



KALINE FERNANDES MIRANDA

**LEAF ANATOMY AND GAS EXCHANGE OF *Pimenta
pseudocaryophyllus* AND *Pleroma estrelense* SPECIES ALONG
DIFFERENT ALTITUDES OF A CLOUD FOREST**

**LAVRAS - MG
2022**

KALINE FERNANDES MIRANDA

**LEAF ANATOMY AND GAS EXCHANGE OF *Pimenta pseudocaryophyllus* AND
Pleroma estrelense SPECIES ALONG DIFFERENT ALTITUDES OF A CLOUD
FOREST**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro
Orientador

Dra. Alessandra de Oliveira Ribeiro
Coorientadora

Prof. Dr. Warley Augusto Caldas Carvalho
Coorientador

**LAVRAS - MG
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Miranda, Kaline Fernandes.

Leaf anatomy and gas exchange of *Pimenta
pseudocaryophyllus* and *Pleroma estrelense* species along different
altitudes of a cloud forest / Kaline Fernandes Miranda. - 2022.
82 p. : il.

Orientador: Evaristo Mauro de Castro.

Coorientadores: Alessandra de Oliveira Ribeiro, Warley
Augusto Caldas Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.
Bibliografia.

1. Floresta nebular. 2. Xilema secundário. 3. Anatomia
quantitativa. I. Castro, Evaristo Mauro de. II. Ribeiro, Alessandra
de Oliveira. III. Carvalho, Warley Augusto Caldas. IV. Título.

KALINE FERNANDES MIRANDA

ANATOMIA DAS FOLHAS E TROCAS GASOSAS DE ESPÉCIES *Pimenta pseudocaryophyllus* E *Pleroma estrelense* EM DIFERENTES ALTITUDES DE UMA FLORESTA NEBULAR

LEAF ANATOMY AND GAS EXCHANGE OF *Pimenta pseudocaryophyllus* AND *Pleroma estrelense* SPECIES ALONG DIFFERENT ALTITUDES OF A CLOUD FOREST

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 16 de março de 2022.

Dr. Márcio Paulo Pereira	UFLA
Dra. Marinês Ferreira Pires Lira	UFLA
Dr. Warley Augusto Caldas Carvalho	UFSJ
Dr. Yuri Loes Zinn	UFLA

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro
Orientador

Dr. Alessandra de Oliveira Ribeiro
Coorientadora

Prof. Dr. Warley Augusto Caldas Carvalho UFSJ
Coorientador

**LAVRAS-MG
2022**

*Às minhas avós Manuelita (in memoriam) e Anacirema
(in memoriam), por todo amor e ensinamentos.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais Nilson e Dina, que sempre me incentivaram nos estudos e me apoiaram ao longo da minha vida acadêmica.

Às irmãs Fanny, Marília e Camila pela amizade e cumplicidade.

Ao sobrinho Davi que transborda nossa família de amor e alegria.

Ao orientador professor Evaristo Mauro de Castro, pela paciência e conduta profissional.

Aos co-orientadores Alessandra Ribeiro e Warley Carvalho pelo auxílio em várias etapas do trabalho.

Aos professores e colegas do Departamento de Botânica Aplicada.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal, pelo convívio e auxílio no laboratório e no trabalho de campo.

Ao professor Warley Carvalho e aos colegas Márcio Paulo, Daniel Quedes, Mateus Pires, Fernando Cantão que me auxiliaram no trabalho de campo em Itamonte, MG.

Ao professor Yuri Zinn pelas importantes colaborações e disponibilidade.

Ao professor Marco Aurélio pela parceria e por conceder os dados do solo realizados na área de coleta.

Às colegas Aretha Guimarães e Polyanne Coelho, pela importante ajuda na estatística dos dados e com importantes discussões sobre ecologia.

Ao colega Vinícius Politti, sempre disposto a ajudar.

À aluna da Iniciação Científica Júlia Resende pela ajuda no laboratório.

