



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM ÊNFASE EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS

ADALBENICE SOARES DE ANDRADE

**INFLUÊNCIA DA PRECIPITAÇÃO NA MORFOANATOMIA E HISTOQUÍMICA DE
NECTÁRIOS EXTRAFLORAIS (NEFs) DE *Cenostigma microphyllum* (MART EX. G.
DON) E. GAGNON & G. P. LEWIS (FABACEAE) OCORRENTE NO PARQUE NACIONAL
DO CATIMBAU, BUÍQUE-PE**

Recife
2023

ADALBENICE SOARES DE ANDRADE

**INFLUÊNCIA DA PRECIPITAÇÃO NA MORFOANATOMIA E HISTOQUÍMICA DE
NECTÁRIOS EXTRAFLORAIS (NEFs) DE *Cenostigma microphyllum* (MART EX. G.
DON) E. GAGNON & G. P. LEWIS (FABACEAE) OCORRENTE NO PARQUE NACIONAL
DO CATIMBAU, BUÍQUE-PE**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Emília Cristina Pereira de Arruda

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Andrade, Adalbenice Soares de.

Influência da precipitação na morfoanatomia e histoquímica de nectários extraflorais (NEFs) de *Cenostigma microphyllum* (Mart Ex. G.Don) E. Gagnon & G. P. Lewis (Fabaceae) ocorrente no Parque Nacional do Catimbau, Buíque-PE / Adalbenice Soares de Andrade. - Recife, 2023.

67 : il., tab.

Orientador(a): Emília Cristina Pereira de Arruda

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas /Ciências Ambientais - Bacharelado, 2023.

Inclui referências, apêndices.

1. Semiárido. 2. Folha. 3. Estruturas Secretoras. 4. Metabólitos Secundários. 5. Defesa Anti-herbivoria. I. Arruda, Emília Cristina Pereira de. (Orientação). II. Título.

580 CDD (22.ed.)

ADALBENICE SOARES DE ANDRADE

**INFLUÊNCIA DA PRECIPITAÇÃO NA MORFOANATOMIA E HISTOQUÍMICA DE
NECTÁRIOS EXTRAFLORAIS (NEFs) DE *Cenostigma microphyllum* (MART EX. G.
DON) E. GAGNON & G. P. LEWIS (FABACEAE) OCORRENTE NO PARQUE NACIONAL
DO CATIMBAU, BUÍQUE-PE**

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação apresentado ao Bacharelado
em Ciências Biológicas com ênfase em
Ciências Ambientais da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de
bacharel.

Aprovada em: 27/04/2023.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Emília Cristina Pereira de Arruda (Orientadora) /UFPE

Prof^a. Dr^a. Elcida de Lima Araújo/UFPE

Prof^a. Dr^a. Jarcilene Silva de Almeida/UFPE

Recife

2023

Este trabalho é dedicado a minha querida mãe, Loyde Andrade (*in memoriam*), que como educadora, esteve sempre ao meu lado, incentivando e mostrando através de seu exemplo, que a educação é transformadora e que é através dela que você decide até onde você quer chegar.

Te amo eternamente, minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por estar sempre comigo e por me proporcionar mais uma conquista.

A todos os professores e profissionais, que ao longo da minha vida estudantil, contribuíram para meu desenvolvimento intelectual, ajudando-me a alcançar objetivos que favoreceram o meu crescimento pessoal e profissional.

A minha orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Emília Cristina Pereira de Arruda, pelo compromisso e dedicação prestados no decorrer da elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mauro Guida, responsável pelo LFV - Laboratório de Fisiologia Vegetal, por disponibilizar o microscópio com câmera digital para a confecção de imagens.

Ao Prof. Dr. Rafael Farias (Universidade Federal da Bahia - UFBA), pelo apoio dispensado nas análises estatísticas.

À técnica Hianna Fagundes, através do Lami - Laboratório de Microscopia, por fornecer o espaço físico para a obtenção de imagens no MEV.

À família LAVeg - Laboratório de Anatomia Vegetal, que esteve compartilhando a estrutura física do laboratório a fim de que a etapa experimental da pesquisa fosse desenvolvida.

Aos amigos que ganhei ao longo do caminho e a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

“Então disse Deus: Cubra-se a terra de vegetação: plantas que deem sementes e árvores cujos frutos produzam sementes de acordo com as suas espécies. E assim foi .”

Gênesis 1:11.

RESUMO

Nectários extraflorais (NEFs) são estruturas secretoras de compostos químicos, que em conjunto formam o néctar. Muitas espécies da família Fabaceae, que ocorrem em florestas tropicais sazonalmente secas, como a Caatinga, possuem NEFs, como é o caso da *Cenostigma microphyllum*, objeto do presente estudo. Esses nectários desempenham importante papel nas interações planta-animal de muitas comunidades vegetais, podendo ser fortemente influenciadas por fatores bióticos (herbivoria) e abióticos (temperatura, luminosidade e precipitação), especialmente em cenários de mudanças climáticas. Este trabalho traz valiosas e inéditas contribuições ao estudo da morfoanatomia e histoquímica dos NEFs de *C. microphyllum* ocorrente em uma área de Caatinga, e discute a influência de dois períodos de precipitação (seco e chuvoso), sobre essas importantes estruturas. Para tanto, foi utilizada metodologia usual em anatomia vegetal para observações em microscopia óptica e eletrônica de varredura. Os resultados revelaram que os NEFs da espécie estudada são constituídos por uma parte externa (tricoma glandular) e outra interna (ducto), as quais mostraram sensibilidade às curtas mudanças de precipitação avaliadas. Apenas nos tricomas das raques foram observadas projeções filiformes na região do pescoço, sugerindo atuação no mecanismo de secreção. O aumento do comprimento do pescoço e área do ducto nos tricomas dos folíolos, no período seco, aliado à presença de compostos de defesa e nutrição, denotaram a manutenção da funcionalidade mínima da estrutura, mesmo em períodos de déficit hídrico, garantindo a existência da rede ecológica da espécie. A maior diversidade de compostos químicos se deu no período mais úmido, especificamente na cabeça dos tricomas de raques e folíolos, independentemente da precipitação, sugerindo ser esta, a região de disponibilidade de secreções. Houve tendência de investimento de substâncias de nutrição no período seco, com exceção da região do pescoço dos tricomas do folíolo. Já no período mais úmido, os tricomas das raques investiram mais em compostos de defesa do que os tricomas dos folíolos, que tiveram maior investimento em nutrição, indicando funcionalidade divergente dessas estruturas. A descrição da estrutura dos NEFs, aliada a sua química, é essencial para compreender mecanismos de respostas às variações de fatores ambientais, como também entender a interferência dessas estruturas nas

interações planta-animal, em *C. microphyllum*. Esse estudo serve ainda de modelo para futuras pesquisas sobre interações ecológicas na referida espécie.

Palavras-chave: Florestas Tropicais Sazonalmente Secas. Semiárido. Folha. Estruturas Secretoras. Metabólitos Secundários. Defesa Anti-Herbivoria.

ABSTRACT

Extrafloral nectaries (EFNs) are structures that secrete chemical compounds, which together form nectar. Many species of the Fabaceae such as *Cenostigma microphyllum*, object of the present study, which occur in tropical seasonal dry forests, such as Caatinga, have EFNs. These nectaries play an important role in plant-animal interactions in many plant communities, and can be strongly influenced by biotic (herbivory) and abiotic (temperature, light intensity and precipitation) factors, mainly in climate change scenarios. This work brings novel and valuable contributions to the study of the EFNs morphoanatomy and histochemistry in *C. microphyllum* of the Caatinga, and discusses the influence of two precipitation periods (dry and rainy) on these important structures. For this purpose, the usual methods in plant anatomy were used for observations in optical and scanning electron microscopy (SEM). The results revealed that species studied EFNs present an external part (glandular trichome) and an internal part (duct), which showed sensitivity to the short changes in evaluated precipitation. Only in rachis trichomes, filiform projections were observed in the neck region, suggesting participation in the secretion mechanism. The increase in neck length and duct area in the leaflet trichomes in dry period, combined with the presence of defense and nutrition compounds, denoted the maintenance of the minimum functionality of the structure, even in periods of water deficit, securing the species ecological network. The higher diversity of chemical compounds occurred in the rainy period, specifically in trichomes head of rachis and leaflets, independently of precipitation, suggesting that this is the region of secretions availability. There was a trend of investment in nutrition substances in dry period with the exception of the neck region leaflet trichomes. In the rainy season, the rachis trichomes invested more in defense compounds than the leaflet trichomes, which had a higher investment in nutrition, indicating the divergent functionality of these structures. The description of the EFNs structure, together with their chemistry, is essential to understand mechanisms of responses to variations in environmental factors, as well as to understand the interference of these structures in plant-animal interactions, in *C. microphyllum*. This study also serves as a model for future research on ecological interactions in that species.

Keywords: Tropical Seasonal Dry Forest. Semiarid. Leaf. Secretory Structures. Secondary Metabolites. Anti-Herbivory Defenses.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Mapa de localização do Parque Nacional do Catimbau.	20
Figura 2 –	Aspectos gerais da família Fabaceae.	22
Figura 3 –	Aspectos gerais de <i>Cenostigma microphyllum</i> (Fabaceae). A. Hábito. B. Morfologia foliar. C. Morfologia do fruto. D. Morfologia floral.	24
Figura 4 –	Diversidade de localizações de nectários extraflorais (NEFs) em Fabaceae. Estrelas e pontos azuis indicam locais representativos, incluindo exemplos da variação na posição de NEFs em órgãos individuais que os carregam. A. Raízes e brotos. B. Lobo da estípula. C. Lâmina da estípula (superfície abaxial). D. Entre as estípulas (intraestipular). E. Pecíolo (em posições variáveis da base ao ápice). F. Pecíolo e mucro. G,H. Variavelmente entre pares de folíolos e pinas. G. Apenas entre o primeiro par. H. Entre alguns ou todos os pares (em folhas bipinadas: NEFs em algumas raques das pinas, geralmente NEFs nas pontas das pinas). I. Estípulas. J, K. Lâmina foliar (superfície abaxial). L. Margem foliar. M–O. Inflorescências. M. Pecíolo da bráctea, lado dorsal da bráctea e lado dorsal da sépala. N. Zonas de abscisão de brácteas. O. Zonas de abscisão dos pedicelos (por exemplo, botões abortivos ou flores que caem).	27
Figura 5 –	A-D. Cortes transversais da lâmina foliar (folíolos) de <i>Cenostigma microphyllum</i> . A. Aspecto geral do nectário destacando o ducto (Dc, parte interna) formado pelo epitélio (Ep) e lume o tricoma glandular (Tg, parte externa) composto pela base (Ba), pescoço (Pc) e cabeça (Cb). Notar feixe vascular (Fv) adjacente ao ducto (Dc). B. Ducto (Dc) ocupando a porção mediana do folíolo e estando imerso nos parênquimas paliçádico (Pp) e lacunoso (Pl). Notar feixe vascular (Fv) adjacente ao ducto (Dc). C. Ducto	33

(Dc) ocupando a porção mediana do folíolo e imerso no parênquima lacunoso (Pl). Notar feixe vascular (Fv) adjacente ao ducto (Dc). D. Ducto (Dc) ocorrendo na borda do folíolo estando imerso em ambos os parênquimas (Pp e Pl). E-F. Cortes transversais da raque de *C. microphyllum*. E. Nectários sob a forma de tricoma glandular (Tg). F. Nectário sob a forma de tricoma glandular (Tg) apresentando projeção celular filiforme (Pr) partindo da região do pescoço (Pc). Ab-Face abaxial do folíolo, Ad-Face adaxial do folíolo, Lu-Lume, Tt-Tricoma tector.

Figura 6 – A-F. Dissociação dos folíolos de *Cenostigma microphyllum*. 34
 A-C. Superfície adaxial do folíolo dos indivíduos 1 (Ind1), 2 (Ind2) e 3 (Ind3) analisados no estudo. D-F. Superfície abaxial dos folíolos dos indivíduos 1 (Ind1), 2 (Ind2) e 3 (Ind3) analisados no estudo. G-I. Dissociação das raques de *Cenostigma microphyllum*. Aba-Epiderme abaxial, Ada-Epiderme adaxial, Indivíduo 1 (Ind1), Indivíduo 2 (Ind2), Indivíduo 3 (Ind3), Es-Estômato, Tg-Tricoma glandular, Tr-Tricoma tector.

Figura 7 – A-I. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos 35
 folíolos (A-F) e raque (G-I) de *Cenostigma microphyllum*. A-C. Superfície adaxial do folíolo dos indivíduos 1 (Ind1), 2 (Ind2) e 3 (Ind3) analisados no estudo. D-F. Superfície abaxial dos folíolos dos indivíduos 1 (Ind1), 2 (Ind2) e 3 (Ind3) analisados no estudo. G-H. Superfície das raques dos indivíduos 1 (Ind1), 2 (Ind2) e 3 (Ind3). Aba-Epiderme abaxial, Ada-Epiderme adaxial, Indivíduo 1 (Ind1), Indivíduo 2 (Ind2), Indivíduo 3 (Ind3), Es-Estômato, Pr-Projeções filiformes, Tg- Tricoma glandular, Tt-Tricoma tector.

Figura 8 – A-F. Artrópodes visitantes (setas) observados nos 36
 nectários extraflorais (NEFs) de *Cenostigma microphyllum*.

- Figura 9 – A-I. Testes histoquímicos em raques e folíolos de *Cenostigma microphyllum*. A-B. Lipídios detectados com Sudam III. C. Amido (seta) detectado com Lugol. D-E. Compostos fenólicos (seta) detectados com Cloreto férrico. Notar presença intensa de compostos fenólicos no pescoço e na base dos nectários (tricomas) no canto superior direito. F-G. Detecção de taninos com Vanilina clorídrica. H. Detecção de alcaloides com o Reagente de Wagner. I. Detecção de açúcares com Fenilhidrazina. Setas – Detalhes das reações positivas para os diferentes compostos químicos. 37
- Figura 10 – Resultado do teste histoquímico realizado nos indivíduos de *Cenostigma microphyllum* no período seco. I1-Indivíduo 1, I2-Indivíduo 2, I3-Indivíduo 3, TG-Tricoma glandular. 39
- Figura 11 – Resultado do teste histoquímico realizado nos indivíduos de *Cenostigma microphyllum* no período chuvoso. I1-Indivíduo 1, I2-Indivíduo 2, I3-Indivíduo 3, TG-Tricoma glandular. 40
- Figura 12 – Esquema representativo da ocorrência dos compostos químicos nos tricomas glandulares e ductos da raque e folíolo de *Cenostigma microphyllum* na seca (1a coleta). 41
- Figura 13 – Esquema representativo da ocorrência dos compostos químicos nos tricomas glandulares e ductos da raque e folíolo de *Cenostigma microphyllum* no período chuvoso (2a coleta). 42
- Figura 14 – Percentual de compostos de defesa e nutrição presentes nos tricomas glandulares de *Cenostigma microphyllum* nos dois períodos de precipitação avaliados. 44
- Figura 15 – Fluxo dos compostos químicos no interior dos ductos e tricomas glandulares de raques e folíolos de *Cenostigma microphyllum*. 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Reagentes utilizados para realização dos testes histoquímicos e o respectivo grupo metabólico que são capazes de identificar.	29
Tabela 2 –	Escala utilizada para construção da matriz numérica e dos gráficos das análises histoquímicas.	30
Tabela 3 –	Resultado das análises estatísticas entre todos os parâmetros avaliados nos dois períodos de precipitação. P1-1a coleta, seca; P2-2a coleta, chuva.	46
Tabela 4 –	Resultado das análises estatísticas entre os parâmetros dos tricomas glandulares nas raques e folíolos, avaliados nos dois períodos de precipitação. P1-1a coleta, seca; P2-2a coleta, chuva.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FAA	Formaldeído, ácido acético e álcool etílico
FMA	Fungos micorrízicos arbusculares
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
LPWG	Legume Phylogeny Working Group
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NEF	Nectário extrafloral
NEMA	Núcleo de Ecologia e Monitoramento Ambiental
PARNA	Parque Nacional
PBMC	Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas
PELD	Programa de pesquisa ecológica de longa duração
UC	Unidade de conservação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	CAATINGA	18
2.2	FAMÍLIA FABACEAE	20
2.3	O GÊNERO <i>Cenostigma</i> Tul. (antigo <i>Caesalpinia</i> L.)	22
2.4	NECTÁRIOS	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	ÁREA DE ESTUDO E COLETA DO MATERIAL VEGETAL	28
3.2	PREPARO DE LÂMINAS PARA ANÁLISES EM MICROSCÓPIO ÓPTICO	28
3.3	DISSOCIAÇÃO E CLARIFICAÇÃO EPIDÉRMICA E ANÁLISE EM MICROSCÓPIO ÓPTICO	29
3.4	HISTOQUÍMICA E ANÁLISE EM MICROSCÓPIO ÓPTICO	29
3.5	ANÁLISES EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	30
3.6	ANÁLISE DE LÂMINAS E DOS DADOS	31
4	RESULTADOS	32
4.1	MORFOANATOMIA, LOCALIZAÇÃO E VISITANTES DOS NEFs FOLIARES	32
4.2	HISTOQUÍMICA	36
4.3	ASSOCIAÇÃO DA PRECIPITAÇÃO COM OS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS ANALISADOS NOS NEFs	45
5	DISCUSSÃO	47
5.1	MORFOANATOMIA, LOCALIZAÇÃO E VISITANTES DOS NEFs FOLIARES	47
5.2	HISTOQUÍMICA	49
5.3	ASSOCIAÇÃO DA PRECIPITAÇÃO COM OS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS ANALISADOS NOS NEFs	50

6	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54
	APÊNDICE A - TABELA DE MEDIDAS COM OS PARÂMETROS AVALIADOS NOS NEFs DE RAQUES E FOLÍOLOS DE <i>CENOSTIGMA MICROPHYLLUM</i> NA SECA (1a COLETA)	60
	APÊNDICE B - TABELA DE MEDIDAS COM OS PARÂMETROS AVALIADOS NOS NEFs DE RAQUES E FOLÍOLOS DE <i>CENOSTIGMA MICROPHYLLUM</i> NA CHUVA (2a COLETA)	61
	APÊNDICE C - TESTE DE NORMALIDADE DAS AMOSTRAS	62

1 INTRODUÇÃO

A Caatinga encontra-se inserida em um ambiente semiárido, escasso de chuvas e se apresenta com uma vegetação arbórea e arbustiva, onde há uma predominância de espécies caducifólias, uma grande representatividade de cactáceas, bromeliáceas e vários endemismos (ANDRADE-LIMA, 1981). O déficit hídrico e a irregularidade na distribuição de chuvas ao longo do ano, são fatores determinantes para que ela detenha a classificação de floresta seca (QUEIROZ, 2009). Possui uma área de 912.529 km² e é exclusivo do Brasil.

A Caatinga possui unidades de conservação (UCs), dentre elas, o Parque Nacional (PARNA) do Catimbau, localizado no estado de Pernambuco, nos municípios de Buíque, Ibimirim e Tupanatinga, que é classificado como UC de proteção integral, diante da sua vulnerabilidade à desertificação.

O bioma possui uma grande biodiversidade, dispondo de uma flora composta por famílias de expressiva importância econômica e ecológica, tais como a Fabaceae, Bromeliaceae, Caesalpiniaceae, Cactaceae, entre outras. A família Fabaceae é de grande representatividade, possuindo 320 espécies distribuídas em 86 gêneros, constituindo um terço da riqueza do bioma. Já no Parque Nacional do Catimbau, a família possui 109 espécies, sendo a mais representativa e com maior diversidade.

Diante da vulnerabilidade da Caatinga à desertificação, impulsionada pela escassez hídrica e pelas mudanças climáticas, cujas previsões apontam para uma elevação de 4,5°C na temperatura do bioma, bem como uma diminuição da precipitação em até 50%, até o ano de 2100 (PBMC, 2013), a biodiversidade pode sofrer perdas incalculáveis de grupos taxonômicos e funcionais (PONCE-REYES et al., 2013; GARCÍA-VALDÉS et al., 2015). Por ser considerada a segunda floresta seca do planeta, rica em espécies lenhosas (DRYFLOR, 2016), a Caatinga se mostra como um grande laboratório para vários estudiosos, que procuram entender e projetar cenários futuros sobre a interferência das mudanças climáticas em sua diversidade biológica (PARMESAN; YOHE, 2003a; ROOT et al., 2003; FRANKS et al., 2014).

