



Caracterização anatômica e histoquímica de órgãos subterrâneos de espécies mico-heterotróficas pertencentes ao gênero *Thismia* Griff.

Palavras-Chave: anatomia, mico-heterotrofia, Thismiaceae, hifas.

Autores(as):

Vinicius Felix Cardozo-Martins, IB – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Juliana Lischka Sampaio Mayer (orientadora), IB - UNICAMP

Diego Ferreira da Silva (coautor), JBRJ; Inti de Souza (coautor), UFPR;

João Marcelo Alvarenga Braga (coautor), JBRJ; Román Carlos Ríos (coautor), UFPR

Introdução

A mico-heterotrofia consiste na capacidade de uma planta de obter carbono a partir de uma associação com fungos (Merckx, 2013), e pode ser observada em plantas que não realizam a fotossíntese, forma mais comum de obtenção do elemento por organismos vegetais. A mico-heterotrofia pode ser classificada em parcial ou total, sendo esta última aquela que persiste por todos os estágios de desenvolvimento de uma planta. A mico-heterotrofia total é observada nas *lanternas-de-fada*, plantas do gênero *Thismia* Griff. — pertencentes à família Thismiaceae, e utilizadas nesse projeto — que, por sua vez, formam redes de associação micorrízicas arbusculares compartilhadas entre suas raízes e as raízes de plantas fotossintetizantes (Thorogood & Siti-Murirah, 2021). Nas plantas desse gênero, as associações são de alta especificidade, sendo comum a estabelecida com fungos da família Glomeraceae, o que pode explicar a distribuição geográfica restrita ao redor do mundo (Guo et al., 2019). Assim, os órgãos subterrâneos se mostram de extrema importância para essas espécies, já que são os sítios de localização dessas associações micorrízicas.

As mico-heterotróficas desse gênero permanecem imersas na serapilheira das florestas — seu substrato mais comum —, emergindo à superfície por um período curto de tempo, geralmente após temporadas de chuva, onde dão início ao seu ciclo reprodutivo (Mar & Saunders, 2015; Thorogood, 2019). Esse hábito semi-subterrâneo dificulta sua coleta e visualização em campo, o que contribuiu para a limitação de publicações e estudos referentes ao gênero (Silva et al., 2020, Suetsugu et al., 2023).

Tendo esse cenário estabelecido, propomos por meio desse projeto estudar a anatomia dos órgãos subterrâneos de quatro espécies pertencentes ao gênero *Thismia* Griff. (Tabela 1), coletadas nos estados do Mato Grosso e do Paraná, buscando sua caracterização anatômica e um padrão de ocorrência entre as

espécies analisadas. Também realizamos testes histoquímicos buscando por substâncias de reserva nesses órgãos.

Tabela 1. Espécies do gênero *Thismia* utilizadas nesse estudo e seus locais de coleta.

Espécies	Local de coleta
Thismiaceae	
<i>Thismia singeri</i> (de la Sota) Maas & Maas	Alta Floresta, Mato Grosso
<i>Thismia hyalina</i> (Miers) F.Muell	PPN Cristalina, Novo Mundo, Mato Grosso
<i>Thismia melanomitra</i> Maas & H.Maas	Alta Floresta, Mato Grosso
<i>Thismia panamensis</i> (Standl.) Jonker	Morro do Anhangava na Parque Estadual Serra da Baitaca, em Quatro Barras, Paraná

Materiais e métodos

Para este projeto, utilizamos espécies do gênero *Thismia* Griff. que foram previamente coletadas em campo por colaboradores (Tabela 1). Essas coletas foram fixadas em formalina neutra tamponada (FNT) e desidratadas em série etílica até o álcool 70%, onde ficaram armazenadas. Esses processos e os processos a seguir, foram realizados utilizando equipamento e materiais do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal, na UNICAMP.

Começamos analisando a morfologia externa dos órgãos subterrâneos de cada uma das quatro espécies à olho nu e sob lupa. Fotografias foram tiradas posicionando as espécies sobre um fundo preto.