Ao Paulinho e ao Instituto Alto Montana da Serra Fina.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, pela oportunidade de desenvolvimento do presente trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

Essa pesquisa teve como objetivo entender o sucesso adaptativo de indivíduos das espécies *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum pertencente à família Myrtaceae e *Pleroma estrelense* (Raddi) P.J.F.Guim. & Michelang da família Melastomataceae por meio das características anatômicas e fisiológicas ao longo de um gradiente altitudinal em uma floresta nebulosa. O gradiente compreendeu uma área de Reserva Particular do Patrimônio Natural, denominada RPPN Alto-Montana, e integra a Área de Preservação Ambiental da Serra da Mantiqueira, em Itamonte, MG. Essa área faz parte do Bioma Mata Atlântica, importante formação vegetacional que comporta inúmeras espécies endêmicas. No primeiro capítulo, avaliamos as características anatômicas e fisiológicas de indivíduos de *Pimenta pseudocaryophyllus*, em três cotas altitudinais (1500 m, 1900 m e 2100 m). É uma espécie com importância ambiental e cultural, bastante utilizada pela indústria farmacêutica devido às suas propriedades químicas. Por meio da análise de variância, verificou-se que as estruturas anatômicas variam significativamente ao longo do gradiente altitudinal. Para o segundo capítulo, avaliamos os indivíduos de *Pleroma estrelense*, e estudamos suas características anatômicas de folhas e do xilema secundário de galhos e as trocas gasosas, além de variáveis químicas e texturais do solo. As amostras foram coletadas nas cotas altitudinais 1500 m, 1700 m, 1900 m, 2100 m. Foram realizadas análises qualitativas e quantitativas das folhas, galhos e solo, em seguida utilizamos a análise de variância em todas as variáveis (estruturais, fisiológicas e solo). Somente as variáveis que apresentaram diferença significativa entre as cotas altitudinais foram utilizadas na construção dos modelos lineares. Os modelos mostraram o quanto as variáveis do solo afetaram as variáveis anatômicas e as trocas gasosas da espécie estudada e quais foram as variáveis anatômicas e fisiológicas mais afetadas dentro do modelo. Com os resultados, constatamos que a estrutura anatômica e fisiológica de *Pleroma estrelense* está diretamente relacionada à altitude, por agrupar importantes variáveis geográficas e climáticas. Além disso, o solo tem uma influência importante no desenvolvimento da espécie no decorrer das cotas altitudinais. Esses resultados auxiliam na compreensão da distribuição da espécie *Pleroma estrelense* em florestas nebulosas, auxiliando na compreensão de futuras respostas das plantas às mudanças ambientais.

Palavras-chave: Floresta nebulosa. Anatomia quantitativa. Espessura foliar.

ABSTRACT

This research aimed to understand the adaptive success of individuals of the species *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum and *Pleroma estrelense* (Raddi) P.J.F.Guim. & Michelang through anatomical and physiological features along an altitudinal gradient in a cloud forest. The gradient comprised an area of Private Reserve of Natural Heritage, called RPPN Alto-Montana, and is part of the Serra da Mantiqueira Environmental Preservation Area, in Itamonte, MG. This area is part of the Atlantic Forest Biome, an important plant formation that contains numerous endemic species. In the first chapter, we used the anatomical and physiological characteristics of individuals of the species *Pimenta pseudocaryophyllus*, belonging to the Myrtaceae family at three altitudes (1500 m, 1900 m, and 2100 m). It is a species with environmental and cultural importance, widely used by the pharmaceutical industry due to its chemical properties. Through analysis of variance, it was found that the anatomical structures vary significantly along the altitudinal gradient. For the second chapter, we used individuals of the species *Pleroma estrelense*, from the Melastomataceae family, and used their anatomical, physiological and hydraulic characteristics, as well as soil chemical properties and texture. Samples were collected at altitudes of 1500 m, 1700 m, 1900 m, and 2100 m. Qualitative and quantitative analyses of leaves, branches, and soil were performed, then we used analysis of the variance of all variables (structural, physiological and soil). Only the variables that showed a significant difference between the altitudes were used in the construction of the linear models. The models show how much soil properties affect the anatomical and physiological variables of the studied species and which anatomical and physiological variables were most affected within the model. The results suggest, that we found that the anatomical and physiological structure of the *Pleroma estrelense* species are directly related to altitude, as it synthesizes important geographic and climatic variables. In addition, the soil has an important influence on the development of the species along the altitudes. These results help to understand the distribution of the *Pleroma estrelense* in cloud forests, helping to understand future plant responses to environmental changes.