Por ter grande importância econômica e ecológica, além de constituir cerca de um terço da riqueza do bioma, a família Fabaceae desperta o interesse de pesquisadores, especialmente no que diz respeito a sua conservação, visto que tem grande utilização na alimentação humana e animal. A espécie *Cenostigma*

microphyllum, representante da referida família e objeto deste estudo, detém uma das principais importâncias ecológicas, como a capacidade de se fixar em áreas degradadas da Caatinga, podendo ser utilizada em projetos de recuperação dessas áreas, evitando o processo de desertificação (SFAIR et al., 2018). Ademais, a espécie atua em comunidades vegetais, através de um importante processo ecológico de interação planta-animal, utilizando estruturas secretoras chamadas de nectários extraflorais (NEFs), comumente encontrados em diversas espécies da família Fabaceae (MELO et al., 2010).

Estudos têm revelado que o aumento das médias de temperaturas e o estresse hídrico podem provocar mudanças na produção e na secreção do néctar extrafloral (MURCIA, 1995), podendo assim, interferir na relação mutualista com artrópodes, especialmente formigas, que se alimentam do néctar ofertado e em contrapartida oferecem proteção à planta contra o ataque de herbívoros (KOST, 2005; GUIMARÃES JR, 2006; SAVAGE et al., 2009; VILHENA-POTIGUARA, 2012). Essa relação é de grande importância ecológica, pois o comportamento da formiga evita que a planta seja predada, favorecendo assim, a conservação de uma das famílias mais representativas da Caatinga.

O néctar extrafloral possui em sua composição diversas substâncias, as quais são secretadas pelos NEFs e podem ser caracterizadas como compostos de nutrição e de defesa. Lipídios, amido, açúcares redutores, carboidratos, vitaminas, proteínas, são exemplos de substâncias de energia e/ou reserva por possuírem grande valor nutricional. Já os fenóis, taninos, alcalóides, entre outros, possuem agentes antioxidantes e toxinas que atuam na defesa da planta contra a herbivoria (BAKER; BAKER, 1983, 1990; FAHN, 2000; NICOLSON; THORNBURG, 2007; ROSHCHINA; ROSHCHINA, 1993; STEFANO et al., 2001). O volume e a quantidade de substâncias que compõem o néctar, podem sofrer interferência de fatores ambientais como, por exemplo, a precipitação (DELGADO, 2011). ALBERGARIA (2020) menciona o aumento de taxas de fenóis em plantas sob déficit hídrico, cujos taninos desempenham função de defesa contra dessecação e herbivoria. Açúcares, que são alguns dos principais componentes do néctar “alimentar”, além de lipídios, aminoácidos e outras substâncias de nutrição, geralmente, podem ter sua quantidade reduzida em períodos mais secos devido à redução de visitantes nesse período, representando assim uma economia dos custos de energia por parte da planta (GHARIBI, 2015; ALBERGARIA, 2020;

CÂMARA et al., 2021). Segundo Delgado (2011), as secreções provenientes de NEFs apresentam respostas variadas em plantas do Cerrado de acordo com a ação de fatores como herbivoria e queimadas, como também à ontogenia.

Estudos como esse, são de fundamental importância para a compreensão da influência de fatores bióticos (herbivoria) e abióticos (precipitação, temperatura, etc.) nas estruturas secretoras de espécies como *C. microphyllum* da Caatinga, a fim de contribuir com uma melhor percepção da interferência desses fatores sobre a funcionalidade dessas estruturas e nas relações ecológicas da espécie em perspectivas cada vez mais próximas de mudanças climáticas.

O presente trabalho traz uma análise intraespecífica nos NEFs de *C. microphyllum* sob influência da precipitação em dois períodos com um curto intervalo de tempo, em uma área de Caatinga, buscando testar as seguintes hipóteses: (i) Episódios de seca promovem redução da densidade e das dimensões dos NEFs, bem como da diversidade de compostos químicos secretados por eles, favorecendo a economia de custos de energia pela planta; (ii) Episódios de chuva promovem o aumento da diversidade de substâncias de defesa anti-herbivoria devido a maior presença de herbívoros. Para tanto, foram realizadas três análises distintas: (i) descrição morfoanatômica geral, para caracterização da estrutura dos NEFs e suas possíveis modificações; (ii) histoquímica para identificação dos compostos químicos influenciados pelos dois períodos avaliados; (iii) associação da precipitação com os parâmetros morfométricos analisados nos NEFs, através de análises estatísticas. Esse estudo foi desenvolvido no final da estação seca e em meados da estação chuvosa, compreendendo um período total de seis meses, devido ao monitoramento prévio realizado pelo LAVeg (Laboratório de Anatomia Vegetal da UFPE) com a espécie (semicaducifolia), cujas folhas eram produzidas em curtos intervalos de tempo. Ademais, durante o período de observação de aproximadamente um ano, a planta nunca esteve sem folhas, levando a acreditar em uma alta plasticidade de suas estruturas, inclusive dos NEFs. Diante disso, esta pesquisa é parte de uma proposta maior, que visa identificar o período mínimo necessário para que fatores abióticos como a precipitação e a temperatura sejam capazes de gerar modificações/ajustes em sua estrutura morfoanatômica e química.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Geral

Descrever a morfoanatomia e a histoquímica dos nectários extraflorais (NEFs) de *Cenostigma microphyllum* através de um estudo comparativo dessa estrutura em um período seco e outro chuvoso no PARNA Catimbau.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Descrever a estrutura morfoanatômica geral dos NEFs em raques e folíolos de *Cenostigma microphyllum* usando essa análise como ponto de partida para avaliação de possíveis variações nessas estruturas;
- Comparar a estrutura morfoanatômica dos NEFs de raques e folíolos de *Cenostigma microphyllum* nos períodos de seca e de chuva;
- Realizar análises morfométricas e histoquímicas nos NEFs de raques e folíolos buscando entender a distribuição das substâncias químicas de defesa e nutrição em ambos os períodos;
- Analisar possíveis diferenças significativas que corroborem a influência da precipitação sobre os parâmetros avaliados nos NEFs.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CAATINGA

O Bioma Caatinga encontra-se inserido em uma região semiárida, onde o clima e a escassez hídrica ressaltam uma vegetação raquítica e resiliente, que ainda floresce em solos rochosos e pouco profundos. Abrange os estados do nordeste e parte de Minas Gerais, contemplando uma área de 912.529 km² de grande relevância ecossistêmica, pelo fato de ser exclusivo do Brasil (SILVA et al., 2017). Cientificamente, a Caatinga é um dos biomas mais ameaçados, diante da inadequada utilização de seus recursos naturais, corroborada pela baixa expressividade de unidades de conservação de proteção integral e de unidades de conservação de uso sustentável em seu território, com percentuais de 1,13% e 6,32%, respectivamente (FONSECA et al., 2017).

A Caatinga apresenta características específicas dentro da classificação de florestas tropicais secas, devido às particularidades presentes em seu clima, solo e vegetação. Grande parte do bioma, possui clima semiárido, onde a média elevada das temperaturas varia de 25° a 30°C e baixos índices pluviométricos ocorrem no intervalo de 400 a 1200 mm anuais em áreas de planície. Já em regiões de planalto, as temperaturas médias podem se mostrar mais amenas e a precipitação atingir índices de 1800 mm por ano (TABARELLI et al., 2018). Nas áreas mais altas, ao amanhecer, a presença do orvalho é mais abundante, favorecendo a umidade do solo na estação seca e consequentemente, a manutenção da vegetação. As chuvas na Caatinga ocorrem ao longo de três meses consecutivos, mesmo havendo variação anual frequente, na estação seca (NIMER, 1972). Esta, geralmente decorre em períodos de 7 a 11 meses, com sua maior intensidade na região central do bioma (PRADO, 2003).

Dentre os solos que compõem a Caatinga, estão os argilosos e os ricos em minerais (latossolos), presentes em camadas mais profundas e dispendo de boa porosidade e abundância de nutrientes. Já os solos mais arenosos, os quais apresentam-se mais pobres, rasos e ácidos, possibilitam uma maior evaporação da água pelo calor, fazendo com que o processo de salinização intensifique a desertificação, que já acomete o bioma (ALVES et al., 2009).

A Caatinga apresenta uma vegetação bastante diversificada, com espécies endêmicas, além de exemplares providos de mecanismos de adaptação, tais como espinhos e cutículas espessas, que garantem sua sobrevivência no âmbito do

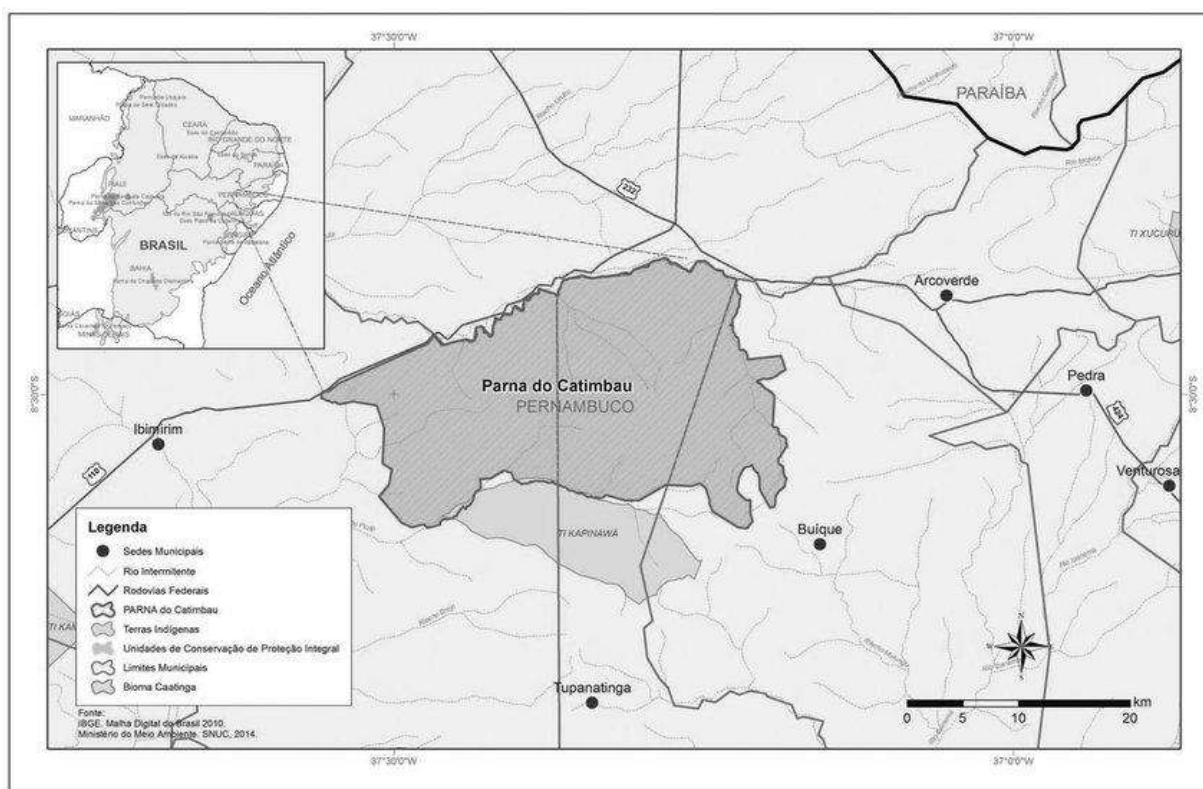
semiárido. A paisagem geralmente é formada por árvores de pequeno porte e arbustos, que na estação seca perdem as folhas (caducifólias) e também por cactáceas, além de poucas espécies que em época de estiagem, permanecem com suas folhas preservadas (perenifólias). A composição do estrato vegetacional é desenhado por espécies arbóreas, que atingem uma altura de 8 a 12 metros, espécies arbustivas com elevação de 2 a 5 metros e espécies herbáceas com menos de 2 metros (ALVES et al., 2009). Durante a maior parte do ano (estação seca), a caatinga fica em estado de dormência, visto que é no curto período de chuvas que as folhas e flores são produzidas (RIZZINI et al., 1988).

Vale ressaltar que devido a interferências antrópicas, a paisagem da Caatinga vem se modificando e estudos revelam uma estimativa de que cerca de 50% da cobertura vegetal já tenha sido suprimida (TABARELLI et al., 2018), além da questão climática apresentar um cenário não muito promissor, diante das previsões que apontam uma elevação de 4,5°C na temperatura do bioma, bem como uma diminuição da precipitação em até 50% até o ano de 2100 (PBMC, 2013). Apesar das previsões, a sua flora é muito variada, com numerosas espécies, algumas raras, outras ameaçadas, denotando a importância deste bioma na paisagem brasileira. Cerca de 3.150 espécies de plantas vasculares foram registradas no bioma (SILVA et al., 2017) e um total de 380 espécies, catalogadas como endêmicas (ALVES et al., 2009). Possivelmente, esses registros ainda sejam maiores, uma vez que a Caatinga não foi investigada em sua totalidade. Diante da grandeza de sua biodiversidade, o bioma dispõe em sua flora, de famílias de importância econômica e ecológica, dentre as quais, estão a Fabaceae, Cactaceae, Bromeliaceae, Caesalpiniaceae, Apocynaceae, Euphorbiaceae, Convolvulaceae, Mimosaceae, entre outras.

Com o intuito de preservar toda a sua biodiversidade e seus recursos ambientais, o bioma Caatinga possui 234 unidades de conservação - UC, sendo 70 Unidades de Proteção Integral e 164 de Uso Sustentável, correspondendo a uma área aproximada de 77.000 km². O estado de Pernambuco atualmente possui 22 unidades de conservação com uma área total de 2.989,76 km² (CNUC, 2023). Dentre essas UCs, está o Parque Nacional do Catimbau, localizado entre o agreste e o sertão pernambucano, nos municípios de Buíque, Ibimirim e Tupanatinga, e que abrange uma área de aproximadamente 623 km² (Figura 1). Foi criado em 13 de dezembro de 2002, sendo classificado como Unidade de Proteção Integral, de

prioridade alta de conservação, devido a sua vulnerabilidade à desertificação (LEUZINGER et al., 2020). O PARNA do Catimbau reúne uma grande diversidade de flora e fauna, além de chapadões, cânions e cavernas, onde é possível encontrar painéis de pinturas rupestres feitas há milhares de anos. Quanto à flora do Parque, no que diz respeito a plantas com sementes, há um registro de 85 famílias distribuídas em 366 gêneros e 613 espécies, sendo que o mais alto percentual de famílias, encontra-se no clado das eudicotiledôneas (78,9%). A família mais representativa e de maior diversidade é a Fabaceae com 109 espécies, seguida por Poaceae, Euphorbiaceae, Asteraceae, Convolvulaceae, Malvaceae, Myrtaceae, Apocynaceae, Malpighiaceae e Cyperaceae, que juntas totalizam quase 60% das espécies do Parque (ATHIÊ-SOUZA et al., 2019).

Figura 1. Mapa de localização do Parque Nacional do Catimbau.



Fonte: Freire et al., 2018.

2.2 FAMÍLIA FABACEAE

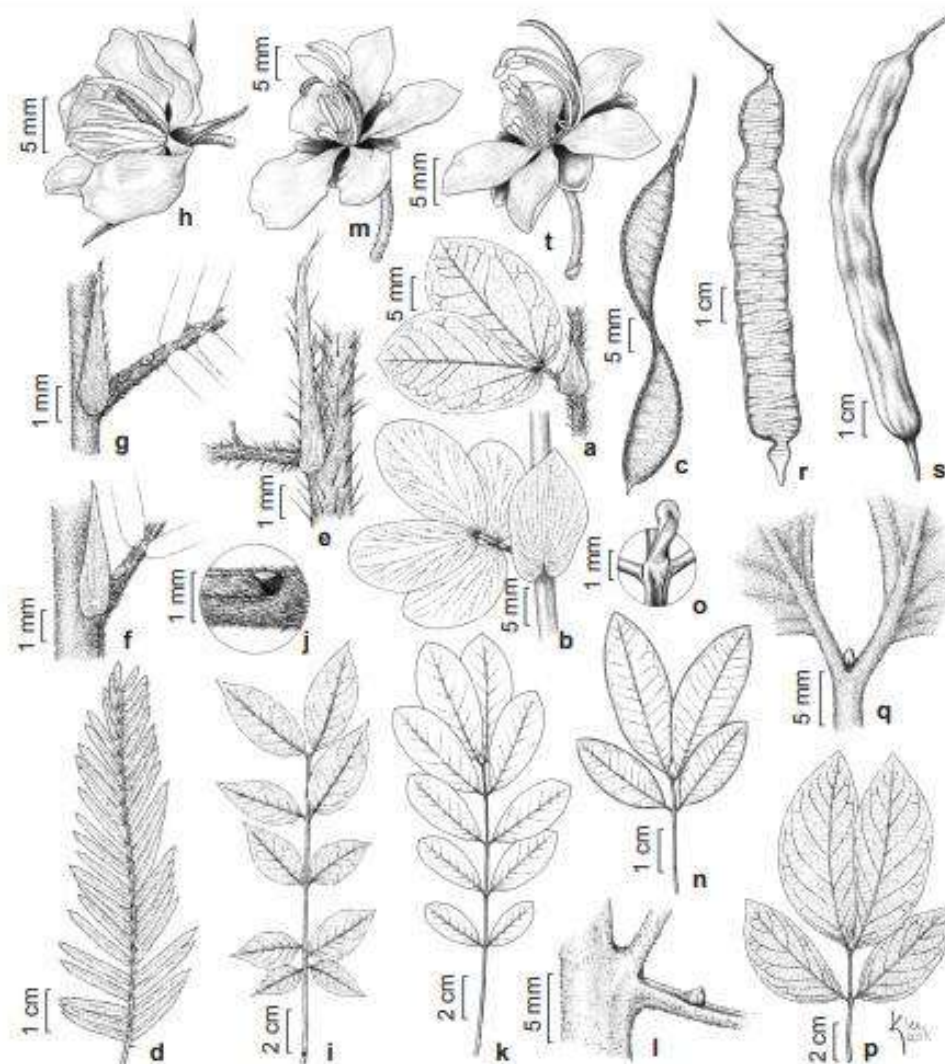
A família Fabaceae, também conhecida como Leguminosae, é considerada cosmopolita com grande diversidade e abundância de exemplares, distribuídos em florestas tropicais úmidas, florestas temperadas até florestas secas e savanas.

Apresenta-se como grandes árvores, pequenas herbáceas, arbustos, trepadeiras, cipós lenhosos e detém o título de terceira maior família de angiospermas, em número de espécies, perdendo apenas para Asteraceae e Orchidaceae. Possui cerca de 23.000 espécies, agrupadas em 800 gêneros, que se distribuem em seis subfamílias: Caesalpinioideae DC., Cercidoideae LPWG., Duparquetioideae LPWG., Detarioideae Burmeist., Dialioideae LPWG. e Papilionoideae DC. (LPWG, 2017). No Brasil, a família é representada por 2.807 espécies, distribuídas em 222 gêneros, sendo 15 endêmicos, presentes em quase todos os biomas (AMORIM et al., 2016). Na Caatinga, a família Fabaceae constitui cerca de um terço da riqueza do bioma, com o registro de 320 espécies agrupadas em 86 gêneros (QUEIROZ, 2009).

A família possui grande importância econômica, sendo utilizada na alimentação humana e como forragem para animais, adubo, como planta ornamental, construção de mobiliário, produção de medicamentos, tintas, pesticidas, entre outros (SOUZA; LORENZI, 2008). A maioria das espécies de Fabaceae também faz associação com bactérias *Rhizobium* do solo, possibilitando a fixação de nitrogênio do ar, agregando assim uma característica de importância ecológica à família no que concerne ao melhoramento do solo que encontra-se desprovido de nutrientes (LPWG, 2017).

As características gerais da família Fabaceae (Figura 2A-T) incluem folhas alternas compostas ou recompostas, estípulas, pecíolo com presença de pulvino em sua base, nectários extraflorais, inflorescência tipo racemo, flores bissexuais, diclamídeas, cálice pentâmero, estames em duplicidade ao número de pétalas ou numerosos, ovário súpero, unicarpelar e fruto do tipo legume. Os principais gêneros com seus respectivos números de espécies são: *Astragalus* (2.000), *Acacia* (1.000), *Indigofera* (700), *Crotalaria* (600), *Mimosa* (500), *Desmodium* (400), *Tephrosia* (400), *Trifolium* (300), *Chamaecrista* (260), *Senna* (250), *Inga* (250), *Bauhinia* (250), *Adesmia* (230), *Dalbergia* (200), *Lupinus* (200), *Rhynchosia* (200), *Pithecellobium* (170), *Dalea* (150), *Lathyrus* (150), *Calliandra* (150), *Aeschynomene* (150), *Vicia* (140), *Albizia* (130), *Swartzia* (130), *Lonchocarpus* (130), *Caesalpinia* (120), *Lotus* (100), *Millettia* (100) e *Erythrina* (100) (JUDD, 2009).

