Brasil.

² Universidade Federal do Acre, Campus Cruzeiro do Sul

*corresponding author: anacarlafeio@gmail.com

ABSTRACT

About 29% of fern species are epiphytes, representing a diverse and important group in the canopy of tropical forests. Epiphytic ferns normally show characteristics of tolerance to water stress, resisting desiccation. However, this set of tolerance characteristics is little contemplated by studies that aim to verify morphoanatomical information. Therefore, this study aimed to determine objectives and compare morphoanatomical characteristics of *Microgramma lycopodioides* (L.) Copel. and *M. reptans* (Cav.) A.R.Sm., interpreting the ecological aspects of the convergence or divergence of characteristics against the epiphytic habitat, as well as their effects on herbivory. The study took place in the Utinga State Park, an urban forest fragment, located within the Belém Endemism Center. The species were sampled in phorophytes close to the forest edge. About 60 leaves were collected and fixed using usual protocols for anatomical analyzes in light and electron microscopy, as well as histochemistry. In addition, 90 leaves were collected to measure herbivory damage, classifying leaves into the following protected categories: intact leaves, 0.01-1%, 1-5%, 5-25%, 25-50%, 50- 75% and 75-100% of leaf area removed. Histochemical tests performed on the secretory structures of the tested species were positive for phenolic compounds, total lipids, acidic mucilages, alkaloids, proteins and total polysaccharides. These results demonstrated that several characteristic and histochemical characteristics are related to the adaptation of these epiphytes in extreme environments with high luminosity and water deficit, such as forest edges, thus regulating water loss. Despite being species belonging to the same genus, it was noted that individuals of *M. reptans* may have better adapted to the environment and herbivores, developing different characteristics. However, it is necessary to investigate the knowledge of the morphofunctional attributes, especially in the diagnosis of secretory structures and their evolution in different groups of ferns.

Keywords: Epiphytes, histochemistry, ecological interactions, glandular trichomes.

INTRODUÇÃO

As samambaias, grupo diverso e ecologicamente importante em termos de biomassa e interações ecológicas, constituem o segundo maior grupo de plantas vasculares, com cerca de 11.000 espécies (SHARPE et al., 2010). Cerca de 29% das samambaias são epífitas, representação importante no dossel das Florestas Tropicais, contribuindo na manutenção da biodiversidade (DUBUISSON et al., 2009).

A herbivoria em samambaias terrestres e epífitas vem sendo investigada em alguns estudos (SANTOS; VIRGENS; SILVA, 2010; FARIAS *et al.*, 2019). Barcelos e Santos (2014) relatam que a ocorrência de danos foliares por herbivoria em samambaias terrestres e epífitas apresentam uma proporção que varia entre 5-15. Esses autores também observaram que não há diferenças no consumo de folhas férteis e estéreis, porém folhas jovens apresentam consideravelmente menos danos do que as folhas mais velhas (BARCELOS; SANTOS, 2014).

Quanto às defesas químicas relacionadas à defesa contra a herbivoria destacam-se os tricomas glandulares que podem secretar diversas substâncias como óleos, néctar, sais, resinas, mucilagens ácidas, alcaloides e taninos (HANLEY et al., 2007). Recentemente, o conhecimento sobre substâncias químicas que auxiliam contra a herbivoria têm sido ampliados, Castrejón-Varela *et al.*, (2022) relatam a distribuição de biomoléculas (fitoecdisteroides, flavonóides, tiaminase, glicosídeos cianogênicos e alcalóides) que podem atuar como defesas químicas de samambaias, além de samambaias que acumulam metais pesados, que também podem servir como defesa contra herbívoros.

O gênero *Microgramma* C.Presl, apresenta cerca de 29 espécies neotropicais e uma espécie na África e ilhas do Oceano Índico, sendo um grupo epifítico expressivo em Polypodiaceae (ALMEIDA, 2014). Este gênero encontra-se amplamente distribuído nas regiões tropicais do continente americano (MICKEL; BEITEL, 1988). No Brasil, possui ampla distribuição, com 18 espécies (ALMEIDA, 2020), caracterizadas por folhas pequenas, que podendo ser monomorfas a dimorfas, glabras ou escamosas (ALMEIDA, 2017).

Microgramma têm importante relação com insetos, Maia e Santos (2015) relataram que mariposas podem utilizar o caule de *M. geminata* (Schrad.) R.M.Tryon & A.F.Tryon e *M. vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel. como camuflagem, suas pupas são cobertas pelas escamas presente no caule, proporcionando uma ótima proteção para o inseto. Uma outra relação com insetos, é *M. squamulosa* (Kaulf.) de la Sota que as formigas podem utilizar galhas senescentes causadas pela eclosão do inseto galhador, como abrigo (SANTOS *et al.*, 2019). Além disso, a maioria dos estudos relacionados à *Microgramma* estão associados à presença

substâncias químicas encontradas no gênero (MELLO; SILVA-FILHO, 2002; PERES *et al.*, 2009; MAIA; SANTOS, 2011; VILLELA; CHAVES; DE ALMEIDA OLIVEIRA, 2020; SANTOS *et al.* 2021).

Nesta pesquisa, o modelo de estudo são duas espécies de samambaias epífitas do gênero *Microgramma*: *Microgramma reptans* (Cav.) A.R.Sm, que apresenta folhas escamosas e dimórficas. No Brasil, ocorrência na região norte e nordeste. *Microgramma lycopodioides* (L.) Copel. que apresenta folhas glabras, monórficas. No Brasil, ocorrência em todas as regiões do Brasil. Com base nisso, os objetivos da pesquisa foram determinar e comparar caracteres morfoanatômicos de *Microgramma lycopodioides* e *M. reptans*, realizando interpretações ecológicas da convergência ou divergência das características frente ao habitat epifítico, bem como seus efeitos na herbivoria.

MATERIAL E MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDO

O Parque Estadual do Utinga está situado na Amazônia brasileira, estado do Pará (01°25'S e 048°27'W, altitude ≤ 30 m). É uma área de Proteção Ambiental da Região Metropolitana de Belém – APA Belém, pelo Decreto Estadual nº 1.551, de 03 de maio de 1993 (TRINDADE; ANDRADE; SOUZA, 2007). O Parque é uma Unidade de Conservação de Proteção Integral, com cerca de 1.390 hectares, com clima equatorial úmido, com 70-90% de umidade relativa do ar, pluviosidade anual total de aproximadamente 3.000 mm, sendo o período chuvoso entre janeiro e maio (>200 mm) (SEMA, 2014). A temperatura média anual é de 26°C, com mínima de 23°C e máxima de 31°C. O solo predominante da área é do tipo latossolo amarelo (SEMA, 2014). O tipo vegetacional da área é caracterizado como ombrófila densa de terras baixas, havendo predominância de florestas de terras firmes (54,15%), com algumas áreas de floresta inundável de igapó (6,78%). Essa área é considerada regionalmente importante quanto à diversidade vegetal (VELLOSO, 2018).