Keywords: Cloud forests. Quantitative anatomy. Leaf thickness.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	9
1 INTRODUÇÃO GERAL	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Floresta Nebular	11
2.2 Floresta Atlântica e a Serra da Mantiqueira	12
2.3 A família Myrtaceae	13
2.4 A família Melastomataceae	14
3 CONCLUSÃO	16
REFERÊNCIAS	17
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	21
ARTIGO 1 - Leaf anatomy and gas exchange of <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> in a montane cloudy forest gradient	21
ARTIGO 2- Relação entre as características anatômicas e trocas gasosas da espécie <i>Pleroma estrelense</i> e o solo em uma floresta nebulosa	45

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

Florestas nebulares são formações vegetacionais que se encontram em elevadas altitudes o que acaba propiciando a presença de constantes neblinas sobre a vegetação (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2012). Tais características climáticas propiciam atributos peculiares nas plantas, como: nanismo, folhas pequenas, coriáceas e pubescentes (SCHEER et al., 2011). As modificações ambientais que ocorrem em florestas nebulares estão relacionadas aos fatores abióticos presentes ao longo do gradiente altitudinal. Assim, as plantas evoluíram diversas adaptações para ter sucesso nesses ambientes (SCHERRER; KÖRNER, 2011).

Um fator que está relacionado às modificações anatômicas e a distribuição das espécies vegetais em florestas nebulares é o solo. Devido ao seu menor desenvolvimento e a baixa fertilidade característica de áreas de alta altitude, os solos presentes nessas áreas são menos férteis, o que influencia na absorção e fixação dos nutrientes pelas raízes e proporciona menor capacidade assimilativa das folhas, ou seja, na fotossíntese das plantas (TAKAHASHI; TANAKA, 2016).

Com intuito de compreender a distribuição das espécies arbóreas ao longo do gradiente altitudinal em uma floresta nebulosa, o laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras vem realizando trabalhos com anatomia vegetal em espécies arbóreas na Reserva Particular do Patrimônio Natural desde 2012. A região de estudo integra a Área de Preservação Ambiental da Serra da Mantiqueira, em Itamonte, MG. Essa área faz parte do Bioma Mata Atlântica, e o tipo de formação vegetal predominante é a floresta tropical densa de alto-montana. O grupo de pesquisa desenvolve trabalhos com anatomia vegetal a fim de entender como os mecanismos responsáveis pelas alterações na anatomia e fisiologia vegetal agem, podendo auxiliar no entendimento dos processos biológicos e evolutivos que ocorrem nas florestas nebulares.

Assim, esta tese está dividida em dois artigos. O primeiro, teve como objetivo caracterizar a anatomia e fisiologia das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum ao longo do gradiente altitudinal em três cotas (1500 m, 1900 m e 2100 m) na Serra de Mantiqueira em Itamonte, Minas Gerais. No segundo, faz-se uma análise das características anatômicas e fisiológicas das folhas e galhos de *Pleroma estrelense* (Raddi) P.J.F.Guim. & Michelang, bem como sua relação entre as variáveis edáficas ao longo do gradiente altitudinal.

Para isso, utilizamos as análises texturais e químicas do solo presentes nas quatro cotas altitudinais (1500 m, 1700 m, 1900 m e 2100 m) e correlacionamos com as variáveis anatômicas e fisiológicas da espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Floresta Nebular

Florestas nebulares também conhecidas como florestas alto-montanas são vegetações situadas em altas altitudes, o que proporciona frequentes nuvens e neblina ao nível da vegetação (IBGE, 2012; FAHEY et al., 2016). São encontradas em diferentes regiões do mundo, nas Américas, África, Ásia, Austrália e Oceania, geralmente entre 1200 e 2500 m de altitude (HEMP, 2010). No Brasil, as florestas nebulares ocorrem em altitudes superiores a 1000 m (IBGE, 2012).