Figura 2. Aspectos gerais da família Fabaceae



Fonte: Escobar et al., 2014.

2.3 O GÊNERO *Cenostigma* Tul. (antigo *Caesalpinia* L.)

A subfamília Caesalpinioideae é a segunda maior em número de espécies e possui um grupo com distribuição pantropical, com cerca de 205 espécies, chamado *Caesalpinia* L. (GAGNON et al., 2016). Este grupo tem um histórico considerável de estudos filogenéticos, visto que frequentemente apresenta conflitos em sua classificação. A reclassificação mais recente do grupo *Caesalpinia*, foi realizada por Gagnon et al. em 2016, onde propuseram a divisão do grupo em 26 gêneros, provocando a exclusão do gênero *Poincianella* Britton & Rose, cujas espécies foram distribuídas entre os gêneros *Erythrostemon* Klotzsch e *Cenostigma* Tul., considerados mais semelhantes morfológicamente (SILVA, 2021).

Cenostigma possui cerca de 20 taxa distribuídos em 14 espécies (GAGNON et al., 2016), com representatividade na região neotropical, que vai desde o México até o centro-oeste do Brasil. Sua ocupação se dá principalmente em Florestas Tropicais Sazonalmente Secas, bem como em áreas de savana e Florestas Tropicais (GAGNON et al., 2016, 2019). No Brasil, o gênero é representado por dez espécies presentes na Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Floresta Amazônica e Pantanal. Três espécies são endêmicas da Caatinga, sendo conhecidas popularmente por “catingueiras” (FLORA DO BRASIL, 2023). As principais características do gênero são: legume lenhoso com uma margem conspícua e grossa, cavidades secretoras internas na lâmina das pínulas e inflorescência e presença de indumento estrelado nos caules, folhas e/ou inflorescência (GAGNON et al., 2016).

Dentre as espécies do gênero *Cenostigma*, pode-se citar a *Cenostigma microphyllum* (Mart ex. G. Don) E. Gagnon & G. P. Lewis, nativa e endêmica da Caatinga, conhecida popularmente como catingueira-de-folha-miúda, sendo encontrada principalmente em regiões de solo arenoso. Espécie arbustiva, podendo atingir cerca de 5 metros de altura (Figura 3A-D), suas folhas são pequenas e bipinadas com presença de nectários extraflorais na parte abaxial, possuindo inflorescências racemosas de cor amarela com manchas avermelhadas, que servem como guia para os polinizadores (NEMA, 2023).

A sua importância econômica se faz presente na utilização de madeiras para construções e também para combustível, além do uso medicinal de cascas e flores para o tratamento de problemas intestinais (QUEIROZ, 2009). Ecologicamente, sua importância consiste na capacidade de se fixar em áreas degradadas da Caatinga, podendo ser utilizada em projetos de recuperação dessas áreas, evitando o processo de desertificação (SFAIR et al., 2018). É também considerada uma espécie enfermeira, contribuindo para que outras plantas possam crescer e sobreviver abaixo de sua copa (PATERNO et al., 2016). Quando as sementes da *C. microphyllum* são inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares (FMA), elas ficam mais tolerantes aos períodos de estiagem (PEREIRA et al., 2019). Outra importância ecológica é a relação mutualista das formigas com a planta (DÁTTILO et al., 2015) através dos seus nectários extraflorais, localizados na parte abaxial das folhas, onde as formigas se alimentam dos açúcares e em contrapartida protegem a planta da ação da herbivoria..

Diante da evidência do aquecimento global, do agravamento da escassez hídrica e da necessidade em preservar o bioma Caatinga, tão castigado pelo clima semiárido e pela influência antrópica, com grande tendência à desertificação, percebe-se quão relevante é essa espécie no processo de restauração ecossistêmica, servindo como objeto de estudo a fim de colaborar com o aumento de informações e pesquisas relacionadas à mesma.

Figura 3. Aspectos gerais de *Cenostigma microphyllum* (Fabaceae). A. Hábito. B. Morfologia foliar. C. Morfologia do fruto. D. Morfologia floral.



Fonte: Andrade, 2023.

2.4 NECTÁRIOS

Segundo Caspary (1848), os nectários podem ser classificados como floral e extrafloral, de acordo com seu posicionamento na planta. Classifica-se como floral, o nectário que estiver localizado em qualquer parte da flor e como extrafloral, o que estiver em alguma estrutura não-floral.

Os nectários florais são estruturas nectaríferas simples que pertencem a um organismo vegetal, podendo ocorrer em todas as partes da flor para secretar o néctar e participar do processo de polinização (BERNADELLO, 2007). Geralmente o néctar se apresenta como uma solução aquosa, sendo utilizado como fonte de

energia pelos animais, por ser um composto rico em açúcares dos tipos sacarose, glicose e frutose (CORBET, 2003). Possivelmente, o volume e composição química do néctar se correlacionam com a necessidade energética do agente polinizador, ocorrendo índices mais elevados em flores polinizadas por animais maiores, enquanto que há uma redução em flores polinizadas por animais menores (CRUDEN et al., 1983).

Nectários extraflorais (NEFs) são estruturas que produzem néctar externamente às flores, com localização em diversas partes de alguns grupos de plantas (ESAU, 1974; CUTTER, 1987), exibindo diferentes cores e formas (Figura 4A-O) (BENTLEY, 1977; MELO et al., 2010). Os NEFs podem ser vascularizados e não-vascularizados e não participam do processo de polinização (KOPTUR, 1992; DÍAS-CASTELAZO et al., 2005). Mais de 110 famílias de angiospermas distribuídas em 876 gêneros e com cerca de 4.017 espécies, possuem nectários extraflorais. Fabaceae possui 920 espécies agrupadas em 122 gêneros, com maior diversidade desses nectários, no entanto, quanto a sua anatomia, os estudos ainda são escassos (WEBER et al., 2015).

É no período chuvoso que as plantas começam a produzir novos tecidos vegetais, além de ramos, folhas e/ou inflorescências (HEIL; MCKEY, 2003). Nesse momento, os tecidos jovens de folhas, encontram-se com uma menor tenacidade e dureza, devido a presença de uma maior quantidade de água e nutrientes (COLEY; BATEMAN; KURSAR, 2006), favorecendo assim, o ataque de herbívoros (MARQUIS et al., 2001). Logo, é esperado que as plantas com NEFs se associem às formigas através do aumento do néctar secretado, cuja atividade secretora e a variação no tamanho e morfologia, possam servir de atrativo para elas em troca de defesa da planta (APPLE; FEENER, 2001; BAKER-MÉIO; MARQUIS, 2012; DÍAZ-CASTELAZO et al., 2005).

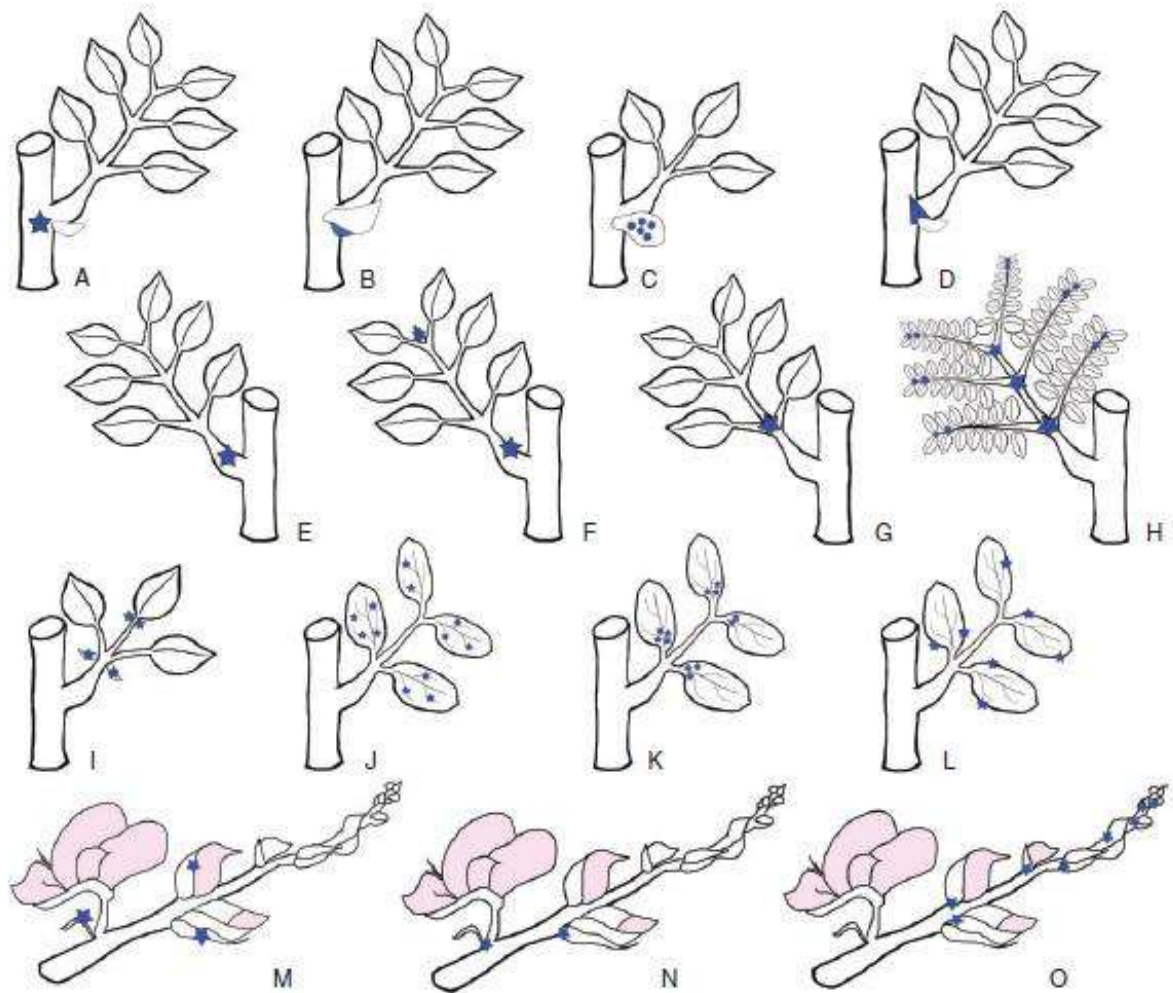
Estudos revelam que diversos artrópodes predadores são atraídos pelo néctar produzido pelos NEFs e a formiga é um deles (KOST, 2005; GUIMARÃES JR, 2006; SAVAGE et al., 2009; VILHENA-POTIGUARA, 2012) , que o utiliza para forrageamento, mas em contrapartida protege a planta da ação de herbívoros (VAL, 2004; BRONSTEIN et al, 2006; INGROUILLE et al., 2006; IZZO et al., 2011). Além das formigas, vespas (CUATLE; RICO GREY, 2003; OLSON et al., 2005) e aranhas (WHITNEY, 2004; NAHAS et al., 2012; PAINTING et al., 2017) também defendem a planta do ataque de herbívoros. Essa proteção consiste em atacar e/ou remover

larvas jovens e ovos do herbívoro (STEPHENSON, 1982; BARTON, 1986; MATHEWS et al., 2011) através do seu hábito territorialista, estimulado pela presença de outro inseto que está próximo ao seu local de forrageamento (BENTLEY, 1977).

O néctar tem em sua composição, substâncias mais comuns, tais como a sacarose, glicose e frutose (FAHN, 1979), que tornam o néctar extrafloral similar ao floral (KOPTUR, 1992). Além dos açúcares mencionados acima, o néctar secretado também dispõe de outras substâncias em sua composição, como lipídios, fenóis, mucilagens, proteínas, aminoácidos, alcalóides, vitaminas, antioxidantes, entre outras, proporcionando assim uma grande oferta de alimentos de valor nutricional, como também de substâncias de defesa aos visitantes de diferentes táxons (BAKER; BAKER, 1983, 1990; FAHN, 2000; NICOLSON; THORNBURG, 2007; ROSHCHINA; ROSHCHINA, 1993; STEFANO et al., 2001).

Dentre os compostos secretados pelos nectários, o amido funciona como fonte de suprimento de nutrientes, especialmente quando a planta atravessa períodos de estresse (CUTLER et al., 2008). Já os compostos fenólicos como o tanino, age como toxinas reduzindo o crescimento e a sobrevivência de diversos herbívoros, sendo liberado pelas plantas quando ela se sente ameaçada. Os alcalóides também possuem elevada toxicidade, provocando drásticas consequências fisiológicas nos herbívoros (OLIVEIRA, 2011). Segundo Machado (1999), as substâncias lipídicas são fontes de energia e/ou reserva, pois possuem grande valor nutricional, podendo atrair ou repelir os visitantes (RODRIGUEZ et al., 1984). Já as mucilagens são de fundamental importância para a secreção do néctar, uma vez que fazem a regulação da economia de água pela planta (ROCHA et al., 2010).

Figura 4. Diversidade de localizações de nectários extraflorais (NEFs) em Fabaceae. Estrelas e pontos azuis indicam locais representativos, incluindo exemplos da variação na posição de NEFs em órgãos individuais que os carregam. A. Raízes e brotos. B. Lobo da estípula. C. Lâmina da estípula (superfície abaxial). D. Entre as estípulas (intraestipular). E. Pecíolo (em posições variáveis da base ao ápice). F. Pecíolo e mucro. G,H. Variavelmente entre pares de folíolos e pinas. G. Apenas entre o primeiro par. H. Entre alguns ou todos os pares (em folhas bipinadas: NEFs em algumas raques das pinas, geralmente NEFs nas pontas das pinas). I. Estípulas. J, K. Lâmina foliar (superfície abaxial). L. Margem foliar. M–O. Inflorescências. M. Pecíolo da bráctea, lado dorsal da bráctea e lado dorsal da sépala. N. Zonas de abscisão de brácteas. O. Zonas de abscisão dos pedicelos (por exemplo, botões abortivos ou flores que caem).



Fonte: Marazzi et al., 2019.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO E COLETA DO MATERIAL VEGETAL

O estudo foi desenvolvido no Parque Nacional do Catimbau em Buíque-PE, que se caracteriza por apresentar clima semiárido e vegetação de Caatinga. O parque é subdividido em 20 parcelas (RITO et al., 2016) com diferentes características fisionômicas e de precipitação estabelecidas pelo Programa de Pesquisa Ecológica de Longa Duração-PELD (<https://www.peldcatimbau.org/>).

Foram realizadas expedições a campo no início de dezembro de 2022 (final da estação seca) e final de fevereiro de 2023 (meados da estação chuvosa), correspondendo aos períodos seco (144,0 mm) e chuvoso (244,4 mm), respectivamente, para coleta de folhas de indivíduos de *Cenostigma microphyllum* (Fabaceae). Os dados de precipitação foram obtidos do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA, 2022, 2023).

Foram coletadas três folhas inteiras e completamente expandidas (a partir do 5° nó), de três indivíduos distintos e adultos em cada um dos períodos (seco e chuvoso), em um n total de 18 amostras que foram destinadas às análises morfoanatômicas e histoquímicas sendo, para tanto, previamente fixadas em FAA 50 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico) por 48 horas e em seguida preservada em etanol 70% (JOHANSEN, 1940).

Material fértil foi coletado como testemunho, sendo depositado no Herbário UFP Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE sob os respectivos números de registro: nº 89.695 e 89.696.

3.2 PREPARO DE LÂMINAS PARA ANÁLISES EM MICROSCÓPIO ÓPTICO

A partir do material fixado e armazenado em etanol 70%, foram realizados cortes transversais à mão com auxílio de giletes em folíolos e raques, os quais foram clarificados com hipoclorito de sódio (água sanitária), lavados em água destilada, submetidos a ácido acético 2% e corados com safranina e azul de Alcian (BUKATSCH, 1972, modificado). Esses cortes foram montados em lâminas semi-permanentes com glicerina 50% (PURVIS et al., 1964).

Esse processo foi utilizado para análise geral dos nectários de raques e folíolos, incluindo avaliação de morfotipo e estrutura bem como fotografias para medições de parâmetros como: comprimento e largura do pescoço dos tricomas glandulares (μm), área da cabeça do tricoma e do ducto (μm^2).

3.3 DISSOCIAÇÃO E CLARIFICAÇÃO EPIDÉRMICA E ANÁLISE EM MICROSCÓPIO ÓPTICO

Nesse processo, amostras de raques e folíolos foram colocados em água sanitária 50% (KRAUS; ARDUIN, 1997) por 36 horas, até a completa clarificação dos referidos órgãos.

Após esse período o material foi lavado em água destilada, para a completa remoção da água sanitária, sendo as amostras coradas com safranina, montadas em lâminas semi-permanentes com glicerina 50% (KRAUS; ARDUIN, 1997).

Esta técnica foi utilizada para análises e medições da densidade dos nectários (nº de células/área) na superfície de folíolos e raques.

3.4 HISTOQUÍMICA E ANÁLISE EM MICROSCÓPIO ÓPTICO

Este processo consistiu na obtenção de cortes à mão (com lâminas de barbear) os quais foram submetidos aos reagentes mencionados na tabela 1.

Tabela 1. Reagentes utilizados para realização dos testes histoquímicos e o respectivo grupo metabólico que são capazes de identificar.

Grupos metabólicos	Reagentes	Reação positiva	Relação planta-animal (Função)	Referência
Lipídios (Intracelulares)	Sudan III	Vermelho alaranjado	Nutrição	Sass (1951)
Carboidrato (Amido)	Lugol	Azul escuro, marrom	Nutrição	Johansen (1940)
Fenóis	Cloreto férrico	Verde intenso, vermelho alaranjado, azul intenso	Proteção	Johansen (1940)
Alcalóides	Reagente de Wagner	Laranja a castanho avermelhado	Proteção	Furr e Malberg (1981)
Fenóis (taninos)	Vanilina clorídrica	Vermelho a castanho	Proteção	Mace e Howell (1974) e Gardner (1975)

Açúcares reduzores (glicose e frutose)	Fenilhidrazina	Cristais amarelos	Nutrição	Patt et al. (1998)
---	----------------	----------------------	----------	-----------------------

Fonte: Andrade, 2023.

Após a aplicação dos reagentes nos três indivíduos coletados nas estações seca e chuvosa, foi utilizada a escala descrita na tabela 2, cuja identificação da presença/ausência e intensidade dos compostos químicos foi transformada em uma matriz numérica, representada posteriormente em gráficos no software Excel. Diagramas esquemáticos da ocorrência das substâncias nas diferentes regiões dos tricomas e ductos foram confeccionados com o auxílio do Canva, para melhor compreensão dos resultados.

Tabela 2. Escala utilizada para construção da matriz numérica e dos gráficos das análises histoquímicas.

Quantidade de grãos ou células corados¹	Presença e ausência	Simbologia (Intensidade)	Conversão numérica (matriz)
Nenhum	Ausente	-	0
1-5	Presente	+	1
6-10	Presente	++	2
Acima de 11	Presente	+++	3

¹Contagem realizada nas lâminas histológicas para os três indivíduos estudados.

Fonte: Andrade, 2023.

3.5 ANÁLISES EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Amostras de folíolos e raques dos indivíduos coletados foram transferidas para placas de petri e colocadas em estufa a 60°C, por aproximadamente, 24h para secagem. Em seguida, as amostras foram montadas em suportes metálicos (*stubs*) cobertos com fita dupla-face e com auxílio de pinças. As análises foram conduzidas em microscópio eletrônico de varredura HITACHI 4000Plus a baixo vácuo. Esse

procedimento foi utilizado para detalhamento dos nectários encontrados nas raques e folíolos.

3.6 ANÁLISE DE LÂMINAS E DOS DADOS

As observações do material e o registro fotográfico foram feitos em microscópio óptico Leica DM750 com câmera acoplada ICCS50 e Zeiss.

Foram utilizadas 10 medidas para cada um dos três indivíduos totalizando um n igual a 30 medidas para cada um dos parâmetros avaliados (i.e. densidade dos nectários, comprimento e largura do pescoço, área da cabeça e do ducto). Os valores de cada característica durante o primeiro e o segundo períodos de coleta foram comparados a partir de testes de médias, teste-t ou Wilcoxon, a depender da normalidade, usando o software PAST v. 3.20 (HAMMER et al., 2001). A normalidade foi verificada a priori a partir do teste de Shapiro Wilk. O valor de $p < 0,05$ foi usado como nível de significância.