Em seguida, seccionamos regiões de interesse dos órgãos subterrâneos de cada uma das quatro espécies, e desidratamos levando até o álcool 100% para que pudessem passar por preparação usual para visualização de anatomia vegetal por microscopia de luz. Sendo assim, passamos as amostras por solução de pré-infiltração — sendo levada da proporção 1:1 até a 1:3 de álcool e resina plástica, de 24-24h — e infiltração, composta inteiramente por resina plástica (Historesina Leica®), por 48h. As amostras em solução foram colocadas em bomba de vácuo antes de cada troca, para que tivéssemos certeza de que o material estivesse bem infiltrado. A inclusão foi feita colocando as amostras em recipientes retangulares preenchidos por resina plástica, onde esperamos até que estivessem secas para que pudéssemos colar em blocos de madeira e, eventualmente, cortar utilizando o micrótomo automático, nas espessuras de 5µm e 8µm.

Após cortados, coramos as lâminas com azul de toluidina para visualização de estruturas anatômicas em microscópio óptico de luz. As fotografias foram tiradas utilizando do microscópio Olympus BX51 (Olympus Corporation®, Tóquio, Japão), conectado a uma câmera de vídeo Olympus DP71 (Olympus Corporation®).

Para a microscopia eletrônica de varredura, fizemos novas secções e desidratamos conforme recomendado para tal análise. Levamos à secagem em ponto crítico de CO_2 , montamos nos stubs e submetemos à metalização para que as amostras pudessem ser visualizadas. Essas etapas foram realizadas em conjunto com o Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do IB, na UNICAMP.

Resultados e discussão

Na análise da morfologia externa das quatro espécies, *Thismia panamensis* e *T. hyalina* apresentam estrutura subterrânea tuberosa, entumecida e de formato e textura irregulares. Pequenas e finas raízes partem dessa estrutura, que também marca o ponto de origem da haste floral. *T. singeri* apresentou raízes bem longas e filiformes que convergem em um ponto em comum, onde se insere a haste floral. Para *T. melanomitra*, se observou uma estrutura subterrânea longa e de crescimento horizontal, havendo inserção de mais de uma haste floral durante seu comprimento. Nessa espécie, novas gemas caulinares podem ser formadas (Figura 1).