COLETA E AMOSTRAGEM

Em 2022 foi coletado material foliar para todas as metodologias aplicadas em *Microgramma lycopodioides* e *M. reptans*. As espécies foram coletadas e depositadas no Herbário Emílio Goeldi, *M. lycopodioides* (MG 246075) e *M. reptans* (MG 246109). Para cada espécie estudada foram coletadas folhas a partir de três forófitos (*Mangifera* sp. e *Bambusa* sp.). Para as análises anatômicas em microscopia de luz e eletrônica, e histoquímica, foram feitas

duas coletas, no mês de janeiro e julho, cerca de 60 folhas foram coletadas e fixadas a partir de protocolos usuais, detalhados abaixo. As coletas para a análise dos danos de herbivoria ocorreram entre os meses de março e outubro de 2022, com a coleta de 90 folhas em vários estágios para cada espécie, para realização das estimativas da herbivoria.

ANÁLISE ESTRUTURAL E HISTOQUÍMICA

As amostras foliares foram fixadas em FAA 50 (ácido acético glacial, formaldeído, etanol 50%, 1:1:18, v/v) por 24h (JOHANSEN, 1940) para serem utilizadas para testar as substâncias hidrofílicas e caracterização estrutural; em FNT (formalina neutra tamponada) por 48h (LILLIE, 1965) para substâncias lipofílicas; e em SFF (sulfato ferroso em formalina) por 48h (JOHANSEN, 1940) para evidenciar compostos fenólicos totais. Parte do material foi desidratado em série de álcool butílico terciário, incluído em parafina histológica (Paraplast Plus®, Sigma-Aldrich, Germany) e seccionado em micrótomo rotativo semiautomático (Leica®, RM 2245). Parte dos cortes obtidos foram corados em Safranina e Azul de Astra (GERLACH, 1969) e montados em resina sintética (Permount®, New Jersey, USA).

Para detecção das principais classes de compostos secundários, foram realizados os seguintes testes histoquímicos: cloreto férrico para compostos fenólicos totais (JOHANSEN, 1940); vanilina clorídrica para taninos (MACE; HOWELL, 1974); sudan Black para lipídios totais (PEARSE, 1972); vermelho de rutênio para mucilagem ácida (GREGORY; BASS, 1989); reagente de Wagner para alcaloides (FURR; MAHLBERG, 1981); xylidine ponceau para proteínas (VIDAL, 1970) e PAS para polissacarídeos totais (MCMANUS, 1948). Os controles dos testes foram realizados de acordo com as respectivas técnicas.

A documentação fotográfica foi realizada em fotomicroscópio com câmera fotográfica digital Olympus DP72 acoplada ao microscópio óptico Olympus BX53, bem como, estereomicroscópio Discovery.V8® (©Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) com câmera acoplada AxioCam ICc5® (©Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). As análises de caracterização estrutural e histoquímica foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal e Microscopia do Campus de Pesquisa do Museu Paraense Emílio Goeldi.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para análise em MEV, as amostras fixadas em FAA foram desidratadas em série etanólica e levadas à secagem ao ponto crítico (BOZZOLA; RUSSEL, 1992). Após a montagem em suportes de alumínio (stubs), as amostras foram metalizadas com camada de ouro de aproximadamente 20 nm de espessura, por 150 segundos em corrente de 25 mA (BOZZOLA;

RUSSEL, 1992). A investigação e documentação do material foram efetuadas em microscópio eletrônico de varredura (Leo 1450VP ®, ©Zeiss, Heidelberg, Alemanha) do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Museu Paraense Emílio Goeldi.

ANÁLISE DA HERBIVORIA

Para cada folha foram estimados os níveis de herbivoria, classificando-as em categorias estabelecidas por Kozlov e Zvereva (2017) como: folhas intactas, 0.01-1%, 1-5%, 5-25%, 25-50%, 50-75% e 75-100% de área foliar removida. O nível de herbivoria foi determinado a partir da média dos valores medianos das classes de danos de todas as folhas por espécie, seguindo Dirzo e Dominguez (1985) e Kozlov e Zvereva (2017). Os danos foliares relativos (%) foram normalizados por meio da transformação logarítmica $\ln(n+1)$. Em seguida, os danos foliares foram comparados entre espécies a partir do Teste T de Student para duas amostras independentes, utilizando $p < 0,05$ como nível de significância.

RESULTADOS

Lâmina foliar

Em vista frontal, em ambas as espécies os estômatos são do tipo anomocítico (fig. 1A, B). *Microgramma reptans* apresenta escamas do tipo subuladas (fig. 1C), em toda a superfície, destacando a presença de tricomas glandulares claviformes agrupados (fig. 1D), localizados abaixo de suas escamas (fig. 1C). Em *M. lycopodioides*, as escamas são ausentes, com tricomas glandulares claviformes dispersos (fig. 1E).

Em corte transversal, ambas as espécies apresentam epiderme uniestratificada, com paredes e cutículas delgadas (fig. 2A, B). O mesofilo é homogêneo, com células braciiformes; os feixes colaterais de 2ª ordem estão distribuídos na região mediana (fig. 2C, D). A margem foliar de ambas as espécies é levemente revoluta (fig. 2E, F). Apenas em *M. reptans* foi observado na margem a presença de nectários foliares (fig. 2G, H), com epiderme nectarífera, parênquima nectarífero estruturado com grandes núcleos celulares, vascularização equivalente de xilema e floema.

A nervura central de ambas as espécies é plano-convexa, com epiderme uniestratificada, com colênquima angular (fig. 2I, J). Em *M. reptans* o colênquima apresenta 1 a 2 camadas subjacentes, seguido de 4 camadas parenquimáticas (fig. 2I), enquanto em *M. lycopodioides*, o colênquima possui de 3 a 5 camadas, seguido de 3 a 4 camadas parenquimáticas (fig. 2J). Os feixes vasculares de ambas as espécies são anficrivais. *Microgramma reptans* apresenta um

feixe de grande porte e dois feixes pequenos na região central (fig. 2I), enquanto *M. lycopodioides* possui um único feixe grande (fig. 2J), ambos os feixes são circundados por uma bainha cortical esclerenquimatosa, com disposição cilíndrica.

Pecíolo

O pecíolo de ambas as espécies, apresenta contorno plano-convexo, epiderme uniestratificada e com escamas (fig. 2K, L). Em *M. reptans* ocorrem tricomas glandulares claviformes e captados, o córtex é composto por 1 a 6 camadas de parênquima (fig. 2K), enquanto em *M. lycopodioides* foram observados apenas tricomas glandulares capitados, e córtex composto por 1 a 9 camadas parenquimáticas (fig. 2L). O sistema vascular é do tipo anficrival, com eixo polistélico para ambas as espécies (fig. 2K, L).