4 RESULTADOS

4.1 MORFOANATOMIA, LOCALIZAÇÃO E VISITANTES DOS NEFs FOLIARES

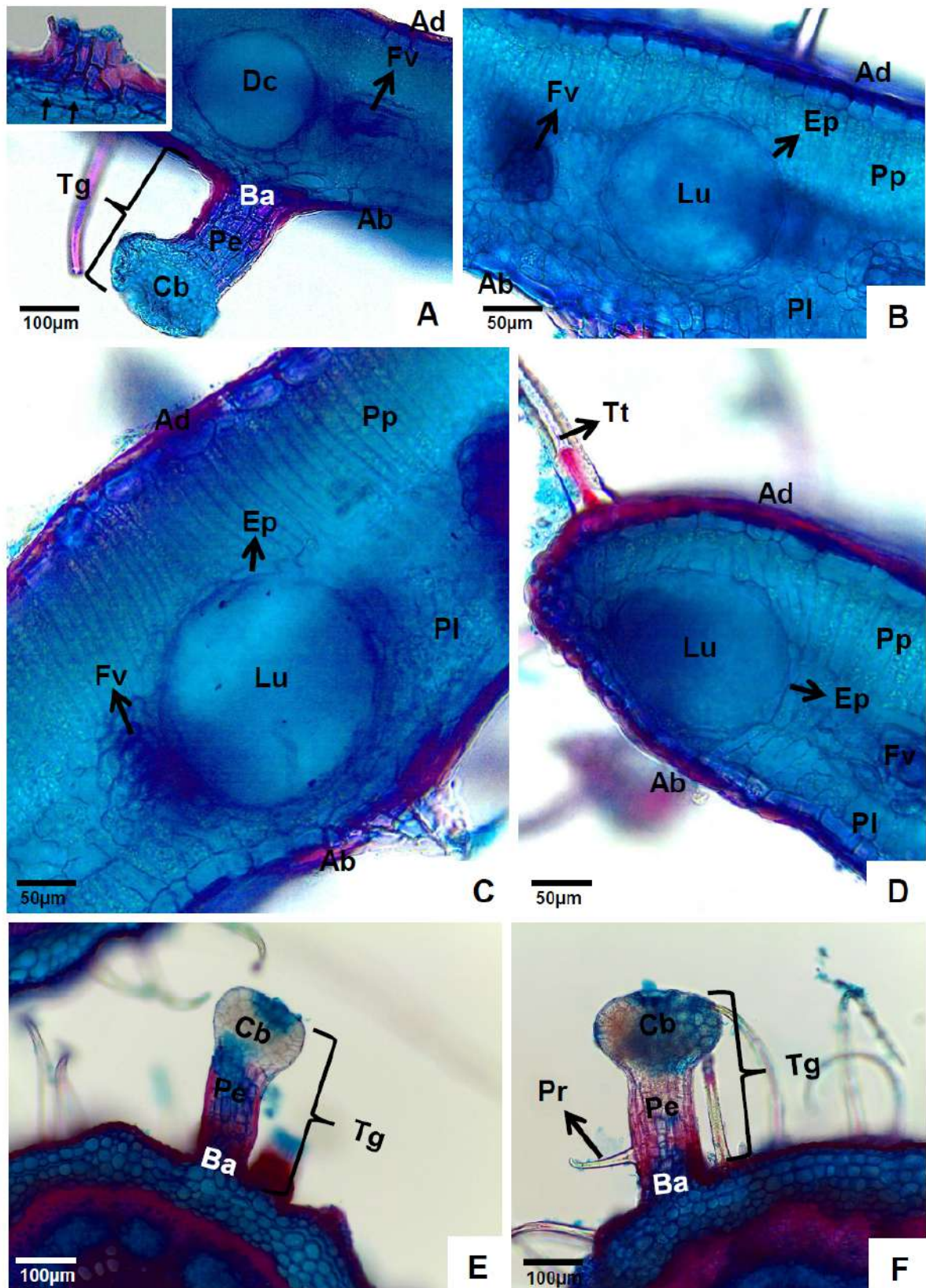
A estrutura anatômica dos nectários extraflorais (NEFs) de *Cenostigma microphyllum* compreende tricomas glandulares capitados que constitui a sua parte externa, além de uma porção interna formada por ductos secretores adjacentes à base desses tricomas, como mostra a figura 5 que representa a descrição morfoanatômica feita a partir dos cortes transversais corados com safranina e azul de Alcian e as figuras 6 da dissociação epidérmica e 7 que são vistas frontais feitas com microscópio eletrônico de varredura - MEV (Figuras 5-7).

Quanto à localização no folíolo, os NEFs foram encontrados na face abaxial, bem como distribuídos ao longo das raques, conforme observados tanto nas lâminas de cortes transversais como nas vistas frontais preparadas a partir de dissociação epidérmica e da microscopia eletrônica de varredura (Figuras 5-7). Em contrapartida, os ductos apresentaram diferentes localizações no folíolo em relação aos parênquimas paliçádico e lacunoso, podendo estar inseridos apenas em um deles ou em ambos, como mostram os cortes transversais (Figura 5B-D).

Os tricomas glandulares de folíolos e raques, apresentaram-se divididos em cabeça, pescoço e base, enquanto que apenas na raque foram observadas projeções celulares filiformes no pescoço, de acordo com os cortes transversais (Figuras 5A, E-F). Células em divisão celular foram visualizadas na base dos tricomas glandulares (Figura 5A). Os ductos, por sua vez, são formados por uma camada de bainha, uma de epitélio e um amplo lúmen, onde ocorre a deposição de compostos químicos (Figura 5A-D). Adjacentes ao ducto, estão 1-2 feixes vasculares colaterais (Figura 5A-D). Vale lembrar que apenas a cabeça do tricoma glandular é a região que disponibiliza a secreção para os visitantes.

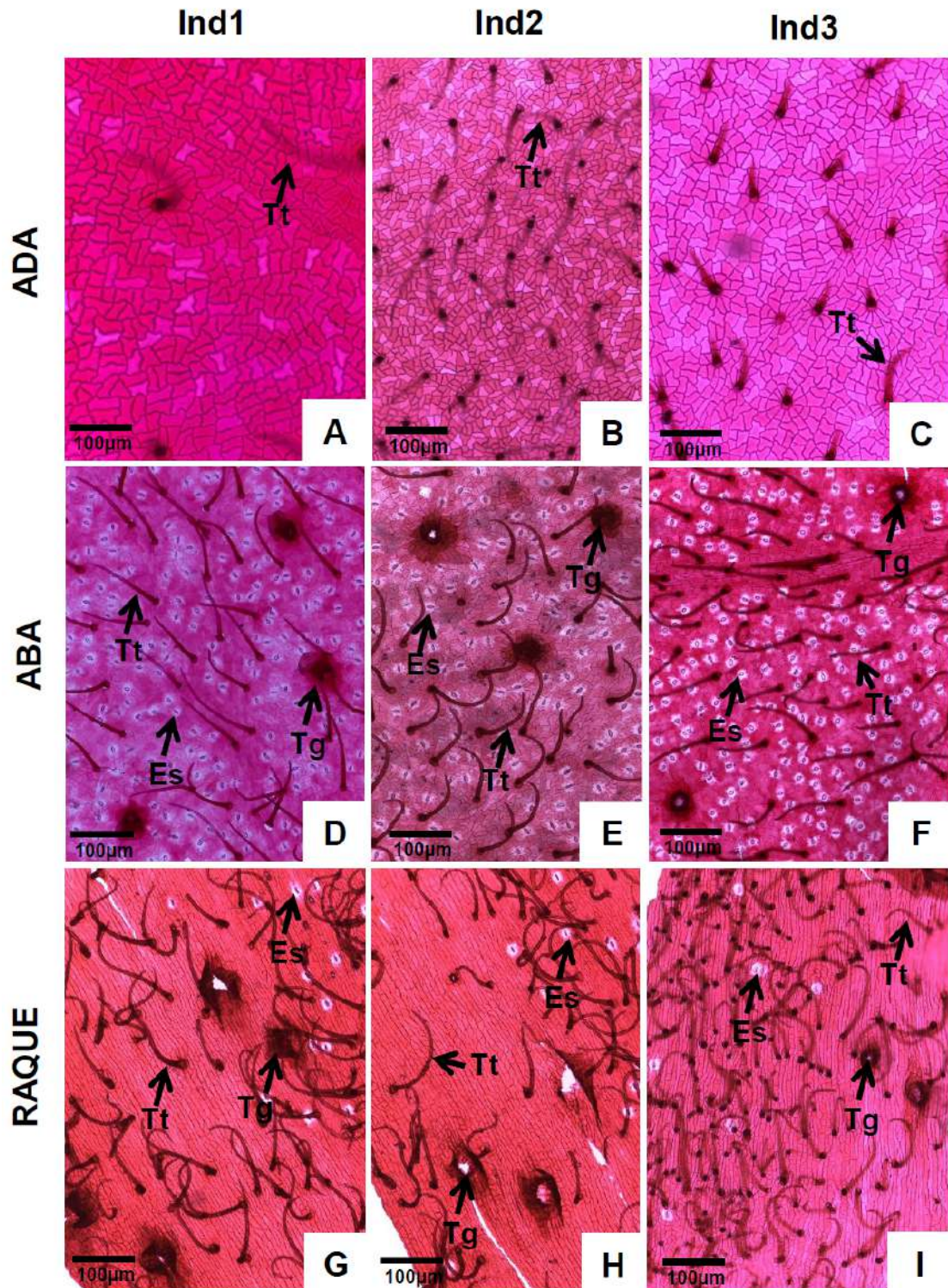
Figura 5. A-D. Cortes transversais da lâmina foliar (folíolos) de *Cenostigma microphyllum*. A. Aspecto geral do nectário destacando o ducto (Dc, parte interna) formado pelo epitélio (Ep) e lume o tricoma glandular (Tg, parte externa) composto pela base (Ba), pescoço (Pc) e cabeça (Cb). Notar feixe vascular (Fv) adjacente ao ducto (Dc). B. Ducto (Dc) ocupando a porção mediana do folíolo e estando imerso nos parênquimas paliçádico (Pp) e lacunoso (Pl). Notar feixe vascular (Fv) adjacente ao ducto (Dc). C. Ducto (Dc) ocupando a porção mediana do folíolo e imerso no parênquima lacunoso (Pl). Notar feixe vascular (Fv) adjacente ao ducto (Dc). D. Ducto (Dc) ocorrendo na borda do folíolo estando imerso em ambos os parênquimas (Pp e Pl). E-F. Cortes transversais da raque de *C. microphyllum*. E. Nectários sob a forma de tricoma glandular (Tg). F. Nectário sob a forma de tricoma

glandular (Tg) apresentando projeção celular filiforme (Pr) partindo da região do pescoço (Pc).
Ab-Face abaxial do folíolo, Ad-Face adaxial do folíolo, Lu-Lume, Tt-Tricoma tector.



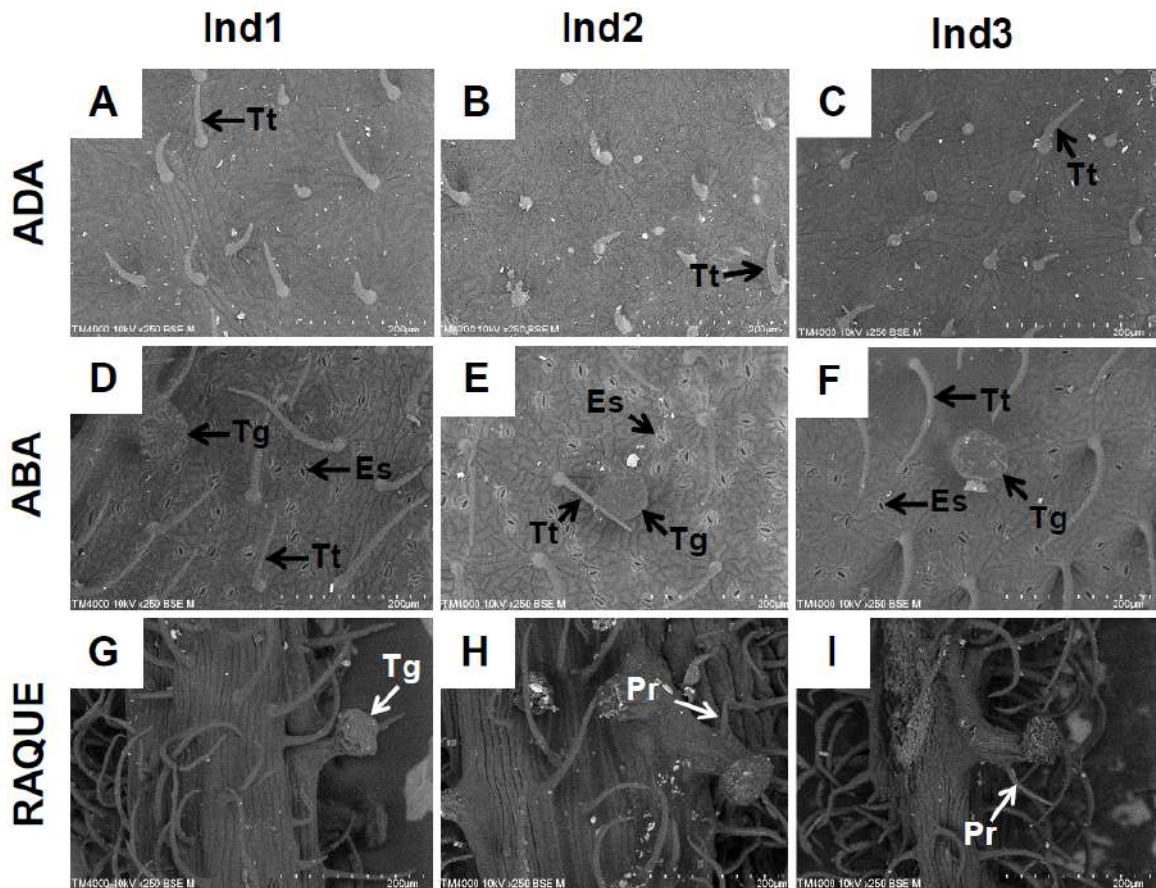
Fonte: Andrade, 2023.

Figura 6. A-F. Dissociação dos folíolos de *Cenostigma microphyllum*. A-C. Superfície adaxial do folíolo dos indivíduos 1 (Ind1), 2 (Ind2) e 3 (Ind3) analisados no estudo. D-F. Superfície abaxial dos folíolos dos indivíduos 1 (Ind1), 2 (Ind2) e 3 (Ind3) analisados no estudo. G-I. Dissociação das raques de *Cenostigma microphyllum*. Aba-Epiderme abaxial, Ada-Epiderme adaxial, Indivíduo 1 (Ind1), Indivíduo 2 (Ind2), Indivíduo 3 (Ind3), Es-Estômato, Tg-Tricoma glandular, Tr-Tricoma tector.



Fonte: Andrade, 2023.

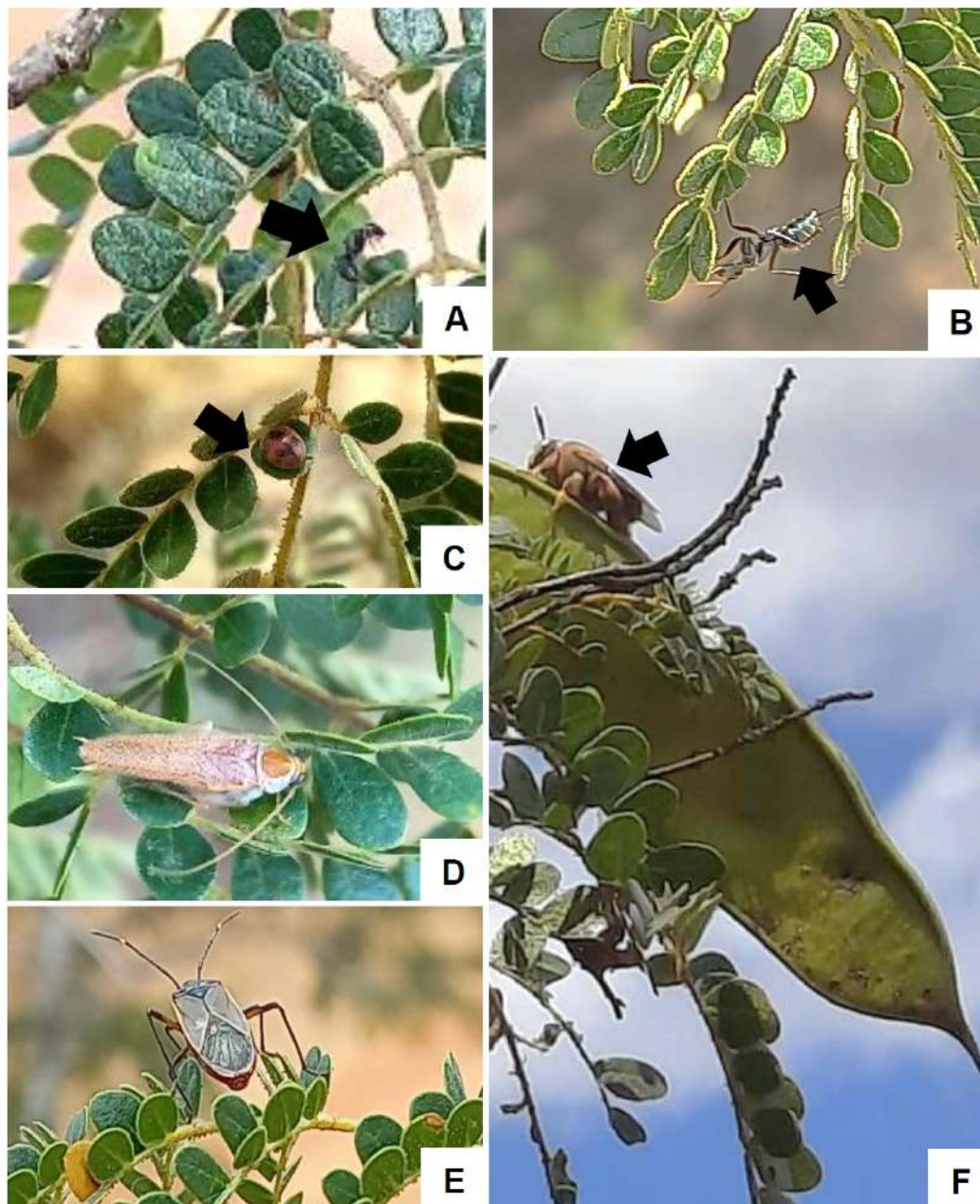
Figura 7. A-I. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos folíolos (A-F) e raque (G-I) de *Cenostigma microphyllum*. A-C. Superfície adaxial do folíolo dos indivíduos 1 (Ind1), 2 (Ind2) e 3 (Ind3) analisados no estudo. D-F. Superfície abaxial dos folíolos dos indivíduos 1 (Ind1), 2 (Ind2) e 3 (Ind3) analisados no estudo. G-H. Superfície das raques dos indivíduos 1 (Ind1), 2 (Ind2) e 3 (Ind3). Aba-Epiderme abaxial, Ada-Epiderme adaxial, Indivíduo 1 (Ind1), Indivíduo 2 (Ind2), Indivíduo 3 (Ind3), Es-Estômato, Pr-Projeções filiformes, Tg- Tricoma glandular, Tt-Tricoma tector.



Fonte: Andrade, 2023.

Observações feitas nos indivíduos estudados durante 24h mostraram a ocorrência de visitantes de alguns grupos de artrópodes (e.g. formigas, baratas, besouros), como mostra a figura 8. Foi percebida uma preferência de algumas formigas pelos folíolos e raques, enquanto que os besouros apresentaram uma maior preferências pelas raques.

Figura 8. A-F. Artrópodos visitantes (setas) observados nos nectários extraflorais (NEFs) de *Cenostigma microphyllum*.