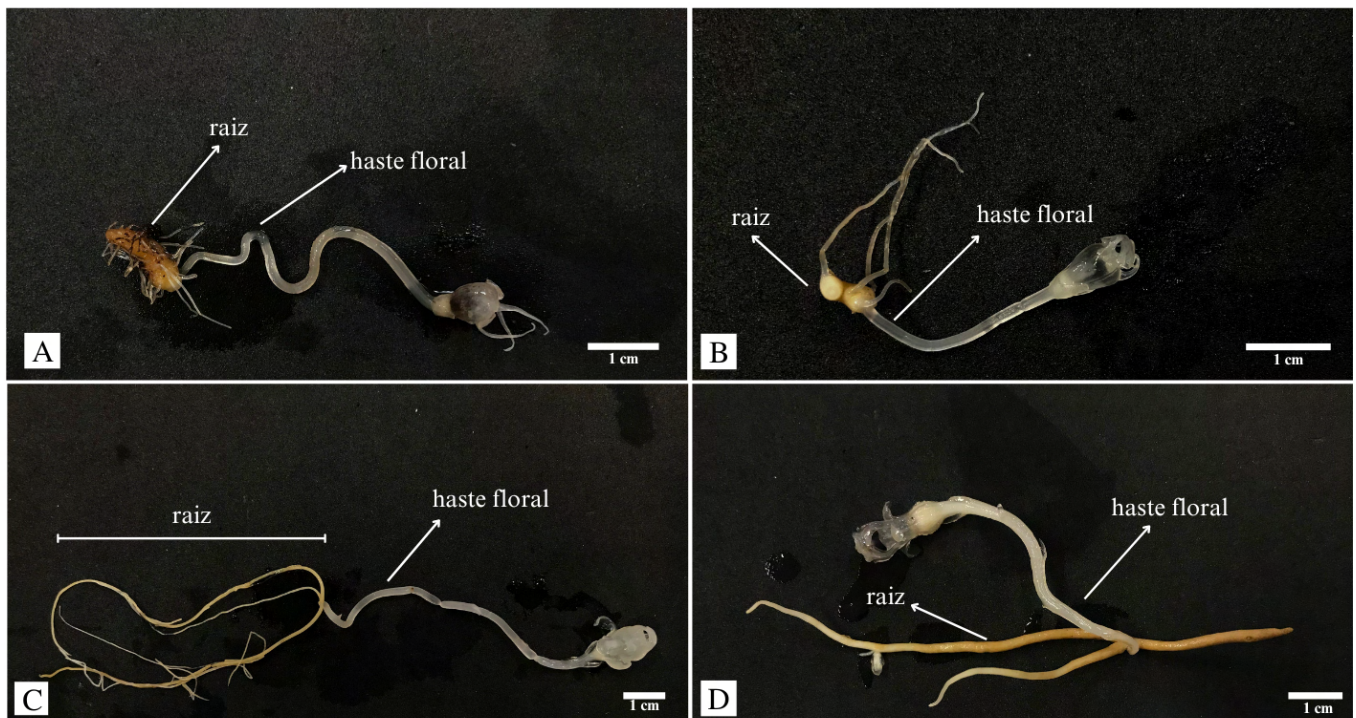


Figura 1: Fotos tiradas das amostras armazenadas em álcool 70%. Nota-se identificadas as estruturas subterrâneas e a haste floral inserida. **A** = *Thismia panamensis*, **B** = *T. hyalina*, **C** = *T. singeri*, **D** = *T. melanomitra*.

Para as análises anatômicas, as quatro espécies seguiram uma organização comum (Figura 2). De maneira geral, há uma epiderme uniestratificada com células descontinuas, sendo seguida por um córtex parenquimático de várias camadas (principalmente para as espécies maiores) preenchido por hifas, podendo haver um ou mais cilindros vasculares na região central da estrutura subterrânea. O cilindro vascular é reduzido e conta com poucas células condutoras (Figura 2F) — até para as estruturas subterrâneas maiores — e é delimitado por uma endoderme. Para as quatro espécies, o estágio de degradação das hifas é diferente conforme seu posicionamento, sendo as mais íntegras aquelas que ficam

localizadas mais próximas à epiderme, e as mais degradadas aquelas mais próximas ao cilindro vascular. *T. panamensis* e *T. hyalina* não contam com hifas nas células da epiderme, e nem nas camadas celulares iniciais do córtex — exocórtex, se usarmos a terminologia padronizada por Feller et al. (2022). Já *T. melanomitra* não apresenta epiderme com hifas. Quanto à *T. singeri*, as hifas são apresentadas desde as células da epiderme. Não foram encontradas substâncias de reserva em nenhuma das espécies.