As florestas nebulares situadas na floresta Atlântica, no Brasil, podem ser encontradas na Serra do Mar e na Serra da Mantiqueira (BERTONCELLO et al., 2011), na Serra Geral e Maciço Goiano (MEIRELES, 2009), além da Serra do Caparaó (CAMPOS et al., 2018) e do Espinhaço (SILVEIRA et al., 2016). As florestas nebulares situadas na Serra da Mantiqueira, apresentam uma grande quantidade de neblina na região, com aproximadamente 65 e 90% dos dias ao longo do ano (SEGADAS-VIANNA; DAU, 1965), com nevoeiros mais intensos entre os meses junho a setembro quando as massas polares são mais frequentes (SAFFORD, 1999).

O relevo íngreme facilita a ocorrência de chuvas orogênicas, que ocorrem quando massas de ar com muita umidade atingem áreas de montanha, propiciando a condensação e assim, a formação de chuvas no local (FAHEY et al., 2016). A alta nebulosidade presente nessas florestas causa efeitos climáticos no meio, tais como a condensação de vapor d'água, a redução da radiação solar incidente, a redução da evapotranspiração (FAHEY et al., 2016). Esses efeitos ambientais influenciam diretamente nas características das florestas nebulares à medida que a altitude aumenta, ocasionando em mudanças nas vegetações ao longo do gradiente altitudinal (DONATO; MORRETES, 2011).

As espécies vegetais presentes em florestas nebulares possuem tipicamente um porte menor, entre 5 e 12 m de altura, troncos tortuosos, as folhas geralmente coriáceas e uma grande abundância e diversidade de espécies epífitas (FALKENBERG, 2003). As espécies vegetais sofrem adaptações à medida que a altitude aumenta, favorecendo uma biodiversidade única, além de fornecer serviços ecossistêmicos, como água e armazenamento de carbono (PETITPIERRE, 2015).

As diferenças da comunidade vegetal ao longo do gradiente altitudinal são resultado das diferentes condições ambientais no meio (ZHANG et al., 2016), onde as condições abióticas mais severas restringem a quantidade de espécies tolerantes, e com isso poucas espécies se

mantêm nesses nichos ecológicos (TAKAHASHI; TANAKA, 2016). Assim, a similaridade entre as espécies é reduzida à medida que a distância espacial aumenta, influenciando em características de táxons de plantas e características na estrutura da planta em resposta aos gradientes ambientais, presentes nessas formações vegetais (BARTON et al., 2013).

As modificações que ocorrem ao longo do gradiente altitudinal na vegetação das florestas nebulares também estão associadas aos fatores edáficos, visto que as mudanças no relevo e topografia interferem nas características do solo, especialmente na profundidade e a reserva de nutrientes (SCHAEFER et al., 2012). O clima influencia o desenvolvimento do solo de várias formas, afetando principalmente o acúmulo de matéria orgânica e a formação de minerais de óxido de ferro (LALONDE et al., 2012). O solo presente em áreas elevadas geralmente se encontra com baixa fertilidade devido a seu menor desenvolvimento, que por sua vez, diminui a capacidade assimilativa das folhas, já que a clorofila e as enzimas fotossintéticas requerem grande quantidade de nitrogênio (ORDOÑEZ et al., 2009) e outros nutrientes, como o magnésio.

As florestas nebulares são ambientes mais resistentes à invasão biológica devido seu acesso limitado, relevo íngreme e temperaturas baixas (PETITPIERRE et al., 2015; ZEFFERMAN et al., 2015). Porém, as mudanças climáticas vêm alterando essa característica, o que facilita a entrada e permanência de espécies generalistas (PETITPIERRE et al., 2015; BENNETT et al., 2015). Invasões biológicas estão se tornando uma ameaça a essa biodiversidade única destes ambientes mais frios, bem como para seus importantes serviços ecossistêmicos (LENOIR; SYENNING, 2015). Além disso, os efeitos antropogênicos são ameaças importantes na conservação e manutenção da biodiversidade, ainda mais sob efeito de mudanças climáticas (ALLEN; BRADLEY, 2016).