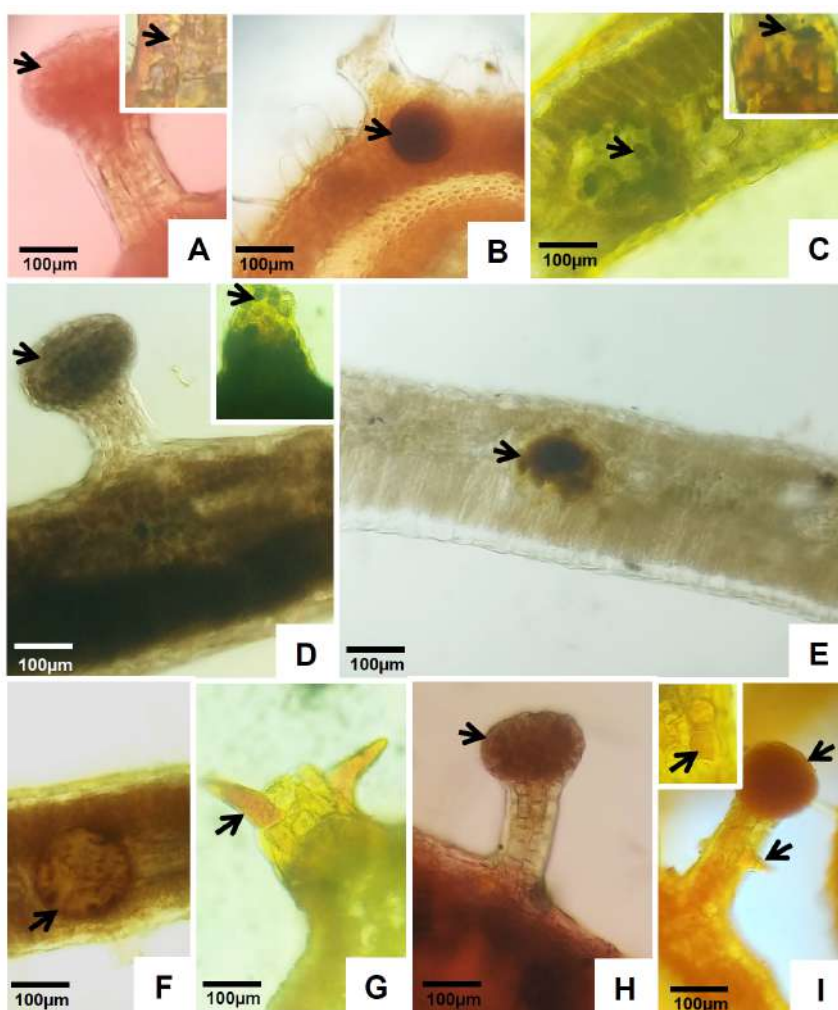
Fonte: Andrade, 2023.

4.2 HISTOQUÍMICA

A histoquímica dos nectários extraflorais (NEFs) de *Cenostigma microphyllum*, foi realizada nos tricomas glandulares de folíolos e raques e apenas nos ductos do folíolo, uma vez que na raque eles não se mostraram frequentes para obtenção de um n mínimo necessário para realizar análises estatísticas.

Com relação a análise histoquímica, foi verificado que tanto tricomas glandulares (das raques e folíolos) como ductos (dos folíolos) dos diferentes indivíduos analisados apresentaram secreções contendo compostos químicos (Figura 9) como: lipídios (nutrição), fenóis totais (defesa) e taninos (defesa), carboidratos (nutrição), alcalóides (defesa) e açúcares redutores - glicose e frutose (nutrição). Vale ressaltar que as regiões avaliadas nessas estruturas foram a cabeça, o pescoço, a base e as projeções filiformes do pescoço nos tricomas glandulares bem como o lúmen dos ductos secretores.

Figura 9. A-I. Testes histoquímicos em raques e folíolos de *Cenostigma microphyllum*. A-B. Lipídios detectados com Sudam III. C. Amido (seta) detectado com Lugol. D-E. Compostos fenólicos (seta) detectados com Cloreto férrico. Notar presença intensa de compostos fenólicos no pescoço e na base dos nectários (tricomas) no canto superior direito. F-G. Detecção de taninos com Vanilina clorídrica. H. Detecção de alcaloides com o Reagente de Wagner. I. Detecção de açúcares com Fenilhidrazina. Setas – Detalhes das reações positivas para os diferentes compostos químicos.



Fonte: Andrade, 2023.

Foram observadas variações na intensidade dos compostos químicos nas diferentes regiões nos períodos avaliados, bem como entre os indivíduos estudados, conforme apresentado nas figuras 10 e 11.

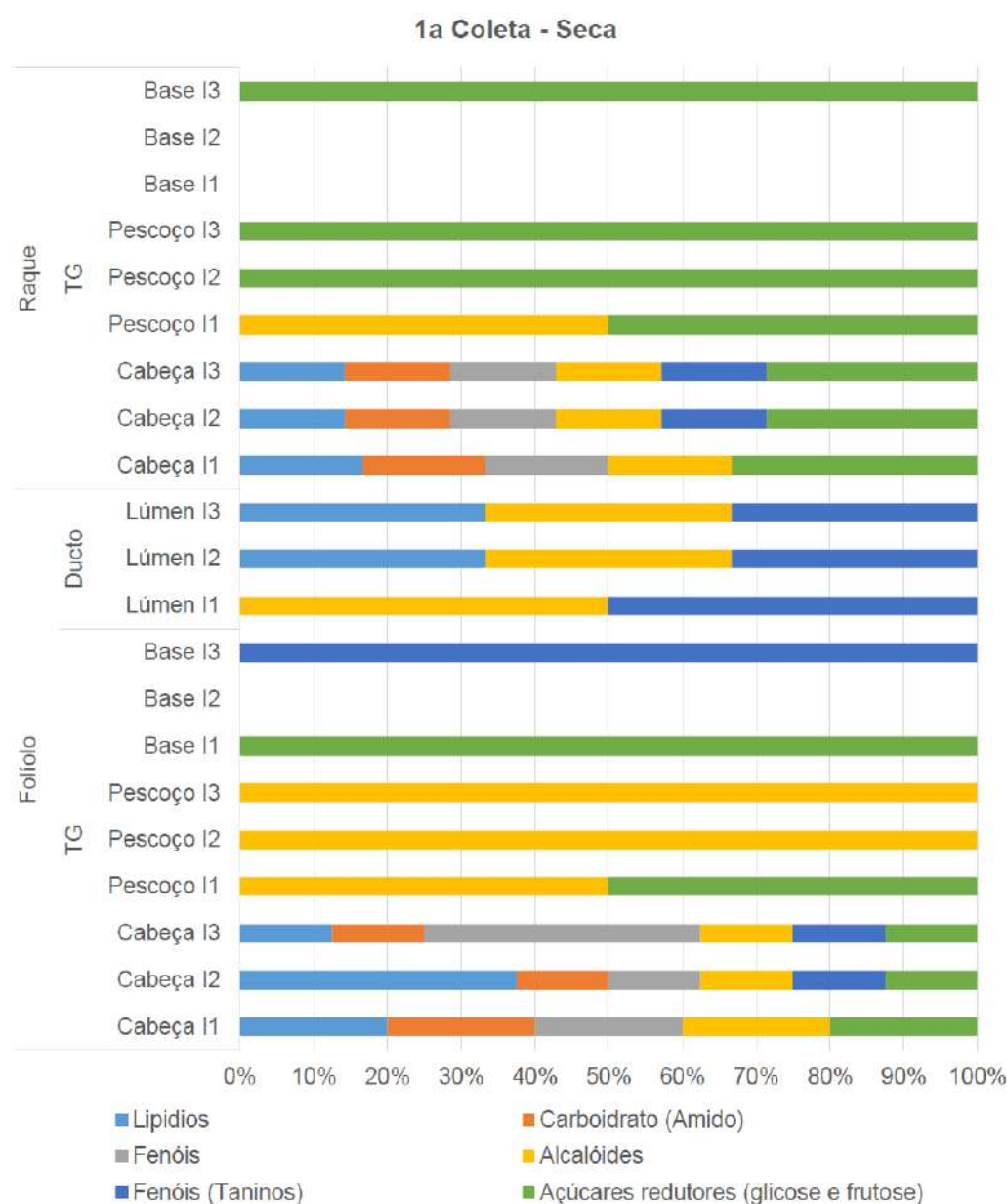
No que se refere à localização dos compostos químicos, foi possível perceber que a cabeça dos tricomas glandulares tanto na raque como no folíolo foi a que apresentou maior diversidade de compostos em ambos os períodos avaliados. No período chuvoso os compostos químicos também foram evidenciados na base, pescoço e ductos (Figuras 10 e 11).

Comparando os três indivíduos avaliados foi possível perceber no folíolo, no **período seco** que o lúmen dos ductos do indivíduo 1 apresentou compostos químicos de defesa como taninos e alcalóides, enquanto que nos indivíduos 2 e 3 além dos referidos compostos houve presença de um dos compostos de nutrição (lipídios). Na base dos tricomas glandulares, foram verificados apenas substância de nutrição (açúcares) no indivíduo 1 e de defesa (taninos) no indivíduo 3, enquanto que no 2 não houve registro das substâncias químicas avaliadas. No pescoço do tricoma do indivíduo 1 ocorrem tanto substâncias de defesa (alcalóides) como de nutrição (açúcares). Já nos indivíduos 2 e 3 foram detectados apenas substâncias de defesa (alcalóides). Na região da cabeça dos três indivíduos, foram encontradas todas as substâncias químicas testadas, exceto tanino no indivíduo 1. Nos tricomas da raque, a região da base apresentou apenas substância de nutrição (açúcares) no indivíduo 3, nos demais não foram encontrados compostos químicos. Já no pescoço do indivíduo 1 ocorreram açúcares e alcalóides e nos indivíduos 2 e 3 apenas açúcares. E por fim a cabeça de todos os indivíduos apresentou as mesmas substâncias observadas na cabeça do tricoma do folíolo, na mesma ordem (Figuras 10 e 12).

Com relação ao **período chuvoso**, os ductos do folíolo dos indivíduos 1 e 2, mostraram todas as substâncias, exceto lipídios no indivíduo 1. Já o indivíduo 3, apenas taninos, alcalóides e açúcares, estavam presentes. Na base dos tricomas do folíolo do indivíduo 1, lipídios e taninos foram os compostos encontrados. Na mesma região no indivíduo 2 e 3 ocorrem carboidratos e açúcares, além de taninos e alcalóides no indivíduo 2 e fenóis no 3. No pescoço, todas as substâncias ocorrem nos indivíduos avaliados, exceto fenóis no 2. Já na região da cabeça, carboidratos acontecem em todos os indivíduos, fenóis e alcalóides nos indivíduos 1 e 2, lipídios no 1 e no 3, enquanto que o tanino foi registrado apenas no indivíduo 2 e açúcares

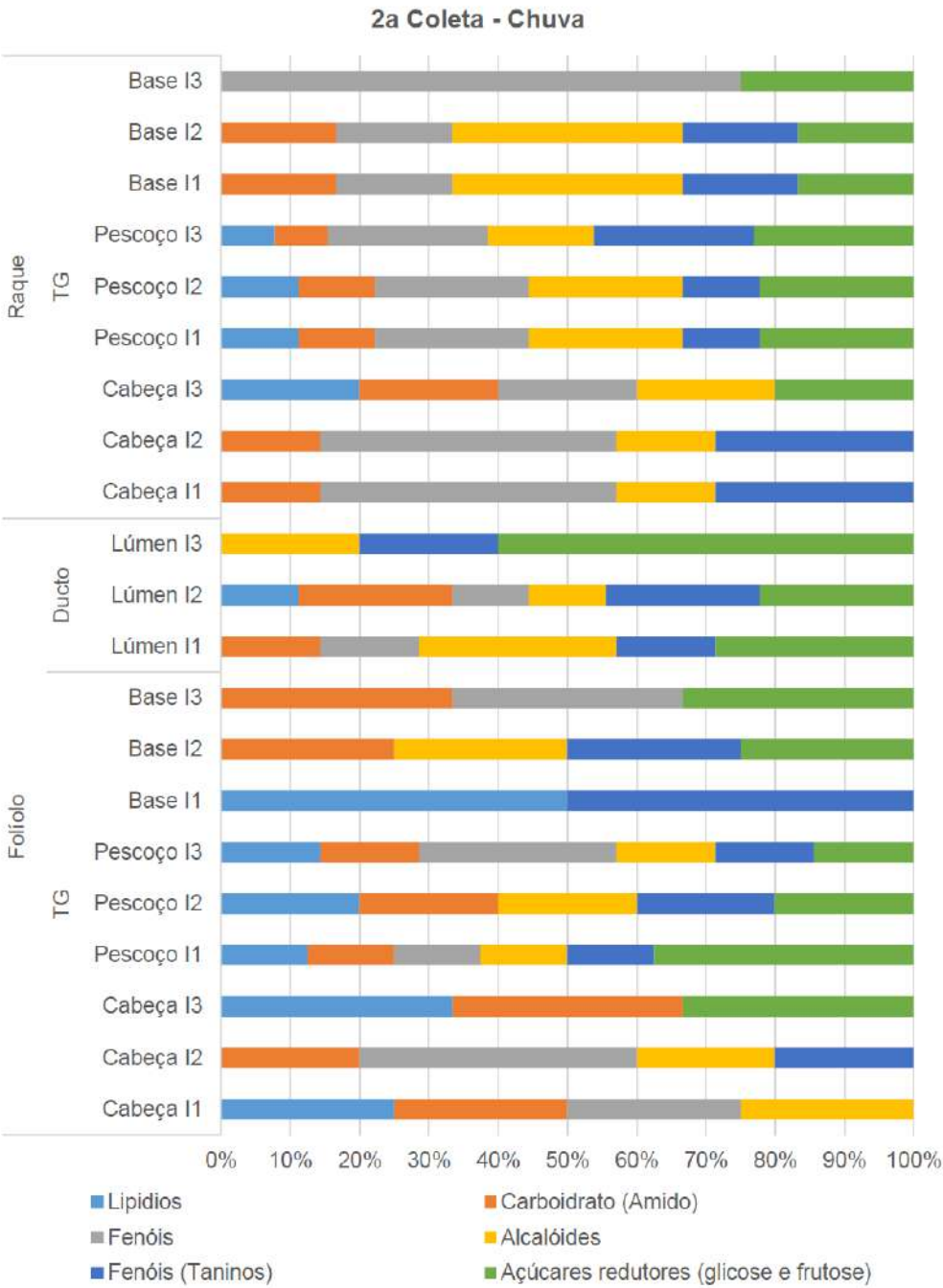
no 3. A base dos tricomas da raque dos indivíduos 1 e 2 apresentou fenóis, carboidratos, alcalóides, açúcares e taninos, sendo este último presente apenas no 2. Já no indivíduo 3 foram registrados apenas fenóis e açúcares. A análise do pescoço, mostrou a presença de todos os compostos em todos os indivíduos. No entanto, a cabeça dos indivíduos 1 e 2 apresentam as mesmas substâncias. Já o indivíduo 3 compartilha a presença de fenóis, carboidratos e alcalóides, acrescido de lipídios e açúcares (Figuras 11 e 13).

Figura 10. Resultado do teste histoquímico realizado nos indivíduos de *Cenostigma microphyllum* no período seco. I1-Indivíduo 1, I2-Indivíduo 2, I3-Indivíduo 3, TG-Tricoma glandular.



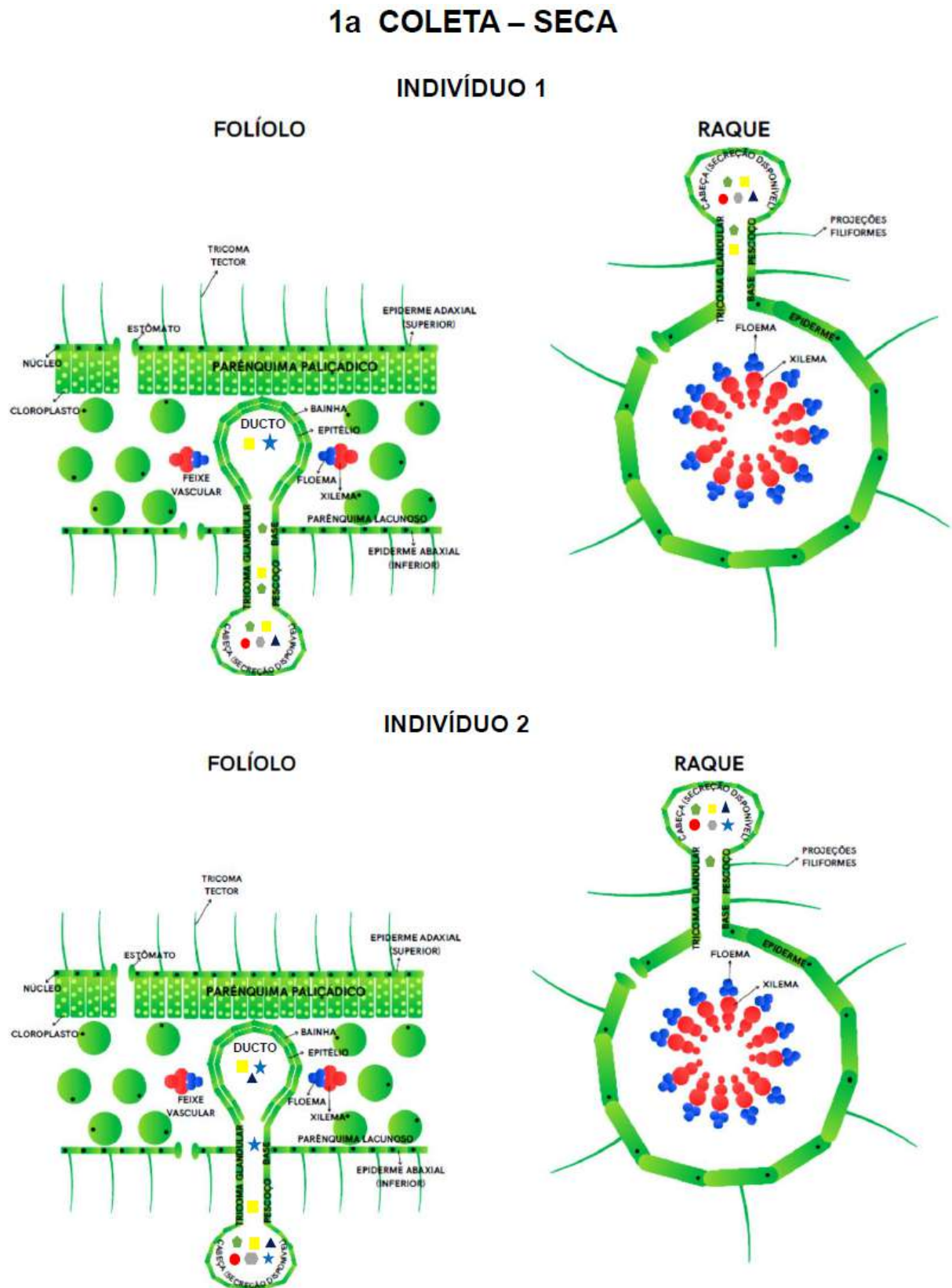
Fonte: Andrade, 2023.

Figura 11. Resultado do teste histoquímico realizado nos indivíduos de *Cenostigma microphyllum* no período chuvoso. I1-Indivíduo 1, I2-Indivíduo 2, I3-Indivíduo 3, TG-Tricoma glandular.