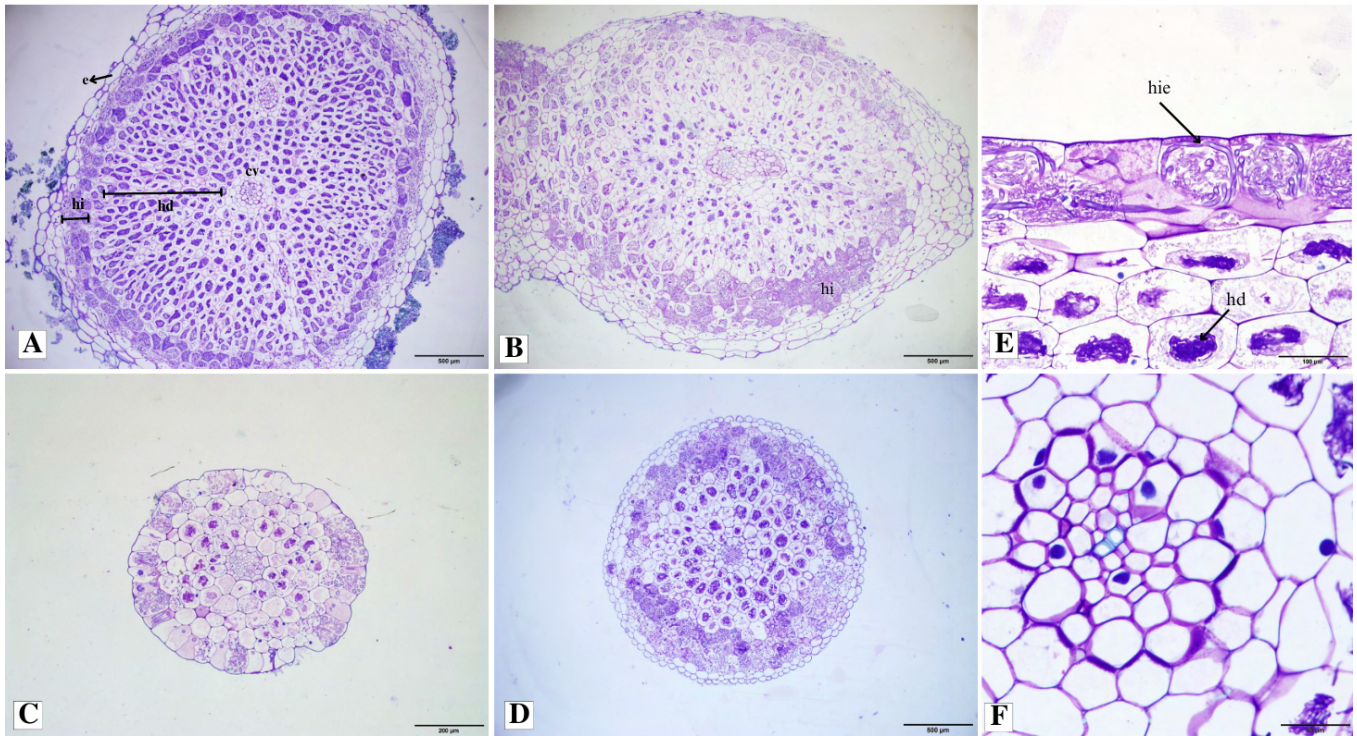


Figura 2: Anatomia das estruturas subterrâneas das espécies, em corte transversal **A** = *Thismia panamensis*, **B** = *T. hyalina*, **C** = *T. singeri*, **D** = *T. melanomitra*. **E** = Corte longitudinal de *T. singeri* mostrando as hifas íntegras enoveladas (hie), **F** = Corte transversal mostrando o cilindro vascular com poucas células condutoras de *T. panamensis*. cv = cilindro vascular, e = epiderme, hd = hifas degradadas, hi = hifas íntegras.

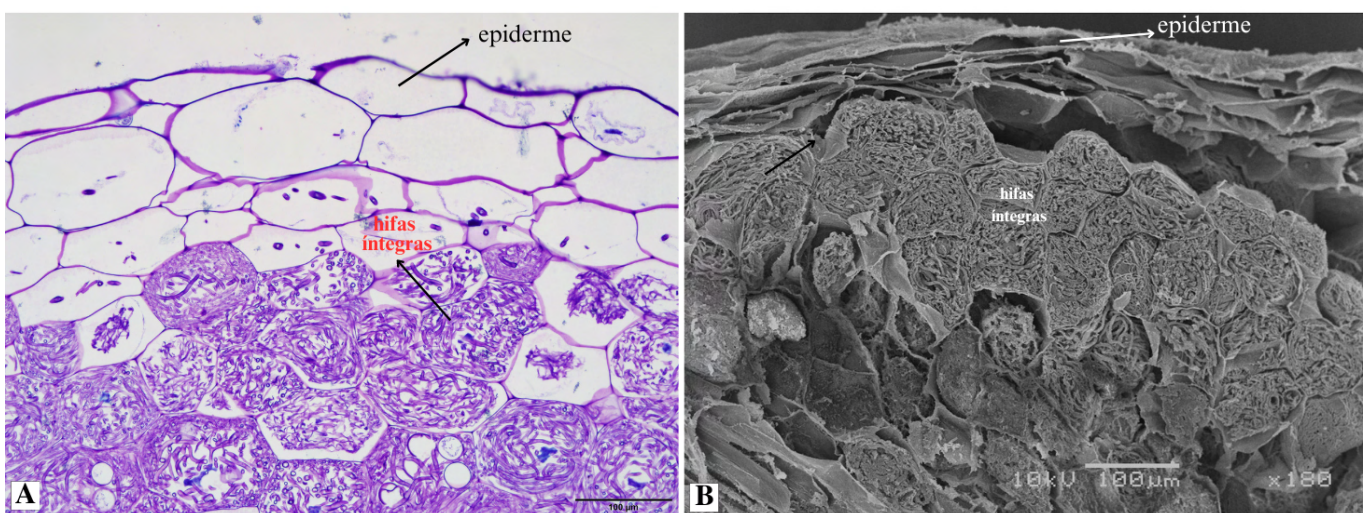


Figura 3: Comparativo da anatomia em corte transversal, de *Thismia hyalina*, por microscopia de luz (**A**) e por microscopia eletrônica de varredura (**B**). Observa-se a epiderme, seguida por uma faixa sem presença de hifas e, por fim, o começo da região do córtex preenchida por hifas íntegras (em menor estágio de degradação).