À medida que a densidade populacional humana aumenta e com ela o fluxo das pessoas sobre o meio ambiente, aumentam as taxas de invasões de espécies em ambientes antes mais restritivos (PAUCHARD et al., 2016). Dessa forma, as florestas nebulares se encontram cada vez mais ameaçadas pelas mudanças climáticas, visto que um clima mais quente enfraquecerá algumas barreiras ambientais, facilitando a expansão de espécies invasoras nos ambientes mais altos (CARBONI et al., 2017).

2.2 Floresta Atlântica e a Serra da Mantiqueira

A floresta Atlântica encontra-se em vários Estados do Brasil, principalmente como matas ao longo da costa litorânea, desde o Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul.

Apresenta uma ampla variedade de vegetações que acompanham as características climáticas da região onde ocorrem, sendo: Floresta Ombrófila, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional Decidual, Floresta Estacional Semidecidual, Mangues e Restinga (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2018).

Esse bioma ocupava uma área equivalente a 1.110.182 Km², correspondendo a 15% do território brasileiro. Em consequência da antropização, bem como o uso da terra para agropecuária e o desmatamento para habitação, atualmente, restam apenas 12,4% de sua cobertura vegetal original, da qual existem, aproximadamente, 20.204 espécies de plantas, sendo 7.400 endêmicas (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2018).

A Serra da Mantiqueira é uma cadeia montanhosa que se estende por três Estados brasileiros, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, em maior proporção (COMITÊ DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DA SERRA DA MANTIQUEIRA, 2012). As características comuns dos solos na Serra da Mantiqueira em geral são o pouco desenvolvimento, altos teores de quartzo, e textura arenosa a franca. Como o material de origem, predominam os granitos e os gnaisses e rochas como migmatitos (BENITES et al., 2003). Os solos tipicamente possuem altos teores de alumínio trocável, sendo pobres em nutrientes e o acúmulo de matéria orgânica é geralmente maior em áreas de maior altitude, devido às menores temperaturas (BENITES, 2007). Essas propriedades do solo, bem como a pobreza de nutrientes, se dão devido ao moderado processo de intemperização, lixiviação acentuada e em consequência das altitudes e do relevo montanhoso, estas áreas apresentam alto índice de erosão (BENITES, 2007).

A Serra da Mantiqueira é conhecida por conter importantes cursos d'água, onde a área de drenagem pode chegar a 675 km². É uma região de importância econômica, predominando atividades relacionadas ao comércio, turismo e lazer (COMITÊ DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DA SERRA DA MANTIQUEIRA, 2012).

2.3 A família Myrtaceae

A família Myrtaceae compreende cerca de 130 gêneros de plantas com larga distribuição, entre América Tropical, Leste Asiático e Austrália (SOUZA; LORENZI, 2005). É conhecida como uma das famílias mais importantes de Angiospermas no Brasil e destaca-se pelo número e abundância de espécies. Existem 927 espécies distribuídas no país, sendo 707 endêmicas e grande parte encontra-se na floresta Atlântica (SOBRAL et al., 2009; SOBRAL et al., 2015).

A família Myrtaceae é conhecida por apresentar as seguintes características: árvores ou arbustos, folhas opostas, simples, translúcido-pontilhado, frutas em forma de bagas, podendo ter uma a várias sementes (LANDRUM; KAWASAKI, 1997). É muito comum as espécies dessa família serem confundidas com outras famílias de folhas opostas, quando as flores não estão presentes (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

Esta família abriga espécies capazes de suportar diversos graus de variação altitudinal, como *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, identificada na Serra da Mantiqueira por Bertonecello et al. (2011) e Pompeu et al. (2014). A espécie pode ser encontrada em diferentes tipos de vegetação, como: Campo de Altitude, Campo Rupestre, Cerrado, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila, Floresta Ombrófila Mista, Restinga e Mata Atlântica (SOBRAL et al., 2015; FLORA DO BRASIL, 2020).

Com ampla distribuição no Brasil, desde o Sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, *Pimenta pseudocaryophyllus* apresenta características anatômicas e fisiológicas que a permitem prosperar em diferentes gradientes ecológicos (Sobral et al., 2015; FLORA DO BRASIL, 2020). É conhecida popularmente como chá-de-bugre ou cravo-da-índia (FLORA DO BRASIL, 2020). Devido a riqueza de suas propriedades químicas, a espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* é bastante utilizada pela indústria farmacêutica na formulação de cosméticos, inseticidas e antifúngicos (ENOQUE et al., 2006; PAULA et al., 2008; FARIAS, 2009).