Histoquímica das estruturas secretoras

Quanto às estruturas secretoras observadas, além de nectários foliares e tricomas glandulares claviformes e captados, foi identificada a presença de idioblastos. Os testes histoquímicos realizados nas secreções dos tricomas glandulares, tanto da lâmina foliar quanto do pecíolo, foram positivos para compostos fenólicos, lipídios totais, mucilagens ácidas e alcaloides em ambas as espécies e polissacarídeos totais em *M. reptans* (fig. 3A-U). Os resultados dos testes histoquímicos nos nectários foliares de *M. reptans* foram positivos para compostos fenólicos, carboidratos de radicais ácidos (mucilagens ácidas), proteínas e polissacarídeos totais (fig. 4A-D), e nas secreções dos idioblastos as reações foram positivas para compostos fenólicos, lipídios totais, mucilagens ácidas e alcaloides (fig. 3V-Z). Os resultados dos testes histoquímicos estão sumarizados na Tabela 1.

Herbivoria

As médias e os desvios padrão da herbivoria foliar de *M. lycopodioides* e *M. reptans* foram $0,38\% \pm 0,74$ e $0,08 \pm 0,18$, respectivamente (fig. 5). Conforme o Teste T, *M. lycopodioides* teve significativamente maior nível de herbivoria que *M. reptans* ($T = 3,956$; $p < 0,001$) (fig. 6).

DISCUSSÃO

O estudo dos traços morfoanatômicos das duas espécies evidenciam adaptações para o ambiente epifítico. Dentre as espécies estudadas, *Microgramma reptans* apresenta escamas por toda lâmina foliar, diferentemente de *M. lycopodioides* que apresenta a lâmina glabra. Essas escamas são características de mecanismos de defesa contra a dessecação, possuindo a função de absorver água e nutrientes (HIETZ, 2010), a ausência dessa característica em *M. lycopodioides* pode proporcionar uma menor defesa contra a perda de água, porém a ausência de escamas em *M. lycopodioides* também pode indicar que a espécie pode ter desenvolvido outra adaptação para suportar o estresse hídrico.

A presença de tricomas glandulares é considerada uma característica comum para o gênero, de acordo com Enriquez (2020), segundo o qual *M. percussa* possui tricomas glandulares saindo do mesmo ponto de fixação das escamas, assim como *M. reptans*. Sabendo que os tricomas glandulares podem apresentar importante papel na defesa de espécies (MONTEIRO *et al.*, 2005) e através dos metabólitos secundários presentes, como compostos fenólicos, lipídios totais, alcaloides e mucilagens ácidas, a diferença na ocorrência e composição desses tricomas pode ter sido um fator que influenciou na redução da herbivoria de *M. reptans*.

A ocorrência de tricomas agrupados pode proporcionar uma maior produção de secreções, quando comparado com os tricomas dispersos, que por mais que estejam distribuídos por toda a folha, devem fornecer uma menor taxa de secreção. Interpretações semelhantes já vem sendo feitas para estruturas secretoras em angiospermas (MORELLATO; OLIVEIRA, 1991; DALVI; MEIRA; AZEVEDO, 2013), e ao que parece, essa característica de tricomas agrupados pode ter sido uma adaptação do gênero contra a herbivoria. Contudo, são necessários estudos mais aprofundados da evolução das estruturas secretoras em samambaias.

Os nectários foliares presentes em *M. reptans* podem atrair formigas que auxiliam na defesa dessa planta contra possíveis predadores. Alguns autores sugerem que esses nectários podem ter se desenvolvido a partir do floema vazante em folhas expandidas ou tecidos de néctar, fornecendo açúcares para competir com pulgões de seiva (melada) para formigas, em estruturas secretoras que atraem formigas mutualistas, e outros benefícios para proteger as samambaias dos herbívoros (MEHLTRETER; TENHAKEN; JANSEN, 2022). A partir de testes histoquímicos observou-se a presença de compostos fenólicos, carboidratos de radicais ácidos (mucilagens ácidas), proteínas e polissacarídeos totais. A composição desse néctar é um fator importante, pois além de açúcares, pode conter também outras substâncias como lipídios,

compostos fenólicos, proteínas e ácidos orgânicos (BAKER; BAKER, 1983; NICOLSON; THORNBURG, 2007).

Nectários foliares são comuns na família Polypodiaceae (DE LOS ÁNGELES LAGORIA, 2018; JAIMEZ; LEÓN; MARTINEZ, 2021; MEHLTRETER; TENHAKEN; JANSEN, 2021; SANÍN *et al.* 2021), contudo ausentes em *Microgramma*, sendo assim, a presença desses nectários é um novo registro para o gênero, devendo ser melhor investigado tanto do ponto de vista da sua ocorrência e distribuição, quanto da natureza química do exsudato, sendo análises negligenciadas nos estudos com samambaias.

Os compostos fenólicos, muitas vezes, são produzidos a partir de condições de estresse, como ataques de herbívoros, infecções, radiações UV, dentre outros (NACZK; SHAHIDI, 2004). Sendo assim, são componentes de adaptações defensivas (DICKSON, 2000). Nas samambaias, esses componentes são características marcantes entre elas, ocorrendo principalmente nos tecidos de sustentação e feixes vasculares (OGURA, 1972).

Esses compostos são fundamentais no sucesso das primeiras plantas vasculares (COOPER-DRIVER, 1980), uma vez que diferentes classes demonstraram proteger as plantas contra herbívoros e fitopatógenos (SWAIN, 1979). Os compostos fenólicos foram observados em ambas as espécies de *Microgramma* (idioblastos, tricomas glandulares, mesofilo e feixes vasculares), sua presença pode ter contribuído na defesa contra a herbivoria. De acordo com Feio *et al.* (2013) os compostos fenólicos possuem propriedades peculiares relacionadas à herbivoria e à redução de patógenos em *Elaphoglossum laminarioides* (Fée) T. Moore.

Os lipídios podem ser encontrados na superfície foliar como ceras, cutinas e suberinas, atuando na defesa química e promovendo proteção contra a herbivoria (DOS SANTOS SOARES; MACHADO, 2007). Além disso, os lipídios podem ser secretados por estruturas secretoras, como por exemplo, tricomas glandulares. A presença desses tricomas secretores de lipídios podem apresentar defesa química contra os herbívoros, a presença dessa substância dificultando a predação por insetos, devido ao sabor amargo (FAVORITO, 2009).