Os diferentes estágios de degradação das hifas podem evidenciar quais compartimentos anatômicos possuem fungos mais antigos, pois as células que possuem estágios mais degradados já atingiram o pico da troca de carbono e nutrientes entre a planta e o fungo. Quanto aos diferentes formatos, isso pode refletir a funcionalidade daquela hifa, sendo as de formato enovelado (Figura 2E) — geralmente presente em células maiores — aquelas que possuem capacidade elevada de fornecer nutrientes para digestão (Feller et al., 2022).

A estrutura subterrânea de *T. melanomitra* é caracterizada como vermiforme e diferiu daquilo que foi encontrado na anatomia de outras espécies com estrutura subterrânea de mesmo formato, como em *T. abei*, que apresenta hifas nas células de sua epiderme (Feller et al., 2022), sendo as mesmas ausentes na epiderme de *T. melanomitra*.

Conclusão

Portanto, conclui-se que, mesmo que as quatro espécies apresentem certa uniformidade de organização anatômica, o que pode indicar um padrão para o gênero *Thismia* Griff., divergências podem ser observadas quanto à disposição e formato das hifas nos diferentes compartimentos anatômicos.

Bibliografia

- FELLER, B. et al. Mycorrhizal structures in mycoheterotrophic *Thismia* spp. (Thismiaceae): functional and evolutionary interpretations. **Mycorrhiza**, v. 32, n. 3, p. 269–280, 1 jul. 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00572-022-01076-3>>.
- GUO, X. et al. A symbiotic balancing act: arbuscular mycorrhizal specificity and specialist fungus gnat pollination in the mycoheterotrophic genus *Thismia* (Thismiaceae). **Annals of Botany**, v. 124, n. 2, p. 331–342, 24 set. 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/aob/article/124/2/331/5514326>>.
- MAR, S. S.; SAUNDERS, R. M. K. *Thismia hongkongensis* (Thismiaceae): a new mycoheterotrophic species from Hong Kong, China, with observations on floral visitors and seed dispersal. **PhytoKeys**, n. 46, p. 21–33, 4 fev. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4391955/>>.
- MERCKX, V. S. F. T. Mycoheterotrophy: An Introduction. Em: MERCKX, V. (Ed.). **Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi**. New York, NY: Springer, 2013. p. 1–17. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5209-6_1>.
- SILVA, D. F. D.; ENGELS, M. E.; SOARES-LOPES, C. R. A. Novelties in *Thismia* (Thismiaceae) from South Brazilian Amazon with the description of a new species. **Phytotaxa**, v. 429, n. 4, p. 261–273, 22 jan. 2020. Disponível em: <<https://www.biotaxa.org/Phytotaxa/article/view/phytotaxa.429.4.2>>.
- SITI-MUNIRAH, M. Y.; DOME, N.; THOROGOOD, C. J. *Thismia sitimeriamiae* (Thismiaceae), an extraordinary new species from Terengganu, Peninsular Malaysia. **PhytoKeys**, v. 179, p. 75–89, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34248369/>>.
- SUETSUGU, K.; YAMANA, K.; OKADA, H. Rediscovery of the presumably extinct fairy lantern *Thismia kobensis* (Thismiaceae) in Hyogo Prefecture, Japan, with discussions on its taxonomy, evolutionary history, and conservation. **Phytotaxa**, v. 585, n. 2, p. 102–112, 27 fev. 2023. Disponível em: <<https://www.biotaxa.org/Phytotaxa/article/view/phytotaxa.585.2.2>>.
- THOROGOOD, C. J. *Oxygyne*: An extraordinarily elusive flower. **PLANTS, PEOPLE, PLANET**, v. 1, n. 2, p. 67–70, 2019. Disponível em: <<https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ppp3.26>>.