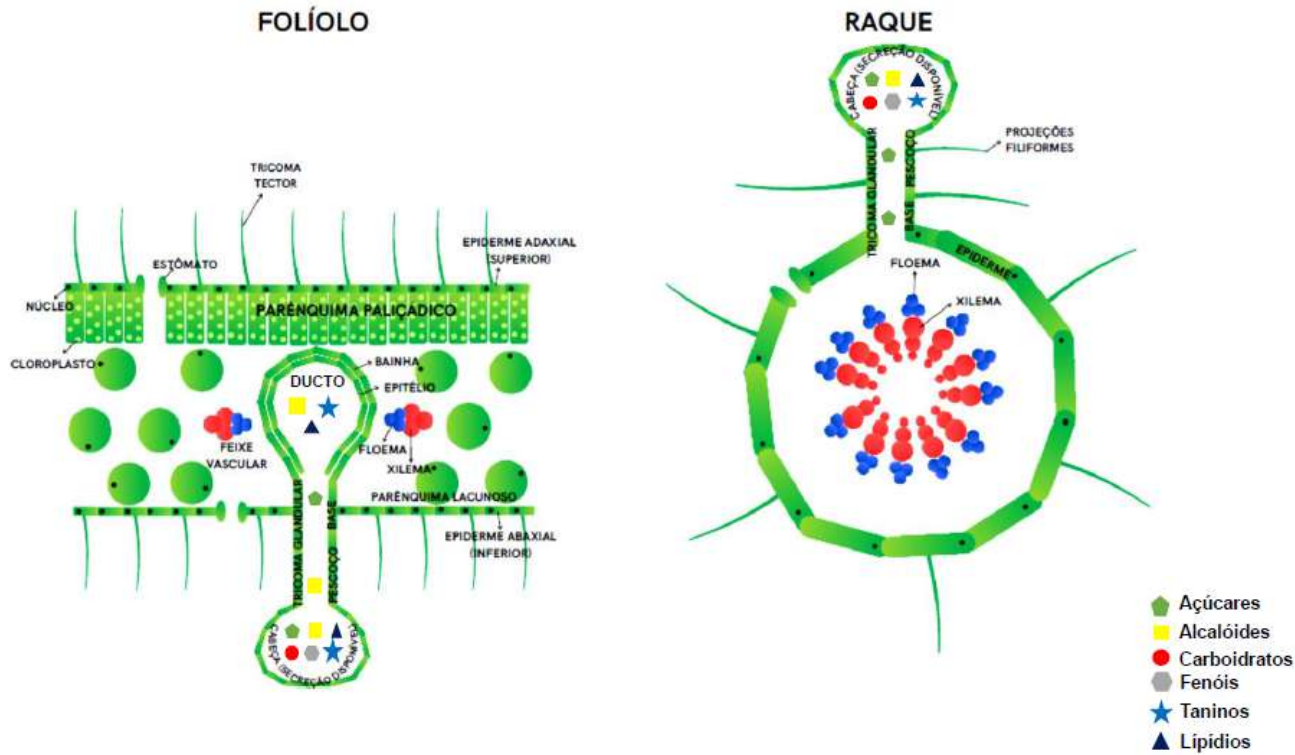


Fonte: Andrade, 2023.

Figura 12. Esquema representativo da ocorrência dos compostos químicos nos tricomas glandulares e ductos da raque e folíolo de *Cenostigma microphyllum* na seca (1a coleta).



INDIVÍDUO 3

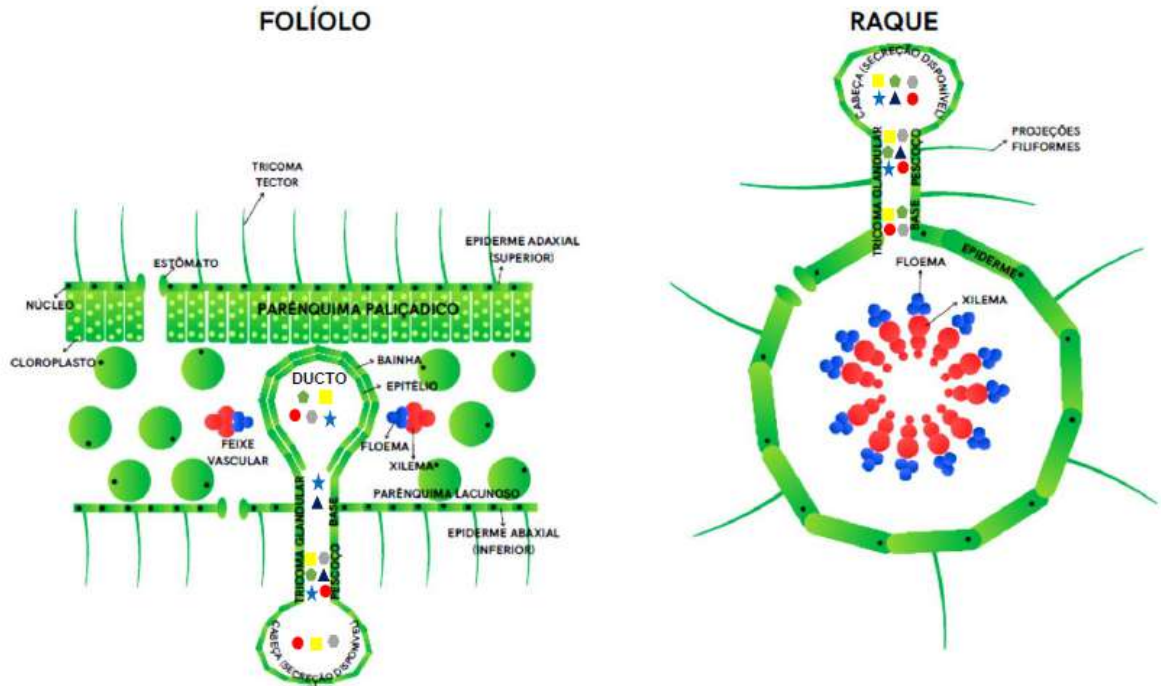


Fonte: Andrade, 2023.

Figura 13. Esquema representativo da ocorrência dos compostos químicos nos tricomas glandulares e ductos da raque e folíolo de *Cenostigma microphyllum* no período chuvoso (2a coleta).

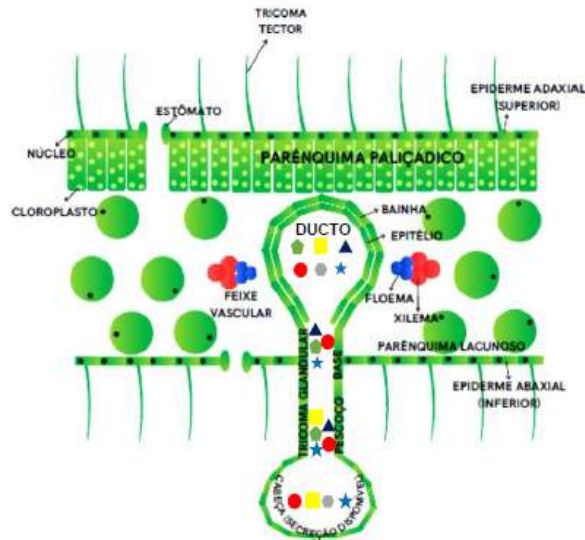
2a COLETA – CHUVA

INDIVÍDUO 1

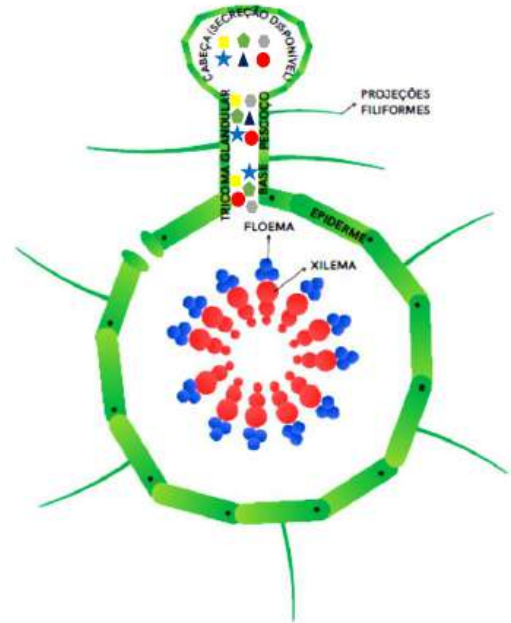


INDIVÍDUO 2

FOLÍOLO

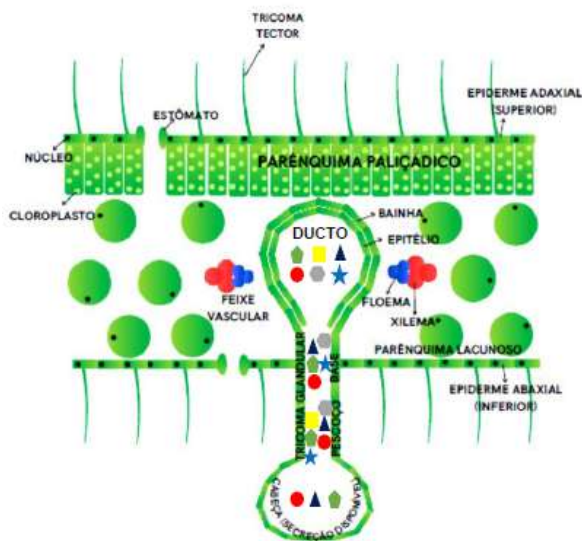


RAQUE

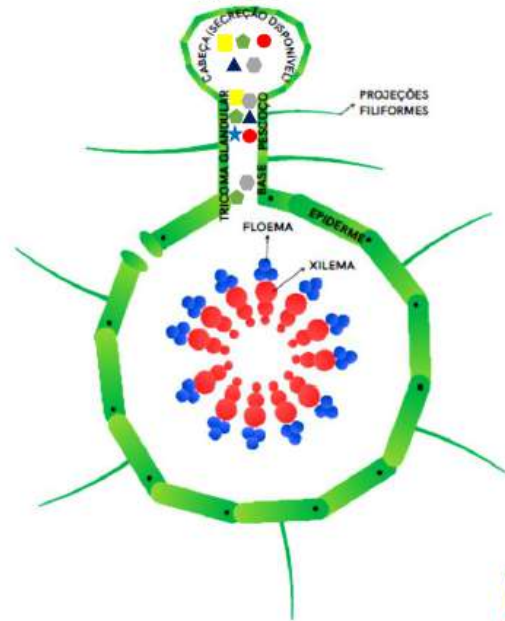


INDIVÍDUO 3

FOLÍOLO



RAQUE

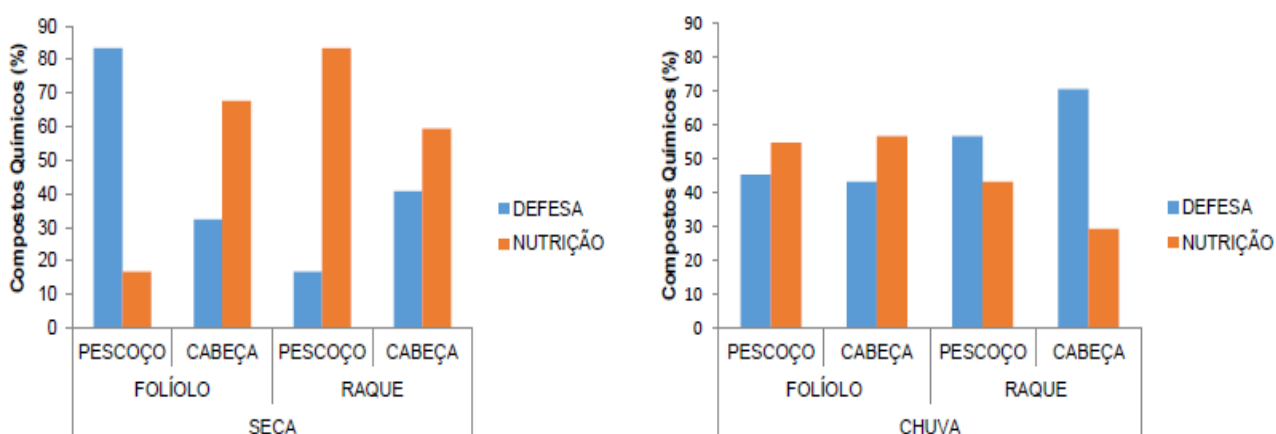


- Açúcares
- Alcalóides
- Carboidratos
- Fenóis
- ★ Taninos
- ▲ Lipídios

Fonte: Andrade, 2023.

Em síntese, no período seco ocorreu uma redução da diversidade de compostos químicos, embora tenha sido observado o aumento de açúcares redutores e alcalóides (Figura 10). Já no período chuvoso, estavam presentes uma maior diversidade de substâncias (Figura 11). Nessa mesma estação, os tricomas de raques e folíolos mostraram estratégias diferentes, onde os da raque investiram em defesa e os do folíolo em nutrição. Além disso, na estação seca os tricomas glandulares tenderam a apresentar substâncias de nutrição nos referidos órgãos (Figura 14).

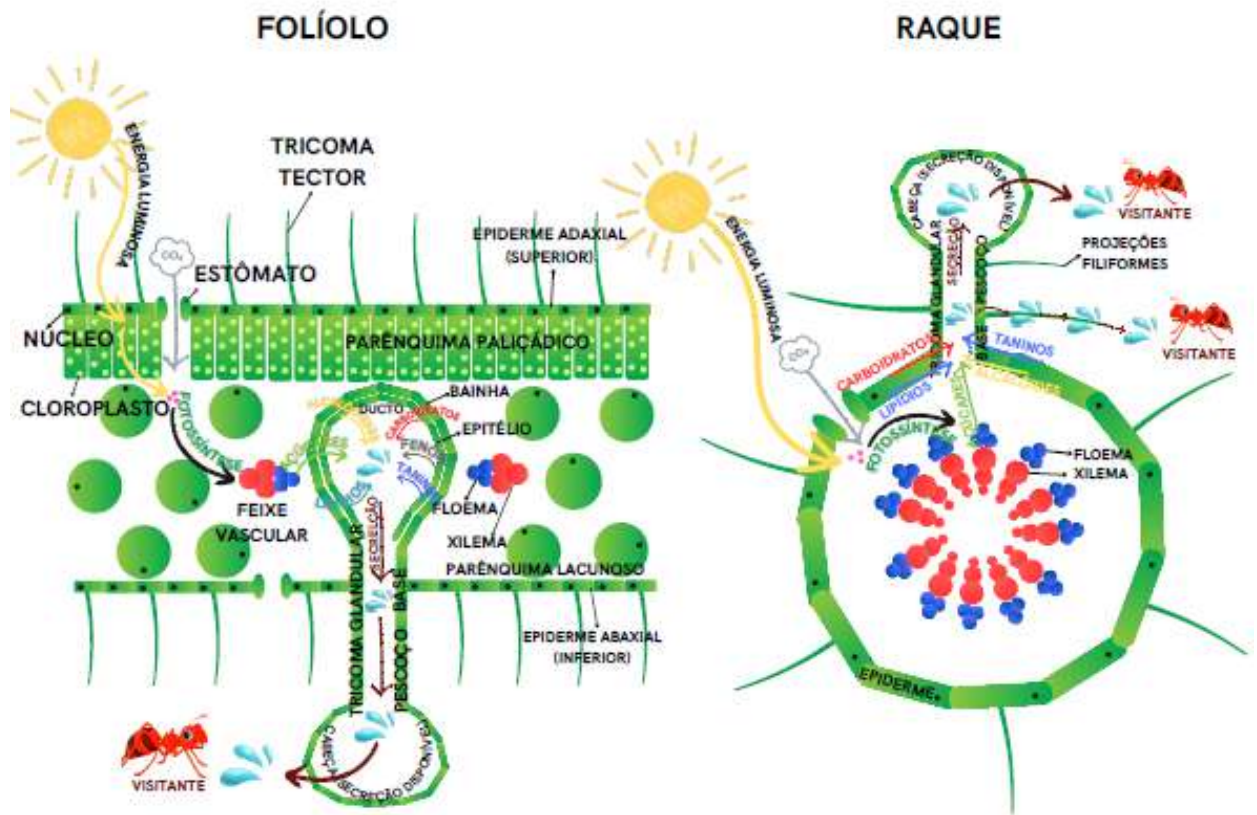
Figura 14. Percentual de compostos de defesa e nutrição presentes nos tricomas glandulares de *Cenostigma microphyllum* nos dois períodos de precipitação avaliados.



Fonte: Andrade, 2023.

Diante da estrutura e do mapeamento dos compostos químicos observados nos tricomas glandulares de raques e folíolos bem como nos ductos dos folíolos, foi possível inferir que o possível fluxo dessas substâncias ocorre conforme mostra a Figura 15.

Figura 15. Fluxo dos compostos químicos no interior dos ductos e tricomas glandulares de raques e folíolos de *Cenostigma microphyllum*.



Fonte: Andrade, 2023.

4.3 ASSOCIAÇÃO DA PRECIPITAÇÃO COM OS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS ANALISADOS NOS NEFs

Dentre os parâmetros avaliados estatisticamente foi possível observar diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas para o comprimento do pescoço do tricoma glandular e a área do ducto nos folíolos, quando realizadas comparações entre indivíduos nos períodos avaliados, respectivamente. Essas estruturas eram maiores no período de seca (APÊNDICES A-C, Tabela 3).

Quando comparadas as raques e os folíolos dos indivíduos entre os respectivos períodos analisados foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todos os parâmetros conforme mostra o APÊNDICES A-C e a tabela 4. Nessa análise, os tricomas glandulares da raque apresentaram maiores medidas tanto na seca como na chuva.

Tabela 3. Resultado das análises estatísticas entre todos os parâmetros avaliados nos dois períodos de precipitação. P1-1a coleta, seca; P2-2a coleta, chuva.

Variáveis	T-Valor ou Z-Valor*	P-Valor	Média-P1	Média-P2
<i>Folículo</i>				
Comprimento do pescoço	2.04*	0.04	64.70	57.48
Largura do pescoço	0.91*	0.37	54.28	50.92
Área da cabeça	1.87	0.07	5723.3	5066.3
Área do ducto	5.15	0.001	6823.9	3914.8
Densidade dos nectários	-1.30	0.20	4.13	4.8
<i>Raque</i>				
Comprimento do pescoço	1.05	0.30	115.19	109.01
Largura do pescoço	-1.04	0.30	69.04	69.62
Área da cabeça	0.22	0.82	8261.3	7590.4

*Teste de Wilcoxon. Valores destacados em negrito = significativos ($p < 0.05$).

Fonte: Andrade, 2023.

Tabela 4. Resultado das análises estatísticas entre os parâmetros dos tricomas glandulares nas raques e folíolos, avaliados nos dois períodos de precipitação. P1-1a coleta, seca; P2-2a coleta, chuva.

Variáveis	T-Valor	P-Valor	Média-Folículo-P1	Média-Raque-P1
Comprimento do pescoço	-8.94	0.001	64.70	115.19
Largura do pescoço	-5.87	0.001	54.28	68.61
Área da cabeça	-6.01	0.001	5723.3	8256.7
	T-Valor	P-Valor	Média-Folículo-P2	Média-Raque-P2
Comprimento do pescoço	-9.47	0.001	57.48	108.01
Largura do pescoço	-6.40	0.001	53.25	72.65
Área da cabeça	-4.52	0.001	5066.3	8096.1

Valores destacados em negrito = significativos ($p < 0.05$).

Fonte: Andrade, 2023.

5 DISCUSSÃO

5.1 MORFOANATOMIA, LOCALIZAÇÃO E VISITANTES DOS NEFs FOLIARES

Nectários extraflorais (NEFs) mediando mutualismo entre formiga-planta são comumente descritas em Fabaceae sendo registrados em diferentes órgãos vegetais como folhas, pecíolos e inflorescência (GONZALES; MARAZZI et al., 2018; MARAZZI et al., 2019). De acordo com as análises realizadas no presente estudo, foi descrito pela primeira vez os nectários extraflorais (NEFs) de *Cenostigma microphyllum* os quais ocorrem nos folíolos e nas raques e apresentam diferenças estruturais que podem estar relacionadas com o tipo de secreção e sua respectiva função: proteção e/ou nutrição de visitantes, uma vez que identificamos diferentes artrópodes forrageando as folhas (raque e folíolo). Foram observados alguns tipos de artrópodes, principalmente as formigas, como descrito em vários outros estudos com nectários extraflorais na família Fabaceae, dada a forte relação ecológica (mutualismo) formiga-planta estabelecida evolutivamente entre esses dois grupos de organismos (ZIMMERMAN, 1932; ELIAS, 1983; GONZALES; MARAZZI, 2018).

Os tricomas dos folíolos se assemelharam, em parte, aos descritos por Melo et al. (2010) para *Caesalpinia bracteosa*. No citado estudo, os autores avaliaram 35 espécies de Fabaceae da Caatinga, cujos NEFs de *C. bracteosa* encontram-se representados por um tricoma glandular associado com uma cavidade secretora. No nosso estudo, os tricomas glandulares dos folíolos estavam associados a ductos secretores, os quais eram constituídos por uma bainha externa, um epitélio interno secretor, além de um amplo lúmen onde os compostos químicos ficam armazenados.

Tricomas nectaríferos podem ocorrer em diferentes espécies de diversos ecossistemas e são descritos como *substitutivos*, ou seja, se desenvolveram evolutivamente por transformação de um órgão ou a partir de meristemas vegetativos ou reprodutivos, em substituição a outras estruturas para secretar substâncias, principalmente, o néctar (VOGEL, 1997, BORGES et al., 2017). A presença dessas estruturas contribuem com um importante papel ecológico nas redes de interação planta-animal, comumente relatadas na família Fabaceae (WEBER et al., 2015). Além disso, a presença de NEFs contendo ou formado exclusivamente por tricomas glandulares, ajudam na liberação de muitas substâncias da parte interna à externa, sejam elas de defesa para herbívoros,

nutrição para visitantes ou mesmo aquelas que podem causar auto intoxicação e outras que podem ajudar na proteção contra fitopatógenos (SIMPLÍCIO et al., 2022).