2.4 A família Melastomataceae

A família Melastomataceae possui cerca de 150 gêneros e 4.200 a 4.500 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais das Américas (RENNER et al., 2010). Possuem uma diversidade de hábitos de crescimento, incluindo árvores e arbustos em sua maioria e em menor parte por ervas, lianas e epífitas (RENNER, 1993). É considerada a quinta maior família de angiospermas no Brasil, com aproximadamente 899 espécies endêmicas, com ocorrência em todos os domínios fitogeográficos (FLORA DO BRASIL, 2020).

Sua ocorrência se dá em todo o território brasileiro, sendo comuns nos domínios da Amazônia, Cerrado e Floresta Atlântica (BAUMGRATZ et al., 2006; GOLDENBERG; BAUMGRATZ; SOUZA, 2012). É facilmente identificada por apresentar as folhas com venação acródroma, simples, decussadas, com inflorescências cimosas terminais ou laterais com flores períginas ou epíginas. O cálice geralmente é aberto no botão, simples ou duplo, com

pétalas brancas, róseas, violáceas, roxas, púrpura ou magenta. O fruto possui cápsula loculicida ou baga, e as sementes em geral são numerosas (RENNER, 1993).

Tibouchina estrellensis (Raddi) Cogn. sinonímia *Pleroma estrelense* (Raddi) P.J.F.Guim. & Michelang pertence a família Melastomataceae, possui ampla distribuição entre os Estados brasileiros do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, com ocorrência na floresta Atlântica (FLORA DO BRASIL, 2020). Podem ser encontradas tanto em morros quanto em formações aluviais (BAUMGRATZ et al., 2006). Suas folhas na face adaxial, possuem superfície bulado-escabra, com tricomas adpresso-ramificados na sua base, enquanto que na face abaxial é foveolada com tricomas estrelados em sua base (GUIMARÃES; MARTINS, 1997). É uma espécie endêmica do Brasil, podendo ser encontrada em florestas nebulares, arbustal, pastagens e brejos (GUIMARÃES, 2016). Tem importância ecológica, e por ser uma espécie pioneira é indicada para a restauração de florestas em diversas regiões do Estado de São Paulo (BARBOSA et al., 2017).