As mucilagens são compostas principalmente por heteropolissacarídeos ácidos e/ou neutros, proteínas e substâncias fenólicas, e quando em contato com a água tornam-se viscosas (ROCHA *et al.*, 2011). Sendo um exsudato de composição heterogênea, apresentam várias funções nas plantas, como redução de transpiração, reserva de carboidratos e proteção contra a herbivoria (PIMENTEL *et al.*, 2011). Dentre as funções que as mucilagens desempenham, a retenção de água fornece grande importância na sobrevivência das epífitas, pois as células aquíferas são ricas em mucilagens, aumentando essa retenção de água, o que faz dessa

substância uma ótima adaptação ao ambiente epifítico (SCATENA; SCREMINDIAS, 2003), além de proteger cloroplastídios da exposição solar, através da movimentação deles ao longo do desenvolvimento foliar (DOS SANTOS SILVA; MASTROBERTI; DE ARAÚJO MARIATH, 2007).

Os alcaloides são uma grande família com mais de 15.000 metabólitos secundários, solúveis em água, que contêm pelo menos um átomo de nitrogênio na molécula e exibem atividade biológica (GARCIA; CARRIL, 2011). A presença de alcaloides é uma barreira para a herbivoria, pois dificulta a preferência alimentar dos herbívoros, reduzindo possíveis ataques (PEETERS, 2002). Apesar de ser incomum essa substância em samambaias, estudos vêm identificando sua presença (FEIO *et al.*, 2013). Além de estarem relacionados à defesa contra a herbivoria, os alcaloides também desempenham papel importante na redução da perda de água, proporcionando valor adaptativo às espécies em ambientes extremos (MORAES NETO *et al.*, 2022).

Os metabólitos secundários encontrados nas espécies podem estar diretamente ligados à defesa contra a herbivoria. Porém, assim como as plantas, os herbívoros desenvolveram adaptações contra esses metabólitos secundários, através da regulação de genes sensoriais ou desintoxicação de metabólitos tóxico (DIVEKAR *et al.*, 2022; JENBER; WONSMENEH, 2022). Isso pode justificar a baixa defesa de *M. lycopodioides*, que obteve mais danos do que *M. reptans*.

CONCLUSÃO

As duas espécies estudadas apresentam tanto características convergentes (e.g. tricomas) quanto divergentes (escamas e nectários foliares), indicando que diferentes combinações estruturam a tolerância de epífitas. Estudos futuros poderão elucidar o quanto atributos morfoanatômicos são conservados em *Microgramma*. A herbivoria é baixa nas duas espécies, comparativamente a outros dados para samambaias, todavia, parece haver uma maior preferência por *M. lycopodioides*. Notou-se neste estudo que indivíduos de *M. reptans* podem ter desenvolvido métodos de defesa mais eficazes, apresentando diferentes atributos estruturais e químicos, tornando-os mais adaptáveis ao ambiente e aos herbívoros. Ainda assim, percebe-se a necessidade de aprofundar o conhecimento dos atributos morfofuncionais, especialmente no diagnóstico de estruturas secretoras, e sua interpretação nos diferentes grupos de samambaias.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. RAM agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela bolsa de mestrado e ao Instituto IDEFLOR-Bio pelas autorizações de acesso ao PEUt para o desenvolvimento da pesquisa.

Tabela 1. Resultados de testes histoquímicos nos exsudatos das estruturas secretoras de *Microgramma*

Teste		<i>M. reptans</i>			<i>M. lycopodioides</i>	
		Tr	Id	Nf	Tr	Id
Compostos fenólicos	SFF	+	+	+	+	+
Taninos	Vanilina Clorídrica	-	-	-	-	-
Lipídios totais	Sudan Black	+	+	-	+	+
Mucilagem ácida	Vermelho de rutênio	+	+	+	+	+
Alcaloides	Reagente de Wagner	+	+	-	+	+
Proteínas	Xylidine Ponceau	+	+	-	+	+
Polissacarídeos Totais	PAS	+	n.a	+	+	n.a

Legenda: resultado positivo (+); resultado negativo (-); Tr: tricoma; Id: idioblasto; Nf: nectários foliares; n.a.: não aplicável.

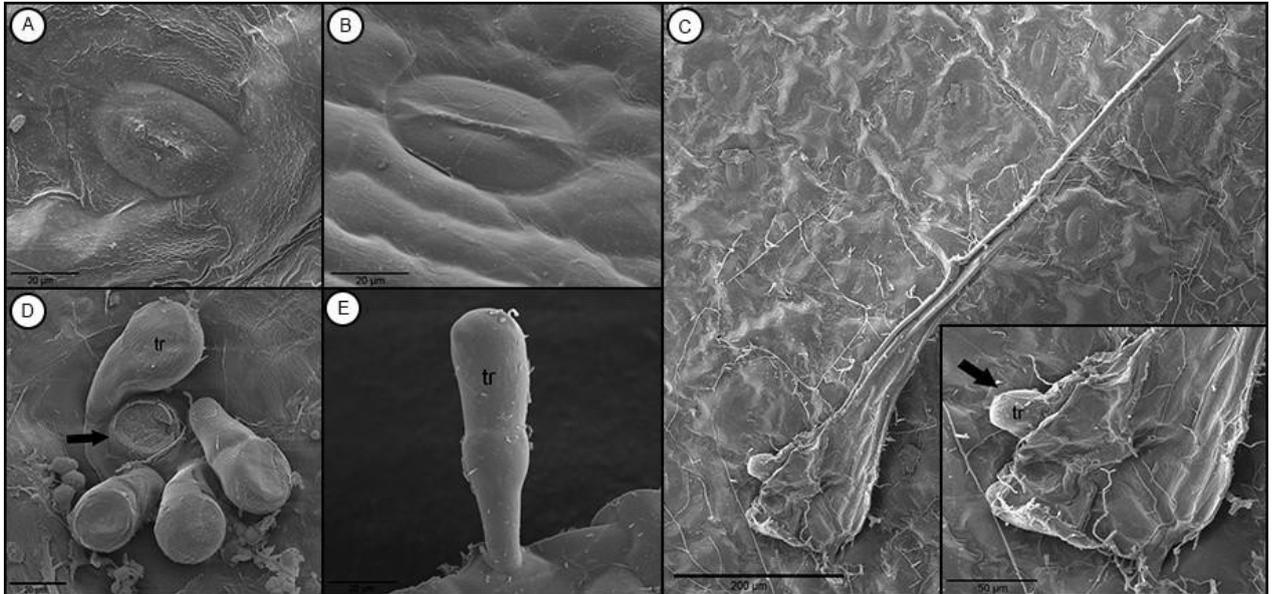


Figura 1. A-F. Vista frontal de *Microgramma*; **A.** Estômato anomocítico de *M. reptans*; **B.** *M. lycopodioides*; **C.** Escama recobrando os tricomas glandulares de *M. reptans*, *inset* com detalhe do tricoma abaixo da escama em *M. reptans*. **D.** Tricomas glandulares claviformes ao redor da base de uma escama (seta); **E.** Tricoma glandular claviforme de *M. lycopodioides*. Barras = 20 μm (A, B, E, F); 50 μm (D) e 200 μm (C).