A presença de cavidades associadas ao tricoma glandular foi relatada em outras espécies de Fabaceae (MELO et al., 2010), no entanto, a relação funcional existente entre essas duas estruturas ainda não foi elucidada. Além disso, a vascularização por xilema e floema (feixes vasculares) em NEFs parece indispensável para a produção de açúcares cuja principal fonte é o floema bem como para a manutenção das taxas de secreção (FAHN, 2000; RUDGERS, 2004). No presente trabalho, evidenciamos presença expressiva de compostos químicos depositados no lúmen dos ductos, que, aliados a feixes vasculares colaterais (contendo floema e xilema) adjacentes a estes, permitiram inferir o possível fluxo de substâncias químicas entre ductos e tricomas glandulares, bem como entre os tricomas e sua disponibilização para o meio. Essa característica pode indicar o funcionamento conjunto dessas duas estruturas nesses nectários complexos e seu papel ecológico nas relações inseto-plantas. No entanto, outros estudos são necessários para elucidação da maneira como essas secreções são liberadas para a superfície.

Na raque, por sua vez, os tricomas apresentaram uma estrutura um pouco mais complexa, em que esses são constituídos por uma cabeça, uma base e um longo pescoço de onde partem inúmeras projeções filiformes. Essas projeções, apresentaram compostos químicos no interior de suas células sugerindo uma importante atuação no mecanismo de secreção de exsudatos para nutrição de visitantes e mecanismos anti-herbivoria. Os tricomas da raque também apareciam, algumas vezes, associados a ductos secretores, embora em menor frequência. Esses tricomas se assemelharam a outros descritos, por exemplo, em *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae), cuja autora (JORGE, 2012) o descreve como tricoma misto por combinar características de tricoma glandular com tector, aliando possíveis funções nutritivas e protetivas, conforme observado também em nosso estudo. Marazzi et al. (2019), avaliando aspectos filogenéticos, morfológicos e evolutivos de nectários extraflorais de espécies de Leguminosae, verificou a presença de estruturas semelhantes às aquelas aqui descritas em inflorescência de *Bauhinia*, às quais ele denomina de NEFs tricomáticos ou tricomas glandulares com tricomas agregados que forma uma unidade secretora, muitas vezes vista a olho nu os quais

são muito comuns em representantes de Caesalpinioideae, subfamília a que pertence a espécie *C. microphyllum* aqui estudada.

5.2 HISTOQUÍMICA

Dentre as principais substâncias químicas encontradas no néctar estão carboidratos, como sacarose e frutose, além de aminoácidos, lipídios, fenóis, alcalóides e compostos orgânicos voláteis (BAKER; BAKER, 1983,1990; FAHN, 2000; NICOLSON; THORNBURG, 2007; ROSHCHINA; ROSHCHINA, 1993; STEFANO et al., 2001), que prestam diversos papéis nas interações planta-inseto como nutrição dos visitantes e serviços anti-herbivoria, mecanismos de distração dos órgãos reprodutivos como a flor para garantir a polinização e fecundação. Na nossa pesquisa, as análises histoquímicas mostraram que a secreção produzida pelos NEFs de *C. microphyllum* é constituída, essencialmente, por compostos químicos de defesa (mecanismos anti-herbivoria) como alcalóides, fenóis e taninos, além de outras relacionadas à nutrição como amido, açúcares e lipídios (consideramos aqui os lipídios produzidos e armazenados dentro da célula).

Metabólitos secundários são compostos químicos essenciais para a sobrevivência das plantas no ambiente podendo atuar na defesa de herbívoros como alcalóides, terpenos compostos fenólicos e flavonoides, ao passo que substâncias como amido, lipídios (intracelular) e açúcares, são substâncias relacionadas ao mecanismo de alimentação e/ou nutrição de visitantes (HOWE; JANDER, 2008). Dentre os compostos de defesa, os compostos fenólicos totais assim como os taninos são os mais comumente relatados em estudos que envolvem defesas e NEFs, dada a sua ampla distribuição e diversidade de respostas principalmente, por sua facilidade de extração e análises diversas (ARAÚJO et al., 2015). Eles são ainda relacionados com repostas à limitação de recursos hídricos e, consequentemente, com a sobrevivência ao ambiente, sendo registrado aumento de seus teores em períodos de déficit (SCHIMIDT et al., 2005). No nosso estudo, a precipitação interferiu negativamente na produção de compostos químicos em *C. microphyllum*, uma vez que foi notada uma redução na diversidade de substâncias na seca, porém houve aumento da frequência e predomínio de açúcares redutores e alcalóides, os quais, certamente, estão envolvidos com a manutenção das redes ecológicas da espécie mesmo no período de seca.

De maneira geral, a maior diversidade de compostos químicos foi encontrada na cabeça dos tricomas glandulares de raques e folíolos em ambos os períodos avaliados. Esses dados sugerem que essa região é a principal envolvida com o fluxo de substâncias químicas nos NEFs de *C. microphyllum*, bem como com os mecanismos de liberação de secreções para o exterior da planta e disponibilização para os diversos visitantes. Estudos envolvendo análises histoquímicas de diferentes partes dos tricomas glandulares relacionadas à precipitação são escassos. De acordo com alguns autores, as secreções costumam sofrer redução em seu volume, embora os teores de algumas substâncias possam ser variáveis com a precipitação, sendo maiores para taninos, fenóis totais e alcalóides, e menores para açúcares, em períodos mais secos, podendo afetar as interações planta-animal da espécie, sendo interpretada como uma estratégia de economia de custos (GHARIBI, 2015; ALBERGARIA, 2020; CÂMARA et al., 2021). Muitas variáveis podem estar envolvidas nas variações morfoquímicas dos nectários, de modo que, estudos envolvendo respostas à herbivoria, temperatura e ontogenia de folhas de *C. microphyllum*, podem auxiliar na elucidação de questões relacionadas à química, volume e concentração do néctar na espécie.

5.3 ASSOCIAÇÃO DA PRECIPITAÇÃO COM OS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS ANALISADOS NOS NEFs

Diferenças nos morfotipos, tamanho e localização dos nectários extraflorais (NEFs) no corpo da planta, são comumente relatadas (MELO et al., 2010; MARAZZI et al., 2019). Essas variações têm importantes implicações nas interações planta-animal, uma vez que podem afetar a produção do néctar e nos mecanismos anti-herbivoria.

As variações estruturais em quaisquer características das plantas, incluindo NEFs, podem conferir uma adaptação ou uma plasticidade, em que um genótipo tem a capacidade de produzir diferentes fenótipos em respostas a fatores ambientais, como água (precipitação), luminosidade e temperatura (VALLADARES et al., 2006). Embora escassos, estudos que tratam da influência de fatores abióticos como precipitação sobre a estrutura dos nectários extraflorais em algumas espécies de plantas de Caatinga, demonstraram que os NEFs, em geral, apresentam redução em seu tamanho e quantidade em períodos de seca severa (déficit hídrico) ou mesmo sob redução da precipitação (MARQUIS et al., 2001). No entanto, Delgado

(2011), em um estudo com defesas anti-herbivoria em espécies do Cerrado, submetidas a fatores como queimadas, temperatura e sazonalidade pluviométrica, verificou que os nectários extraflorais investem mais em crescimento do que em defesa no período seco, corroborando parcialmente com nosso estudo cujos parâmetros como comprimento do pescoço do tricoma glandular (porção alongada relacionada ao transporte de compostos químicos) e área do ducto (local de produção e armazenamento de compostos químicos) associado a este nos folíolos apresentaram aumento no período de seca. Esses resultados podem explicar ainda o aumento do armazenamento de substâncias de nutrição e defesa detectadas nessas regiões, que podem contribuir para garantir a manutenção da interação planta-animal ativa durante o período de estiagem (DELGADO, 2011). Além disso, as substâncias de defesa encontradas no pescoço dos tricomas dos folíolos, podem sugerir a proteção de uma maior incidência solar que ocorre nesse período. Associado a isto, cita-se a fenologia da espécie estudada (semicaducifolia) cuja permanência das folhas ocorre quase todo o tempo, fazendo com que a planta necessite investir na produção de compostos de proteção contra herbívoros e outros para a nutrição conferindo atração dos visitantes que a protegem, mesmo no período de seca.

A comparação dos parâmetros dos tricomas glandulares de raques e folíolos entre os períodos analisados, mostrou que os tricomas das raques são muito maiores que os do folíolo, independente da precipitação. A ocorrência de NEFs em diferentes órgãos da planta é relatado em outros estudos, apresentando diversidade de morfotipos e ocorrência diversificada (ELIAS, 1983; MELO et al., 2010; MARAZZI et al., 2019). No entanto, não há relato sobre estudos comparando essas estruturas nos diferentes órgãos em resposta à precipitação. Assim, para *C. microphyllum*, a ocorrência dos tipos de tricomas glandulares aqui relatados para raque e folíolos, pode indicar diferença na funcionalidade desses tricomas, podendo os da raque estarem associados à defesa e os dos folíolos à nutrição, conforme corroborado pela análise histoquímica. Pois, os tricomas do folíolo, apresentam um menor comprimento, o que facilitaria o forrageio por insetos visitantes como observado em campo. Ao contrário, nos tricomas da raque (especialmente os sem projeções filiformes), cuja extensão do pescoço é bem maior, esse comprimento pode dificultar a translocação de substância da base da estrutura até a sua cabeça, dada a ação da gravidade, além de não terem sido encontradas perfurações na base ou no pescoço

desses tricomas, que caracterizassem extração de secreções por essas regiões, sugerindo que a cabeça é o único local de disponibilização do recurso para os visitantes. Quanto aos tricomas com projeções filiformes vistos apenas na raque, os quais são descritos na literatura especializada como unidades secretoras ou mesmo NEFs tricomáticos (JORGE, 2012; MARAZZI et al., 2019), a análise histoquímica e a localização dos compostos, permitiu inferir que as secreções podem ser disponibilizadas pela cabeça da estrutura, bem como pelas projeções filiformes, que seriam facilitadoras no processo. No entanto, um estudo comparativo entre essas duas estruturas é indispensável para uma melhor compreensão desses mecanismos de secreção e estabelecimento de seu papel nessa importante interação ecológica de *C. microphyllum*.

6 CONCLUSÕES

Esse estudo traz relevantes e inéditas contribuições acerca da diversidade morfológica e da influência de curtos períodos de variações de precipitação sobre os traços funcionais (parâmetros) de NEFs de *C. microphyllum* levantando possibilidades para a compreensão de sua funcionalidade bem como dos impactos para as interações planta-animal da espécie e de sua sobrevivência.

Além disso, os resultados aqui obtidos mostram ainda que as hipóteses levantadas foram parcialmente corroboradas, uma vez que foi verificada influência da precipitação em alguns parâmetros morfométricos bem como na histoquímica dos NEFs, sendo esta última fortemente influenciada pelas curtas variações de precipitação com maior investimento de compostos de defesa no período chuvoso em tricomas glandulares da raque.

Logo, esses dados revelam a sensibilidade dos NEFs de *C. microphyllum*, diante de pequenas variações de precipitação, mostrando que em cenários de mudanças climáticas, cada vez mais atuais, alterações nessas estruturas podem afetar a rede ecológica na qual a espécie está envolvida. Assim, esse estudo serve de modelo para novas pesquisas envolvendo NEFs bem como interações planta-animal na espécie.

REFERÊNCIAS

- ALBERGARIA, E. T. **O efeito da pluviosidade na caatinga sobre teores de fenóis e taninos totais em *Cenostigma microphyllum* (Mart ex G.Don) E. Gagnon & G.P. Lewis (Fabaceae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE, 41 p. 2020.
- ALVES, A.; JACKSON, J.; ARAUJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. Degradação da Caatinga: Uma investigação ecogeográfica. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 3, pp. 126-135. Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Brasil, 2009.
- AMORIM, L. D. M.; SOUSA, L. O. F.; OLIVEIRA, F. F. M.; CAMACHO, R. G. V.; MELO, J. I. M. **Fabaceae na Floresta Nacional (FLONA) de Assú**, semiárido potiguar, nordeste do Brasil, 2016.
- ANDRADE-LIMA, D. A. The caatinga dominium. **Rev. Bras. Bot. Rio de Janeiro**, v. 4, n. 1, p. 149-153, 1981.
- APPLE, J. L.; FEENER, D. H. Ant visitation of extrafloral nectaries of *Passiflora*: the effects of nectary attributes and ant behavior on patterns in facultative ant-plant mutualisms. **Oecologia**, v. 127, n. 3, p. 409–416, 2001.
- ARAÚJO, T.A.S.; ALMEIDA E CASTRO, V.T.N.; SILVA SOLON, L.G.; SILVA, G.A.; ALMEIDA, M.G.; COSTA, J.G.M; AMORIM, E.L.C; ALBUQUERQUE, U.P. Does rainfall affect the antioxidant capacity and production of phenolic compounds of an important medicinal species? **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 550–556, 2015.
- ATHIÊ-SOUZA, S. M.; MELO, J. I. M.; SILVA, L. P.; SANTOS, L. L.; SANTOS, J. S.; OLIVEIRA, L. S. D.; SALES, M. F. Phanerogamic flora of the Catimbau National Park, Pernambuco, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 19, n. 1, e20180622, 2019.
- BAKER, H. G.; BAKER, I. A brief historical review of the chemistry of the floral nectar, p. 126-152. In: B. BENTLEY; T. S. ELIAS (eds), **The biology of nectaries**. New York, Columbia University Press, 1983.
- BAKER, H. G.; BAKER, I. The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator type. **Israel J. Bot.** v. 39, p. 157-166, 1990.
- BAKER-MÉIO, B.; MARQUIS, R. J. Context-dependent benefits from ant-plant mutualism in three sympatric varieties of *Chamaecrista desvauxii*. **Journal of Ecology**, v. 100, n. 1, p. 242–252, 2012
- BARTON, A.M. Spatial variation in the effect of ants on extrafloral nectary plant. **Ecology**, v. 67, n. 2, p. 495-504, 1986.
- BENTLEY, B.L. Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 8, p. 407-27, 1977.
- BERNARDELLO, G. **A systematic survey of floral nectaries**. In: NICOLSON, S. W.; NEPI, M.; PACINI, E. Nectaries and nectar. Springer Netherlands, p. 19-128. 2007.
- BORGES, L. A.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Bee pollination and evidence of substitutive nectary in *Anadenanthera colubrina* (Leguminosae-Mimosoideae). **Arthropod-Plant Interactions**, v. 11, p. 263-271, 2017.
- BRONSTEIN, J.L.; ALARCÓN, R.; GEBER, M. The evolution of plant–insect mutualisms. **New Phytologist**, v. 172, n. 3, p. 412-28. 2006.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur doppelfärbung astrablau-safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, p. 255, 1972.

- CÂMARA, T.; REIS, D. Q. A.; ARNAN, X.; OLIVEIRA, F. M. P.; ARRUDA, E. C. P.; LEAL, I. Drought-induced reductions in plant defenses: Insights from extrafloral nectaries in the Caatinga dry forest. **Biotropica**, p. 1–6, 2021.
- CASPARY, R. De nectariis. *Adolphum Marcum*. **Botanische Zeitung.**, v. 6, p. 628–630, 1848.
- CNUC - Cadastro Nacional de Unidades de Conservação. Disponível em: www.cnuc.mma.gov.br/powerbi Acesso em 13/02/2023.
- COLEY, P. D.; BATEMAN, M. L.; KURSAR, T. A. The effects of plant quality on caterpillar growth and defense against natural enemies. **Oikos**, v. 115, n. 2, p. 219–228, 2006.
- CORBET, S. Nectar sugar content: estimating standing crop and secretion rate in the field. **Apidologie**, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2003.
- CRUDEN, R.W.; HERMAN, S. M., PETERSON, S. **Patterns of nectar production and plant-pollinator coevolution**. Pp. 80-125. In: BENTLEY, B.; ELIAS, T. S. (Eds.) *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York, 1983.
- CUATLE, M.; RICO-GRAY, V. The effects of wasps and ants on the reproductive success of the extrafloral nectaried plant *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **Functional Ecology**, v. 17, n. 417-423, 2003.
- CUTLER, D. F.; BOTHA, T.; STEVENSON, D. W. **Plant Anatomy: An applied approach**, 2008.
- CUTTER, E.G. **Anatomia vegetal. Parte I. Células e tecidos**. 2.ed. São Paulo: Roca. 1987.
- DÁTTILO, W.; AGUIRRE, A.; FLORES-FLORES, R.V.; FAGUNDES, R.; LANGE, D.; GARCÍA-CHÁVEZ, J.; DEL-CLARO, K.; RICO-GRAY, V. Secretory activity of extrafloral nectaries shaping multitrophic antplant-herbivore interactions in an arid environment. **Journal Arid Environment**, v. 114, p. 104–109, 2015.
- DELGADO, M. N. **Variações fenotípicas nas defesas anti-herbivoria de espécies do Cerrado: Efeitos de diferentes condições ambientais**. Tese de Doutorado, Brasília-DF, 129 p. 2011.
- DÍAZ-CASTELAZO, C.; RICO-GRAY, V.; ORTEGA, F.; ANGELES, G. Morphological and secretory characterization of extrafloral nectaries in plants of coastal Veracruz, México. **Annals of Botany**, v. 96, p. 1175-1189, 2005.
- ELIAS, T. S. **Extrafloral nectaries: their structure and distribution**. In: BENTLEY, B. L.; ELIAS, T. S. (eds.). *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York, p. 174-203, 1983.
- DRYFLOR et al. Plant diversity patterns in neotropical dry forests and their conservation implications. **Science**, v. 353, n. 6306, p. 1383-1387, 2016.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgard Blucher. 1974.
- ESCOBAR, N. A. G.; SILVA, E. D. S.; TOZZI, A. M. G. A. **Sinopse das Caesalpinioideae (Leguminosae) na Serra do Japi**, São Paulo, Brasil, 2014.
- FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. Academic Press, London, 1979.
- FAHN, A. Structure and function of secretory cells. **Adv. Botan. Res.**, v. 31, p. 37-75, 2000.
- FLORA DO BRASIL 2023. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>. Acesso em: 04/03/2023.
- FONSECA, C. R.; ANTONGIOVANNI, M.; MATSUMOTO, M.; VENTICINQUE, E. M. **“Conservation opportunities in the Caatinga”**. In: SILVA, J. M. C., LEAL, I.R., TABARELLI, M. (eds.) *Caatinga. The largest tropical dry forest region in South America*. Cham: Springer International Publishing, p. 429-444, 2017.