3 CONCLUSÃO

A altitude está diretamente relacionada com as modificações anatômicas e fisiológicas nas espécies presentes em florestas nebulares, modificações estas que podem influenciar nas estruturas das folhas e galhos das espécies presentes nesses ambientes. Apesar da importância ecológica que essas áreas representam, ainda são poucos os trabalhos anatômicos realizados em espécies vegetais em florestas de altitude no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, J. M.; LEMBRECHTS, J. J.; CAVIERES, L. A.; DAEHLER, C.; HAIDER, S.; KUEFFER, C.; LIU, G.; MCDOUGALL, K.; MILBAU, A.; PAUCHARD, A. Plant invasions into mountains and alpine ecosystems: current status and future challenges. **Alpine Botany**, 126, 89 - 103.2016.
- ALLEN, J. M.; BRADLEY, B. A. Out of the weeds? Reduced plant invasion risk with climate change in the continental United States. **Biol. Conserv.**, 203, pp. 306-312, 2016.
- BARBOSA, L. M.; SHIRASUNA, R. T.; LIMA, F. C. ORTIZ, P. R. T. Lista de espécies indicadas para restauração ecológica para diversas regiões do Estado de São Paulo. **São Paulo: Instituto de Botânica**, 2017. 344 p.
- BARTON O. S.; CUNNINGHAM A. S.; MANNING A. D; GIBB H; LINDENMAYER D.B.; DIDHAM R.K. The spatial scaling of beta diversity. **Global Ecol Biogeogr.** 22(6):639–647, 2013.
- BAUMGRATZ; J. F.; SOUZA, M. L.; CARRAÇA, D.C.; ABBAS, B.D. Melastomataceae na Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil: aspectos florísticos e taxonômicos. **Rodriguésia.** 57. 591-646. 10.1590/2175-7860200657313, 2006.
- BENITES, V.; CAIAFA, A.; MENDONÇA, E.; SCHAEFER, C.; Ker, J. Solos e vegetação nos Complexos Rupestres de Altitude da Mantiqueira e do Espinhaço. **Floresta e Ambiente.** vol.10, n1, p.76-85, 2003.
- BENITES V. M.; SCHAEFER C. E. G. R.; SIMAS F. N. B.; SANTOS H.G. 2007. Soils associated with rock outcrops in the Brazilian mountain ranges Mantiqueira and Espinhaço. **Rev Bras Bot** 30: 569-577, 2007.
- BENNETT J. R.; SHAW J. D.; TERAUDS A.; SMOL J. P.; AERTS R.; BERGSTROM D. M.; BLAIS J. M.; CHEUNG W. W. L.; CHOWN S. L.; LEA M-A.; NIELSEN UM.; PAULY D.; BERTONCELLO, R.; YAMAMOTO, K.; MEIRELES, L.D.; SHEPHERD, G. J. Aphytogeographic analysis of cloud forests and other forest subtypes amidst the Atlantic forests in south and southeast Brazil. **Biodivers Conserv** 20, 3413–3433, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10531-011-0129-6>.
- BRESSON C. C.; VITASSE Y.; KREMER A.; DELZON S. To what extent is altitudinal variation of functional traits driven by genetic adaptation in European oak and beech? **Tree Physiology.** 2011. 00, 1–11.
- CAMPOS, P.V.; VILLA, P.M.; NUNES, J.A.; SCHAEFER, C. E.G.R.; POREMBSKI, S.; NERI, A. V. Plant diversity and community structure of Brazilian Páramos. **Journal of Mountain Science.** 15, 1186–1198 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11629-017-4674-7>
- CARBONI, M.; GUÉGUEN, M.; BARROS, C.; GEORGES, D.; BOULANGEAT, I.; DOUZET, R.; DULLINGER, S.; KLONNER, G.; VAN KLEUNEN, M.; ESSL, F.; BOSSDORF, O.; HAEUSER, E.; TALLUTO, M.V.; MOSER, D.; BLOCK, S.; CONTI, L.; DULLINGER, I.; MÜNKEMÜLLER, T.; THUILLER, W. Simulating plant invasion dynamics in mountain ecosystems under global change scenarios. **Global Change Biology**, (Orcid ID : 0000-0003-4036-977X), 2017.

COMITÊ DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DA SERRA DA MANTIQUEIRA - CBH-SM. Plano de Bacias Hidrográficas da Serra da Mantiqueira (UGRHI-1). São Paulo, 2012. p.354.

DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. Morfo-anatomia foliar de *Myrcia multiflora* (Lam.) DC. – Myrtaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.1, p.43-51, 2011.

ENOQUE, M.; LIMA, L.; CORDEIRO, I.; CLÁUDIA, M.; MARX YOUNG, M. C.; SOBRA, M.; MORENO, P. Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo state – Brazil. **Pharmacology online**, Salerno, vol. 3, p. 589-593, 2006.

FAHEY, T. J.; SHERMAN, R. E.; TANNER, E. V. Tropical montane cloud forest: environmental drivers of vegetation structure and ecosystem function. **Journal of Tropical Ecology**, v.32, n.5, p. 355-367, 2016.

FALKENBERG D. B. **Matinhas nebulares e vegetação rupícola dos Aparados da Serra Geral (SC/RS), sul do Brasil**. 2003. 558 p. Tese de Doutorado. UNICAMP, Campinas/SP – Brasil.

FARIAS, V. DE; ROCHA, L. D.; PREUSSLER, K. H.; MARANHO, L. T. Leaf structural organization of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) LR Landrum, Myrtaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 398– 406, 2009.

FLORA DO BRASIL 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB606917>>. Acesso em: 24 jan. 2021

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (Brasil). **Atlas dos remanescentes florestais da mata atlântica período 2016-2017**. Relatório Técnico. São Paulo, 2018. 63 p.