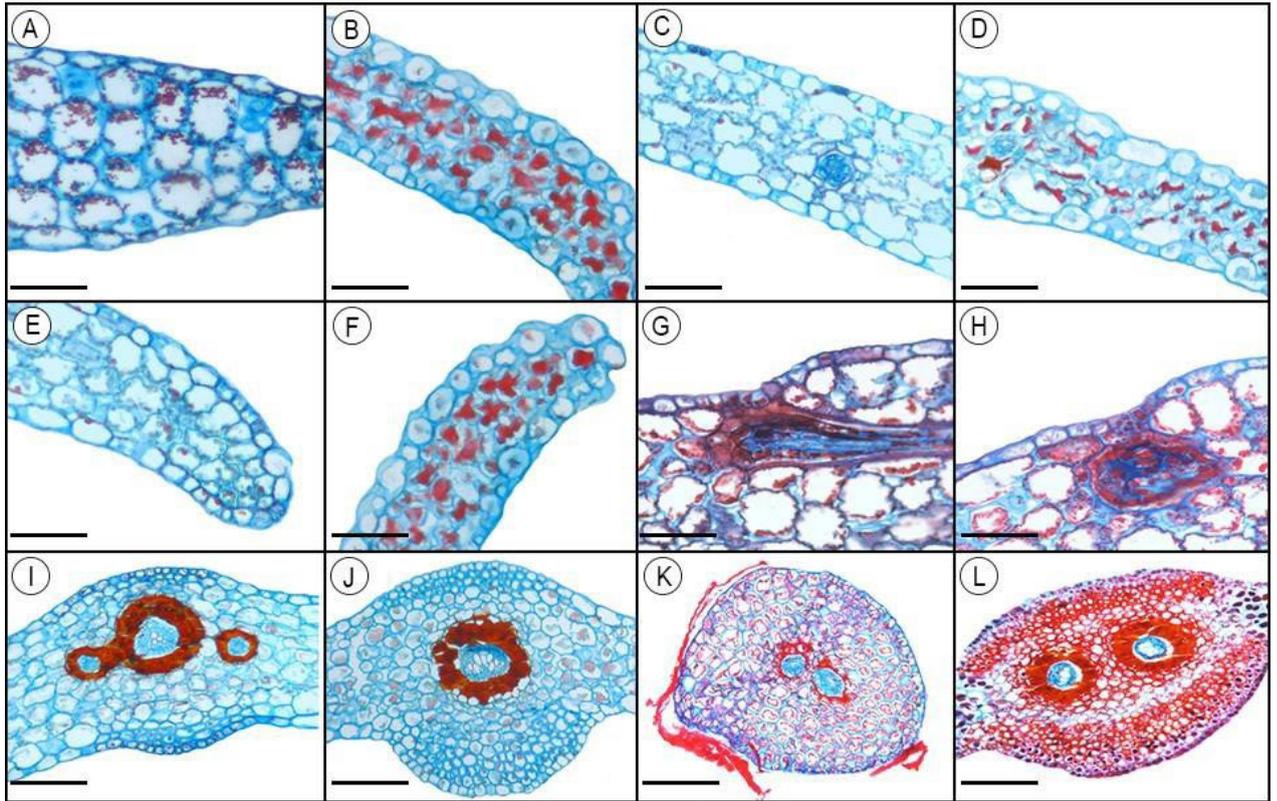


Figura 2. Seções transversais da folha de *Microgramma*; **A.** Epiderme em *M. reptans*; **B.** *M. lycopodioides*; **C.** Mesofilo homogêneo e feixes colaterais em *M. reptans*; **D.** *M. lycopodioides*; **E.** Margem revoluta em *M. reptans*; **F.** *M. lycopodioides*; **G-H.** nectários foliares em *M. reptans*; **I.** Nervura central em *M. reptans*; **J.** *M. lycopodioides*; **K.** Pecíolo em *M. reptans*; **L.** *M. lycopodioides*; Barras= 100 μm (A-L).