- FRANKS, S. J.; WEBER, J. J.; AITKEN, S. N. Evolutionary and plastic responses to climate change in terrestrial plant populations. **Evolutionary Applications**, v. 7, n. 1, p. 123-139, 2014.
- FREIRE, N. C. F.; MOURA, D.; SILVA, J.; MOURA, A.; MELO, J.; PACHECO, A. **Atlas das caatingas – O único bioma exclusivamente brasileiro**. Recife: Fundação Joaquim Nabuco, Editora Massangana, 2018.
- FURR, Y.; MALBERG, P. G. Histochemical analysis of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **J. Nat. Prod.**, v. 44, p. 153-159, 1981.
- GAGNON, E.; BRUNEAU, A.; HUGHES, C. E.; QUEIROZ, L. P.; LEWIS, G. P. A new generic system for the pantropical Caesalpinia group (Leguminosae). **Phytokeys**, v. 71, p. 1-160, 2016.
- GARCÍA-VALDÉS, R.; SVENNING, J. C.; ZAVALA, M. A.; PURVES, D. W.; ARAÚJO, M. B. Evaluating the combined effects of climate and land-use change on tree species distributions. **Journal of Applied Ecology**, v. 52, p. 902–912, 2015.
- GARDNER, R. O. Vanillin-hydrochloridric acid as a histochemical test for tannin. **Stain Technol.**, v. 50, p. 315-317, 1975.
- GHARIBI, S.; SAEIDI, G.; GOLI, S. A. H. Effect of drought stress on total phenolic, lipid peroxidation, and antioxidant activity of *Achillea* species. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 796–809, 2015.
- GONZALEZ, A. M.; MARAZZI, B. Extrafloral nectaries in Fabaceae: filling gaps in structural and anatomical diversity in the family, **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 187, n. 1, p. 26–45, 2018.
- GUIMARÃES JR, P.R. Extrafloral nectaries as a deterrent mechanism against seed predators in the chemically protected weed *Crotalaria pallida* (Leguminosae). **Austral Ecology**, v. 31, n. 6, p. 776-82, 2006.
- HAMMER Øyvind et al. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 9pp. 2001.
- HEIL, M.; MCKEY, D. Protective Ant-plant Interactions as Model Systems in Ecological and Evolutionary Research. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 34, p. 425–453, 2003.
- HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annu Rev Plant Biol.**, v. 59, p. 41-66, 2008.
- INGROUILLE, M.; EDDIE, B. **Plants: Diversity and evolution**. New York: Cambridge University Press. 2006.
- IPA - Instituto Agronômico de Pernambuco. Disponível em: http://www.ipa.br/indice_pluv.php. Acesso em: 15/09/22.
- IZZO, T. J.; PETINI-BENELLI, A. Relação entre diferentes espécies de formigas e a mirmecófita *Cordia nodosa* Lamarck (Boraginaceae) em áreas de mata ripária na Amazônia mato-grossense. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 355-60, 2011.
- JOHANSEN, D. **Plant microtechnic**. New York: McGraw Hill Book Company, Inc., 1940.
- JORGE, R. **Ontogenia dos tricomas em cotilédones e plântulas de *Lavandula pedunculata* (alfazema)** – Relatório de estágio de Iniciação à Investigação Científica. Centro de Biologia Aplicada à Agricultura, Instituto Superior de Agronomia, UTL, Lisboa. 2012.
- JUDD, W. S. et al. **Sistemática vegetal: Um enfoque filogenético**. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- KOPTUR, S. **Extrafloral nectary-mediate interactions between insects and plants**. In: Insect-plant interactions. CRS Press, Boca Raton, 81-129 pp., 1992.

- KOST, C.; HEIL, M. Increased availability of extrafloral nectar reduces herbivory in Lima bean plants (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae). **Basic and Applied Ecology**, v. 6, n. 3, p. 237-48, 2005.
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. EDUR, Seropédica, 198 p. 1997.
- LEUZINGER, M. D.; SANTANA, P. C.; SOUZA, L. R. **Parques nacionais do Brasil: pesquisa e preservação**. Brasília: UNICEUB, 2020.
- LPWG - Legume Phylogeny Working Group. Disponível em: <https://www.legumedata.org/post/2021/lpwg-meeting/> . Acesso em 20/02/2023.
- MACE, M.E.; HOWELL, C.R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Canadian Journal of Botany**, v. 52, p. 2423-2426, 1974.
- MACHADO, S. R. **Estrutura e desenvolvimento de nectários extraflorais de *Citharexylum mirianthum* Cham.** (Verbenaceae). Tese de livre docência. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999.
- MARAZZI, B.; GONZALEZ, A. M.; DELGADO-SALINAS, A.; LUCKOW, M. A.; RINGELBERG, J. J.; HUGHES, C. E. Extrafloral nectaries in Leguminosae: phylogenetic distribution, morphological diversity and evolution. **Australian Systematic Botany**, v. 6, p. 409–458, 2019.
- MARQUIS, R. J.; DINIZ, I. R.; MORAIS, H. C. Patterns and correlates of interspecific variation in foliar insect herbivory and pathogen attack in Brazilian cerrado. **Journal of Tropical Ecology**, v. 17, 127-148, 2001.
- MATHEWS, C.R.; BOTTRELL, D.G.; BROWN, M.W. Interactions between extrafloral nectaries, ants (Hymenoptera: Formicidae), and other natural enemies affect biological control of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) on peach (Rosales: Rosaceae). **Environmental Entomology**, v. 40, n. 1, p. 42-51, 2011.
- MELO, Y.; CORDULA, E.; MACHADO, S.; ALVES, M. Morfologia de nectários em Leguminosae *senso lato* em áreas de caatinga no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 4, p. 1034-45, 2010.
- MURCIA, C. Edge effects in fragmented forests: Implications for conservation. **Trends Ecol. Evol.**, v. 10, p. 58–62, 1995.
- NAHAS, L.; GONZAGA, M. O.; DEL-CLARO, K. Emergent Impacts of Ant and Spider Interactions: Herbivory Reduction in a Tropical Savanna Tree. **Biotropica**, v. 44, p. 498-505, 2012.
- NEMA - Núcleo de Ecologia e Monitoramento Ambiental. UNIVASF 2023. Disponível em: <https://nema.univasf.edu.br>. Acesso em: 05/03/2023
- NICOLSON, S. W.; THORNBURG, R. W. Nectar chemistry, 215–264 pp. In: S. W. NICOLSON, S. W.; PACIINI, E. (eds.), Nectaries and nectar. **Dordrecht**, Springer, 2007.
- NIMER, E. Climatologia da região Nordeste do Brasil. Introdução à climatologia dinâmica. **Revista Brasileira de Geografia**, v. 34, p. 3-51, 1972.
- OLIVEIRA, J.N.B. **Anatomia das plantas superiores**. Ponta Delgada, Portugal, 2011.
- OLSON, D.M.; TAKASU, K.; LEWIS, W.J. **Food needs of adult parasitoids: behavioral adaptation and consequences**. Cambridge University Press, 137-147p, 2005.
- PAINTING, C.J.; NICHOLSON, C.C.; BULBERT, M.W.; NORMA, Y.; LI, D. Nectary feeding and guarding behavior by a tropical jumping spider. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 8, p. 469-470, 2017

- PARMESAN, C., YOHE, G. A globally coherent fingerprint of climate change. **Nature**, v. 421, p. 37-42, 2003.
- PATERNIO, G.; SIQUEIRA-FILHO, J.; GANADE, G. Species-specific facilitation, ontogenetic shifts and consequences for plant community succession. **Journal of Vegetation Science**, v. 27, n. 3, p. 606-615, 2016.
- PATT, Joseph et al. Pollination biology of *Platanthera stricta* (Orchidaceae) in Olympic National Park, Washington. **American Journal of Botany**, v. 76, n. 8, p. 1097-1106, 1989.
- PBMC: Contribuição do Grupo de Trabalho 2 ao Primeiro Relatório de Avaliação Nacional do Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas. Sumário Executivo do GT2. PBMC, Rio de Janeiro, Brasil. 28 p. 2013.
- PEREIRA, S.; SANTOS, M.; LEAL, I.; TABARELLI, M.; SANTOS, M. G. "Arbuscular Mycorrhizal Inoculation Increases Drought Tolerance and Survival of *Cenostigma Microphyllum* Seedlings in a Seasonally Dry Tropical Forest". **Forest Ecology and Management**, v. 492, p. 119-213, 2019.
- PONCE-REYES, R., NICHOLSON, E., BAXTER, P.W.J., FULLER, R.A., POSSINGHAM, H. Extinction risk in cloud forest fragments under climate change and habitat loss. **Diversity and Distributions**, v. 19, p. 518–529, 2013.
- PRADO, D. **As caatingas da América do Sul**. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (eds.). *Ecologia e conservação da Caatinga*. pp. 3-73. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2003.
- PURVIS, M.; COLLIER, D.; WALLS, D. **Laboratory techniques in botany**. Butterworths, London. 1964.
- QUEIROZ, L P. **Leguminosas da Caatinga**. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 913 pp. 2009.
- RITO, K.F.; ARROYO-RODRIGUEZ, V.; QUEIROZ, R.T.; LEAL, I.R.; TABARELLI, M. Precipitation mediates the effect of human disturbance on the Brazilian Caatinga vegetation. **Journal of Ecology**, v. 105, p. 828-838, 2016.
- RIZZINI, C.T.; COIMBRA-FILHO, A. F.; HOUAISS, A.. **Ecossistemas brasileiros/ Brazilian ecosystems**. Enge-Rio Engenharia e Consultoria, S.A. Rio de Janeiro, Brasil, 1988.
- ROCHA, J. F.; PIMENTEL, R. R.; ROSA, M. M. T.; MACHADO, S. R. **Anatomia e Histoquímica dos nectários florais de *Dombeya wallichii* (Lindl.) K. Schum. e *Dombeya natalensis* Sond. (Malvaceae)**, 2010.
- RODRIGUEZ, E.; HEALEY, P. L.; MEHTA, I. **Biology and chemistry of plant trichomes**. Plenum, New York, 1984.
- ROOT, T. L. et al. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. **Nature**, v. 421, n. 6918, p. 57-60, 2003.
- ROSHCHINA, V. V.; ROSHCHINA, V. D. **The excretory function of higher plants**. Springer-Verlag, Berlin, 1993.
- RUDGERS, J. A. Enemies of herbivores can shape plant traits: selection in a facultative ant-plant mutualism. **Ecology**, v. 85, n. 1, p.192-205, 2004.
- SASS, J. **Botanical microtechnique**. The Iowa State College Press, Ames. 1951.
- SAVAGE, A. M.; RUDGERS, J.A.; WHITNEY, K.D. Elevated dominance of extrafloral nectary-bearing plants is associated with increased abundances of an invasive ant and reduced native ant richness. **Diversity and Distributions**, v. 15, n. 5, p. 751–61, 2009.
- SCHMIDT, D. D.; VOELCKEL, C.; HARTL, M.; SCHMIDT, S.; BALDWIN, I. T. Specificity in ecological interactions. Attack from the same lepidopteran herbivore

- results in species-specific transcriptional responses in two solanaceous host plants. **Plant Physiology**, v. 138, p. 1763–1773, 2005.
- SFAIR, J.; BELLO, F.; FRANÇA, T.; BALDAULF, C.; TABARELLI, M. Chronic human disturbance affects plant trait distribution in a seasonally dry tropical forest. **Environmental Research Letters**, v. 13, n. 2, p.1-12, 2018.
- SILVA, J. M. C.; LEAL, I. R.; TABARELLI, M. **Caatinga. The largest tropical dry forest region in South America**. Cham: Springer International Publishing, 2017.
- SIMPLÍCIO, V. S., CONCE, M. C., DELLAGNOL. Tricomas: defesa ou vulnerabilidade para a planta na interação com microrganismos? **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 28, p. 184-199, 2020.
- SOUSA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática; guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.
- STEFANO, M.; PAPINI, A.; ANDALO, C.; BRIGHIGNA, L. Ultrastructural aspects of the hypanthial epithelium of *Selenicereus grandiflorus* (L.) Britton; Rose (Cactaceae). **Flora** v. 196, p. 194-203, 2001.
- STEPHENSON, A. G. The role of the extrafloral nectaries of *Catalpa speciosa* in limiting herbivory and increasing fruit production. **Ecology**; v.63, n.3, p.663-9, 1982.
- TABARELLI et al. **Caatinga: legado, trajetória e desafios rumo à sustentabilidade**. Cienc. Cult. vol.70 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2018. TABARELLI, M; INARA, I. R.; SCARANO, F. R.; SILVA, J. M. C. 2018.
- VAL, E. D.; DIRZO, R. Mirmecofilia: las plantas con ejército próprio. **Interciencia**, v. 29, n. 12, 2004.
- VALLADARES, F.; VILÀ, M.; ZAMORA, R.; ZOBEL, M. Novel ecosystems: theoretical and management aspects of the new ecological world order. **Global Ecology and Biogeography**, n. 15, p. 1-7. 2006.
- VILHENA-POTIGUARA, R. C. Estruturas secretoras em Cipó-d'alho (*Mansoa standleyi* (Steud.) A. H. Gentry, Bignoniaceae): ocorrência e morfologia. **Acta Amazônica**, v. 42, n. 3, p. 322-28, 2012.
- VOGEL, S. Remarkable nectaries: structure, ecology, organophyletic perspectives. I Substitutive nectaries. **Flora**, v. 192, p. 305–333, 1997.
- WEBER, M. G.; PORTURAS, L. D.; KEELER, K.H. **World list of plants with extrafloral nectaries**. Disponível em: <http://www.extrafloralnectaries.org> . Acesso em: 07/ 03/2023. 2015.
- WHITNEY, K.D. Experimental evidence that both parties in a facultative plant-spider mutualism. **Annals of Botany**, v. 111, p. 1251-1261, 2004.
- ZIMMERMANN, J. G. Über die extrafloralen Nektarien der Angiospermen. **Beihefte zum Botanischen Zentralblatt**, v. 49, p. 99–196, 1932.

**APÊNDICE A – TABELA DE MEDIDAS COM OS PARÂMETROS AVALIADOS
NOS NEFs DE RAQUES E FOLÍOLOS DE *CENOSTIGMA MICROPHYLLUM* NA
SECA (1a COLETA).**

	Qtde	<i>Cenostigma microphyllum</i>										
		Foliolo						Raque				
		Densidade dos nectários (Nº/mm²)		Comprimento do pescoço (µm)	Largura do pescoço (µm)	Área da cabeça (µm²)	Área do ducto (µm²)	Densidade dos nectários (Nº/mm²)		Comprimento do pescoço (µm)	Largura do pescoço (µm)	Área da cabeça (µm²)
Indivíduo 1	1	3	1,29	77,70	52,52	4762,24	3466,56	6	1,29	126,16	60,25	4955,13
	2	3		71,68	56,27	7612,98	1124,26	6		153,41	71,30	8927,75
	3	1		77,24	51,72	3955,96	5026,76	3		142,03	60,68	8461,24
	4	2		65,75	61,66	7766,68	4977,04	5		158,18	71,42	10597,07
	5	3		68,19	57,17	7843,00	4888,91	4		166,34	93,95	11551,25
	6	2		56,15	54,08	5041,63	6806,36	3		90,30	61,69	8074,41
	7	3		70,42	44,90	5726,25	3219,52	3		109,06	79,37	9308,91
	8	3		75,49	53,06	5585,62	2356,12	6		71,53	60,19	6475,62
	9	2		68,97	54,68	7357,29	6316,91	4		150,29	64,63	9701,75
	10	4		93,28	60,87	7652,88	2505,52	5		139,38	62,77	7715,56
Indivíduo 2	1	2	1,29	76,76	54,54	6337,31	5437,44	3	1,29	83,39	72,83	10380,70
	2	3		49,58	51,13	4456,93	5071,78	4		63,63	79,74	10561,57
	3	3		70,51	48,99	4052,99	6841,48	2		79,37	61,32	7107,04
	4	4		66,78	43,23	3087,01	5821,21	4		84,92	53,49	6399,76
	5	3		72,27	50,08	4539,16	10261,32	5		136,87	85,65	11479,67
	6	2		66,93	51,26	6375,24	4786,22	8		103,89	79,58	11138,40
	7	4		47,26	76,98	7259,23	9436,74	5		122,64	59,43	8179,29
	8	4		66,51	36,50	2977,15	8336,00	3		82,91	50,65	5264,59
	9	3		74,59	51,01	5358,84	8148,24	8		117,32	81,62	12218,75
	10	5		78,40	57,44	7331,16	11402,27	4		94,65	77,11	11417,92
Indivíduo 3	1	2	1,29	53,62	45,28	4148,05	10133,70	3	1,29	119,57	59,18	8143,21
	2	2		68,91	52,30	5968,17	9690,74	3		77,64	35,84	2645,25
	3	2		56,67	56,19	5895,32	11323,94	2		123,24	90,90	4857,53
	4	2		64,69	65,11	6925,48	7566,77	3		149,45	79,40	10198,68
	5	1		49,01	58,19	5103,15	10609,46	2		135,09	71,65	6025,88
	6	2		47,81	64,88	5338,14	6332,59	1		138,17	66,78	6150,89
	7	2		56,99	54,84	5494,03	14781,29	2		74,03	75,71	9345,57
	8	2		50,50	57,03	6561,55	13155,97	4		121,99	71,91	7083,22
	9	1		58,61	51,50	4078,55	7493,53	7		135,52	56,03	6376,63
	10	2		40,00	55,24	7107,04	13136,74	6		104,66	63,42	6958,55
Média		2,57	-	64,71	54,29	5723,30	7348,51	4,13	-	115,19	68,62	8256,73

**APÊNDICE B – TABELA DE MEDIDAS COM OS PARÂMETROS AVALIADOS
NOS NEFs DE RAQUES E FOLÍOLOS DE *CENOSTIGMA MICROPHYLLUM* NA
CHUVA (2a COLETA).**

	Qtde	Cenostigma microphyllum										
		Foliolo						Raque				
		Densidade dos nectários (Nº/mm²)		Comprimento do pescoço (µm)	Largura do pescoço (µm)	Área da cabeça (µm²)	Área do ducto (µm²)	Densidade dos nectários (Nº/mm²)		Comprimento do pescoço (µm)	Largura do pescoço (µm)	Área da cabeça (µm²)
Nº	mm²	Nº	mm²									
Indivíduo 1	1	2	1,29	70,23	50,71	4389,93	4965,2	8	1,29	94,47	74,78	6494,57
	2	3		60,78	51,14	4859,09	4500,8	6		91,19	56,99	3156,39
	3	2		80,71	52,16	5127,17	3488,90	5		112,64	77,61	12203,05
	4	3		126,84	61,79	6369,60	2712,8	4		104,40	64,52	5108,34
	5	2		50,00	57,72	7419,03	3254,10	3		107,36	57,18	6579,12
	6	3		57,14	51,43	5386,00	5680,9	3		163,97	89,87	4754,91
	7	2		33,89	54,28	4702,24	3440	2		73,10	65,28	7184,11
	8	2		50,00	50,00	4988,91	4980,50	1		57,50	80,36	10857,82
	9	2		54,81	42,60	3696,70	4401,7	7		89,52	73,52	9556,36
	10	2		46,91	40,38	4636,17	3907,7	3		113,37	71,81	9268,19
Indivíduo 2	1	3	1,29	60,36	61,93	6686,76	4058,5	4	1,29	160,12	106,67	13525,53
	2	2		57,07	47,78	4514,44	2885,20	5		101,31	66,15	10247,29
	3	3		34,66	79,42	7043,20	4023,9	6		96,94	68,93	5315,55
	4	3		47,31	77,54	7806,65	4412,10	2		65,39	60,39	4498,04
	5	2		60,19	68,15	7268,19	3921,9	2		59,82	70,31	5901,94
	6	2		44,54	51,20	5173,94	5515,1	3		89,03	88,43	9954,72
	7	2		36,60	72,22	6962,35	4192,7	5		96,62	107,54	14817,97
	8	4		39,82	39,22	2081,31	3088,53	6		96,91	96,90	16372,72
	9	5		42,58	60,83	5766,46	2814,6	6		113,06	86,56	7245,32
	10	3		60,37	62,49	7131,90	2797,30	7		101,31	79,40	8701,32
Indivíduo 3	1	4	1,29	60,23	55,14	5680,30	2484,83	4	1,29	130,06	74,29	8390,74
	2	4		59,14	48,95	3956,22	3460,5	7		100,98	64,00	6579,12
	3	4		79,63	47,76	3647,26	2073,1	6		144,42	54,90	7916,61
	4	4		50,05	49,11	5030,26	2933,1	8		120,61	68,36	10893,51
	5	3		70,02	49,75	3489,49	3490,1	6		131,54	64,23	7577,27
	6	4		64,49	38,96	3097,71	2940,1	5		127,29	70,67	4338,18
	7	5		66,27	48,64	3960,61	4375,1	6		101,26	44,77	4776,85
	8	3		44,72	40,33	3503,35	3966,4	4		144,26	67,91	7603,49
	9	4		56,90	39,02	3395,01	4060	4		144,65	62,92	4775,24
	10	4		58,34	47,08	4217,37	3923,6	6		107,13	64,24	8285,52
Média	3,03	-	-	57,49	53,26	5066,25	3758,30	4,80	-	108,01	72,65	8095,99

APÊNDICE C – TESTE DE NORMALIDADE DAS AMOSTRAS.

Normalidade - Variáveis	Shapiro-Wilk-W P1	P-Valor P1	Shapiro-Wilk-W P2	P-Valor P2
<i>Folículo</i>				
Comprimento do pescoço	0.96	0.40	0.83	0.001
Largura do pescoço	0.94	0.11	0.91	0.023
Área da cabeça	0.95	0.23	0.96	0.35
Área do ducto	0.97	0.72	0.97	0.69
Densidade dos nectários	0.94	0.09	0.95	0.21
<i>Raque</i>				
Comprimento do pescoço	0.95	0.21	0.96	0.41
Largura do pescoço	0.97	0.70	0.93	0.08
Área da cabeça	0.97	0.56	0.94	0.11

Valores destacados em negrito = significativos $p < 0.05$ indicam dados não normais.