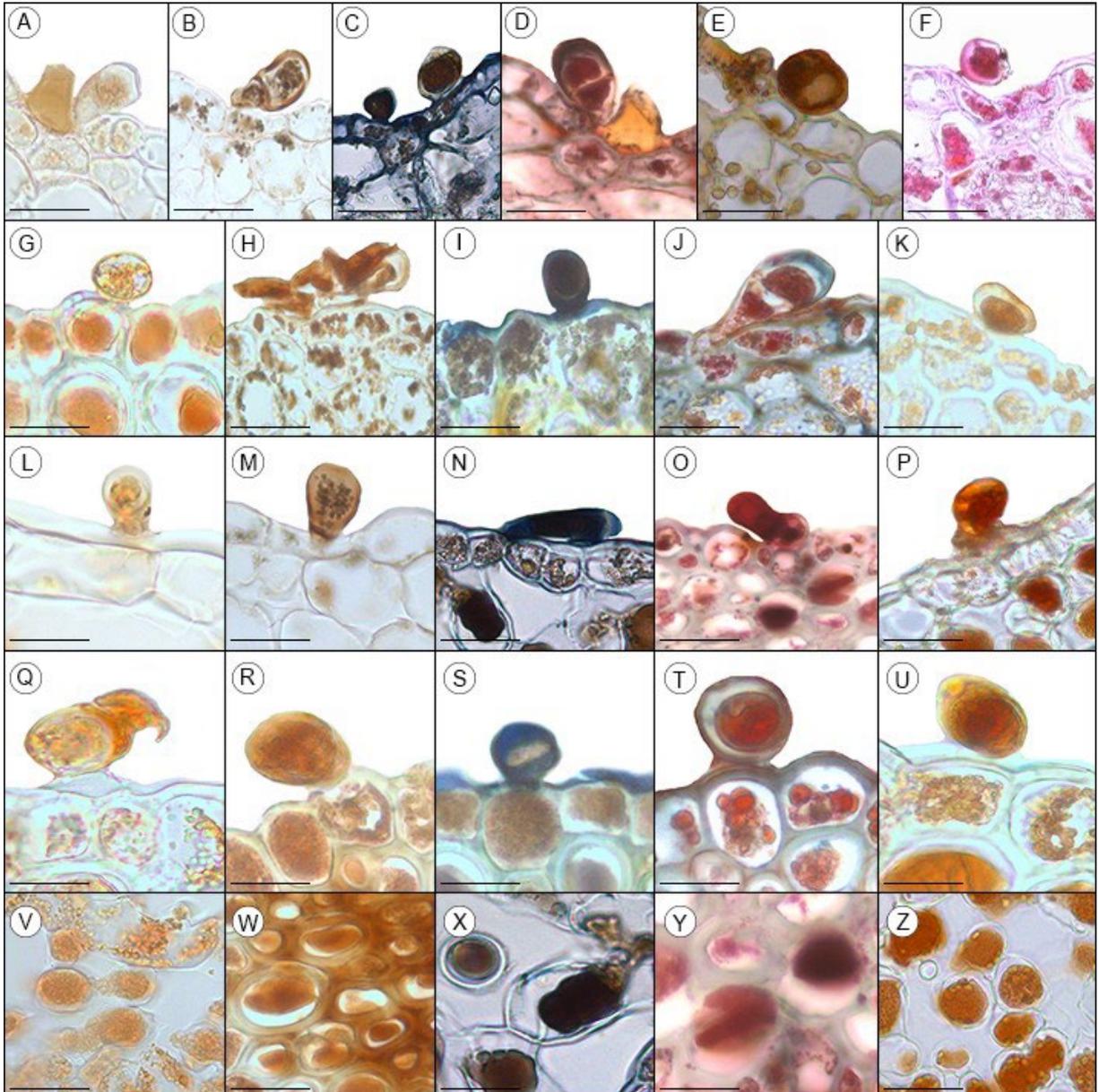
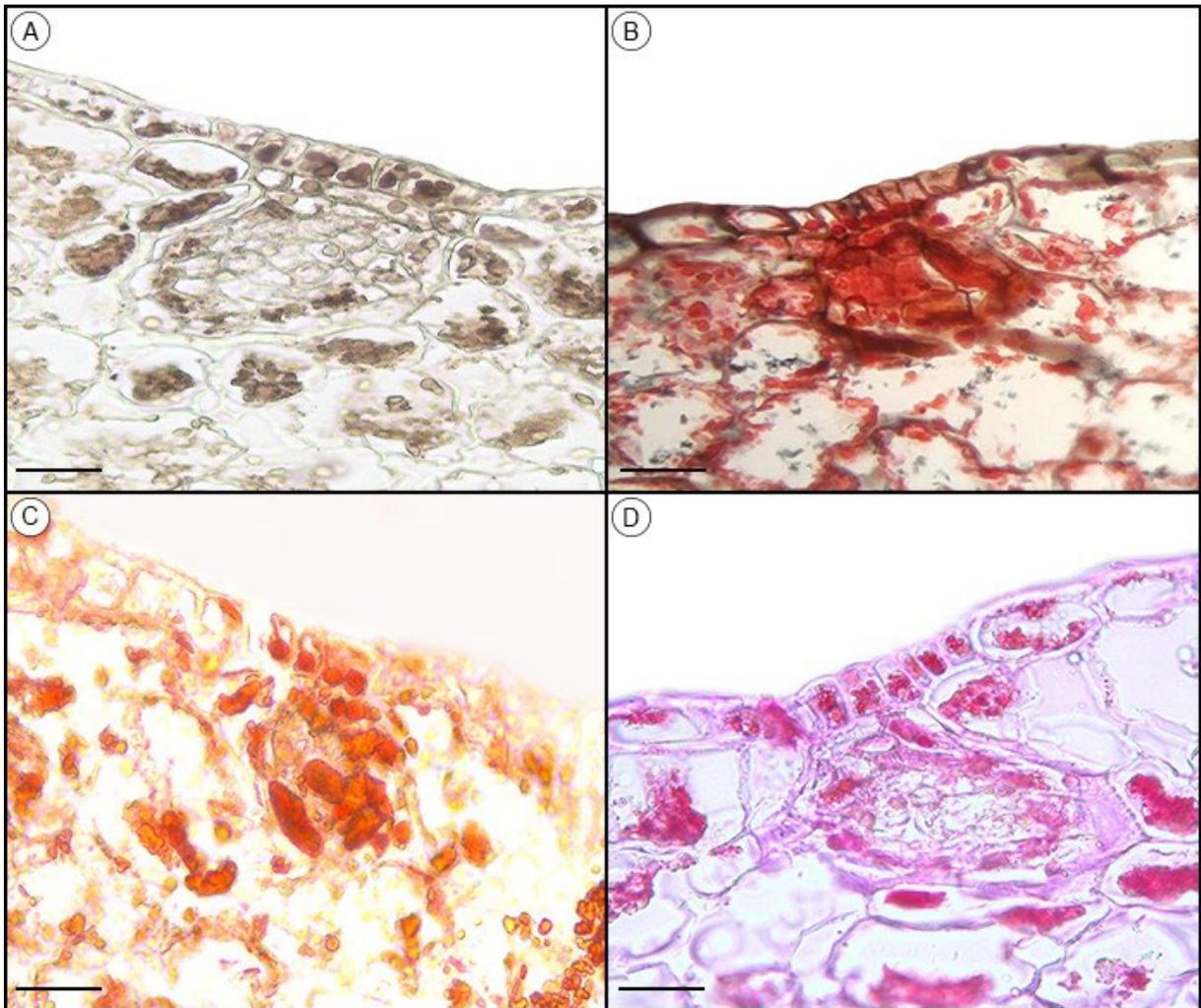


Figura 3. Resultados positivos para tricomas glandulares e idioblastos de *Microgramma*. Tricomas glandulares: **A-K.** *M. reptans*; **A e G.** Branco; **B e H.** Compostos fenólicos; **C e I.** Lipídios totais; **D e J.** Mucilagens ácidas; **E e K.** Alcaloides; **F.** Polissacarídeos totais. **L-U.** *M. lycopodioides*; **L e Q.** Branco; **M e R.** Compostos fenólicos; **N e S.** Lipídios totais; **O e T.** Mucilagens ácidas; **P e U.** Alcaloides. Idioblastos: **V.** Branco; **W.** Compostos fenólicos; **X.** Lipídios totais; **Y.** Mucilagens ácida; **Z.** Alcaloides. Barras= 50 μm (A-Z).

Figura 4. Resultados positivos para nectários foliares de *M. reptans*. **A.** Compostos fenólicos; **B.** Mucilagens ácidas; **C.** Proteínas; **D.** Polissacarídeos totais. Barras= 100 μ m (A, B, C, D);



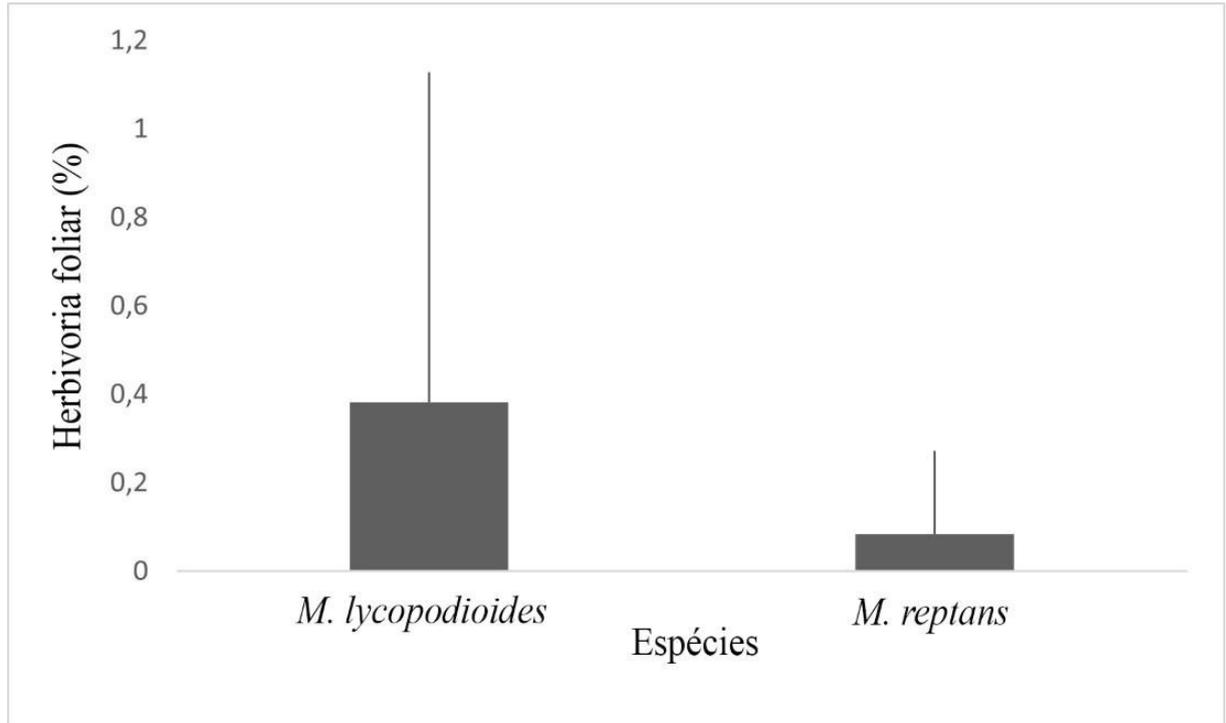


Figura 5. Variação (média e desvio padrão) da taxa de herbivoria em *Microgramma*.



Figura 6. Danos de herbivoria em *Microgramma*. **A.** *M. reptans*; **B.** *M. lycopodioides*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, T. E. **Estudos sistemáticos e filogenéticos no gênero *Microgramma* C.** 2014. Tese de Doutorado. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Presl (Polypodiaceae-Polypodiopsida).
- ALMEIDA, T. E. *et al.* Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Polypodiaceae. **Rodriguésia**, v.68, p.871-880, 2017.
- ALMEIDA, T.E. *Microgramma* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB91654>>. Acesso em: 10 abr. 2023
- ARAÚJO, L. F. B *et al.* Divergência genética com base em características vegetativas e anatômicas foliares de clones de *Coffea canephora*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.42, n.5, p.2717–2734, 2021.
- BAKER, H. G.; BAKER, I. A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In: BENTLEY, Barbara L.; ELIAS, Thomas S. **The biology of nectaries**. Columbia University Press, New York, p.126-152, 1983.
- BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. Jones & Bartlett Learning, 1999.
- COOPER-DRIVER, G. A. The Role of Flavonoids and Related Compounds in Fern Systematics. **Boletim do Torrey Botanical Club**, v. 107, n. 2, p. 116-127, 1980.
- DALVI, V. C.; MEIRA, R. M. S. A.; AZEVEDO, A. A. Extrafloral nectaries in neotropical Gentianaceae: occurrence, distribution patterns and anatomical characterization. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 9, p. 1779-1789, 2013.
- DE LOS ÁNGELES LAGORIA, M. *et al.* Morphoanatomical and histochemical characteristics of the epiphytic fern *Pleopeltis macrocarpa* (Polypodiaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v.41, n.3, p.739-750, 2018.
- DIRZO, R.; DOMINGUEZ, C.A. **Plant-herbivore interactions in Mesoamerican Tropical Dry Forest**. In: Bullock, S.H., Mooney, H.A. & Medina, E. (eds.). John Wiley & Sons, New York, 1985.

- DIVEKAR, P. A. *et al.* Plant Secondary Metabolites as Defense Tools Against Herbivores for Sustainable Crop Protection. **International Journal of Molecular Sciences**, v.23, n.2690, p.124, 2022.
- DOS SANTOS SOARES, A. M.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n.1, p.10, 2007.
- DOS SANTOS SILVA, F.; MASTROBERTI, A. A.; DE ARAUJO MARIATH, J. E. Aspectos anatômico-funcionais das células epidérmicas de pínulas de *Adiantum raddianum* Presl. (Pteridaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.S1, p.831-833, 2007.
- DUBUISSON, J. Y.; SCHNEIDER, H.; HENNEQUIN, S. Epiphytism in ferns: diversity and history. **Comptes rendus biologiques**, v.332, n.2-3, p.120-128, 2009.
- ENRIQUEZ, S.L. **Estudio anatómico do pecíolo de 15 espécies da subfamília Polypodioideae (Polypodiaceae) presentes no México.** Tese de mestrado, UAM-Iztapalapa, Cidade do México, México, 2020.
- FAVORITO, S. **Tricomas secretores de *Lippia stachyoides* Cham. (Verbenaceae): estrutura, ontogênese e secreção.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.
- FEIO, A. C.; AGUIAR-DIAS, A. C. A.; POTIGUARA, R. C. V. *Elaphoglossum* (Dryopteridaceae - Fern) of Amazon Rain Forest in Brazil: Anatomic Characterization and Adaptive Strategies. **American Journal of Plant Sciences**, v.4, n.9, p.1863-1871, 2013.
- FURR, M.; MAHLBERG, P. G. Análises histoquímicas de laticíferos e tricomas glandulares em *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, v.44, n.2, p.153-159, 1981.
- GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (biología)**, v.2, n.3, p.119-145, 2011.
- GERLACH, D. **Botanische Mikrotechnik.** Eine Einführung. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. p.298, 1969.
- GREGORY, M.; BAAS, P. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. **Israel Journal of Botany**, v.38, p.125-174, 1989.

- HANLEY, M. E *et al.* Características estruturais das plantas e seu papel na defesa antiherbívora. *Perspectives in Plant Ecology. Evolution and Systematics*, v.8, n.4, p.157–178, 2007
- HIETZ, P. Fern adaptations to xeric environments. In: Mehlreter, K.; Walker, L. R.; Sharpe, J. M. **Fern Ecology**. New York: Cambridge University Press. p.140–170, 2010.
- JAIMEZ, D. G.; LEÓN, B.; MARTÍNEZ, O. G. Comparative anatomy of five species of *Campyloneurum* (Polypodiaceae) from South America. **Flora**, v.282, p.151881, 2021.
- JENBER, A. J.; WONDMEHEH, T. A. Insect-plant interaction and defense strategies mediated by chemicals: A review. **International Journal of Entomology Research**, v.7, n.4, p.182-189, 2022.
- JOHANSEN, D. A. *et al.* Plant microtechnique. **Plant microtechnique**, n. First Ed, 1940.
- KOZLOV, M. V.; ZVEREVA, E. L. **Background Insect Herbivory: Impacts, Patterns and Methodology**. Progress in Botany, New York, 2017.
- LILLIE, R. D. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. 3. ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1965.
- MACE M. E.; HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings. **Canadian Journal of Botany**, v.52, n.11, p.2423-2426, 1974.
- McMANUS, J. F. A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology**, v. 23, p. 99-108, 1948.
- MEHLTRETER, K.; TENHAKEN, R.; JANSEN, S. Nectaries in ferns: their taxonomic distribution, structure, function, and sugar composition. **American Journal of Botany**, v. 109, n.1, p.46-57, 2022.
- MEHLTRETER, K.; WALKER, L. R.; SHARPE, J. M. (Ed.). **Fern ecology**. Cambridge University Press, 2010.
- MICKEL, J. T.; BEITEL, J. M. Pteridophyte flora of Oaxaca. **Mexico. Mem. New York Bot. Gard**, v.46, n.229, p.434, 1988.

- MONTEIRO, J. M. *et al.* Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química nova**, v. 28, n.5, p. 892-896, 2005.
- MORAES NETO, P. G. *et al.* Structural and histochemical aspects in leaves of six species of *Anemia* (Anemiaceae) occurring in rocky outcrops. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.94, n.3, 2022.
- MORELLATO, L. P. C.; OLIVEIRA, P. S. Distribution of Extrafloral Nectaries in Different Vegetation Types of Amazonian Brazil. **Flora**, v.185, n.1, p.33–38, 1991.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extração e análise de compostos fenólicos em alimentos. **Journal of chromatography A**, v.1054, n.1-2, p.95-111, 2004.
- NICOLSON, S. W.; THORNBURG, R. W. Nectar chemistry. In: NICOLSON, Susan W.; NEPI, Massimo; PACINI, Ettore. **Nectaries and nectar**. Springer Netherlands, p.215-264, 2007.
- OGURA, Y. **Anatomia comparada dos órgãos vegetativos das pteridófitas**. Berlin: Gebrüder Bornträger, 1972. 502p.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: theoretical and applied**. London: Churchill, 1972.
- PEETERS, P. J. Correlações entre características estruturais foliares e densidades de guildas de insetos herbívoros. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.77, n.1, p.43-65, 2002.
- PIMENTEL, R. R.; MACHADO, S.R.; ROCHA, J. F. Estruturas secretoras de *Pavonia alnifolia* (Malvaceae), uma espécie ameaçada de extinção. **Rodriguésia**, v.62, n.2, p.253-262, 2011.
- PRESS, M. C. The functional significance of leaf structure: a search for generalizations. **New Phytologist**, v.143, p.213-219, 1999.
- ROCHA, L. D. *et al.* Morphometric differences of *Microgramma squamulosa* (Kaulf.) de la Sota (Polypodiaceae) leaves in environments with distinct atmospheric air quality. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.86, n.3, p.1137-1146, 2014.

ROCHA, J. F.; PIMENTEL, R. R.; MACHADO, S. R. Estruturas secretoras de mucilagem em *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae): distribuição, caracterização morfoanatômica e histoquímica. **Acta Botanica Brasilica**, v.25, n.4, p.751-763, 2011.

RUIZ, N. R.; WARD, D.; SALTZ, D. Leaf compensatory growth as a tolerance strategy to resist herbivory in *Pancratium sickenbergeri*. **Plant Ecology**, v.198, n.1, p.19-26, 2008.

SANÍN, D. *et al.* The Exception Seems to Be the Rule: Nectaries in Serpocaulon and an Update of Their Presence in Polypodiaceae, **Flora**, p.151864, 2021.

SEMA. **Plano de Manejo do Parque Estadual do Utinga**. 2014. Disponível em: <<https://www.semas.pa.gov.br/2014/04/15/portaria-no-7732013-gabsema-de-12-de-abril-de2013-publicada-no-doepa-no-32-376-de-150413-caderno-4-pagina-6/>>. Acesso em: 23 de junho de 2021.

SCATENA, V. L., SCREMIN-DIAS, E. **Anatomia Vegetal**: Eds. Parênquima, Colênquima e Esclerênquima. Viçosa: Eds. B. Appezzato-da-Glória & S.M. Carmello-Guerreiro, p.109-127, 2003.

STAMP, N. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. **The Quarterly review of biology**, v.78, n.1, p.2355, 2003.

SWAIN, T. **Taninos e ligninas. Herbívoros: sua interação com metabólitos secundários de plantas**, 1979.

TRINDADE M. J. S.; ANDRADE C. R.; SOUZA L. A. L. Florística e Fitossociologia da Reserva do Utinga, Belém, Pará, Brasil. **Biociências**, v.5, n.s2, p.234-236, 2007.

VELLOSO, L. P. L. **A Importância de Ativos Naturais na Produção de Serviços Ecosistêmicos e Geração de Bem-Estar Social na Percepção da População Local: O Caso do Parque Estadual do Utinga em Belém/Pará-2018**. Orientadora: Márcia Jucá Teixeira Diniz. Tese (Doutorado em Economia) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará, 2018.

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceaus 2R. **Ann. Histochem.** v. 15, p. 289-296.

VILLELA, J. S.; CHAVES, A. L. F.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, L. Estudo de morfologia e histoquímica da espécie *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel,

PolypodiaceaePteridófita-corrente no campus da Universidade Estadual de Santa cruz (UESC).
Ciências Biológicas: Campo Promissor em Pesquisa, v.3, p.191-201, 2020.

VOYTENA, A. P. L. *et al.* *Pleopeltis pleopeltifolia* (Polypodiopsida, Polypodiaceae), a poikilochlorophyllous desiccation-tolerant fern: anatomical, biochemical and physiological responses during water stress. **Australian Journal of Botany**, v.62, n.8, p.647-656, 2015.