GOLDENBERG, R.; BAUMGRATZ, J.; SOUZA, M. Taxonomia de Melastomataceae no Brasil: retrospectiva, perspectivas e chave de identificação para os gêneros. **Rodriguésia** 63(1): 145-161, 2012. <http://rodriguesia.jbrj.gov.br>.

GUIMARÃES, P. J. F.; MARTINS, A. *Tibouchina* sect. *Pleroma* (D. Don) Cogn. (Melastomataceae) no estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Botany**. 20. 11-33. 10.1590/S0100-84041997000100002. 1997.

GUIMARÃES, P.J.F. *Tibouchina*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB9876> >. Acesso em 18 Jan. 2020.

HEMP, A. Altitudinal zonation and diversity patterns in the forests of Mount Kilimanjaro, Tanzania. In **Tropical Montane Cloud Forests: Science for Conservation and Management**, Bruijnzeel LA, Scatena FN, Hamilton LS (eds). Cambridge University Press: Cambridge, UK; 134–141, 2010.

IBGE. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro, 2012. 271 p.

LALONDE K.; MUCCI A.; OUELLET A.; GÉLINAS Y. Preservation of organic matter in sediments promoted by iron. **Nature**. 2012.483(7388):198-200.
<https://doi.org/10.1038/nature10855>. 2012.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia** 49, 508–536, 1997.
<https://doi.org/10.2307/2807742>.

LENOIR J.; SVENNING J.C. Climate-related range shifts—towards a comprehensive research framework. **Ecography** 38:15–28. 2015.

MEIRELES, L. D. **Estudos florísticos, fitossociológicos e fitogeográficos em formações vegetacionais altimontanas na Serra da Mantiqueira meridional, sudeste do Brasil**. 2009. 262 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

ORDOÑEZ J. C.; VAN BODEGOM P. M.; WITTE J. P. M.; WRIGHT I. J.; REICH P. B.; AERTS R. A global study of relationships between leaf traits, climate and soil measures of nutrient fertility. **Glob Ecol Biogeogr** 18:137–149. 2009.

PAUCHARD, A., MILBAU, A., ALBIHN, A., ALEXANDER, J., BURGESS, T., DAEHLER, C., ENGLUND, G., ESSL, F., EVENGÅRD, B., GREENWOOD, G. B., HAIDER, S., LENOIR, J., MCDOUGALL, K., MUTHS, E., NUÑEZ, M. A., OLOFSSON, J., PELLISSIER, L., RABITSCH, W., REW, L. J., KUEFFER, C. Non-native and native organisms moving into high elevation and high latitude ecosystems in an era of climate change: new challenges for ecology and conservation. **Biological Invasions**, 18(2), 345–353.
<https://doi.org/10.1007/s10530-015-1025-x>. 2016.

PAULA, J. A.; PAULA, J. R.; BARA, M. T.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D. Pharmacognostic study about *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) LR Landrum leaves-Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 265–278, 2008.

PETITPIERRE B.; MACDOUGALL K.; SEIPEL T.; BROENNIMANN O.; GUISAN A.; KUEFFER C. Will climate change increase the risk of plant invasions into mountains? **Ecol Appl**. doi:10.1890/14-1871.1. 2015.

POMPEU, P. V.; FONTES, M. A. L.; SANTOS, R. M. DOS; et al. Floristic composition and structure of an upper montane cloud forest in the Serra da Mantiqueira Mountain Range of Brazil. **Acta Botanica Brasílica**, v. 28, n. 3, p. 456–464, 2014.

REIMER K. J.; RIDDLE M. J.; SNAPE I.; STARK J.S.; TULLOCH V.J.; POSSINGHAM H.P. Polar lessons learned: long-term management based on shared threats in Arctic and Antarctic environments. **Front Ecol Environ** 13:316–324, 2015.

RENNER, S. S. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. - **Nord. J. Bot.** 13: 519-540. Copenhagen. ISSN 0107-055X, 1993.

RENNER, S. S.; TRIEBEL, D.; ALMEDA, F.; STONE, D.; ULLOA, C. U.; MICHELANGELI, F.A.; GOLDENBERG, R.; CIFUENTES, H. M. MELASTOMATACEAE.NET. 2010. **A site with information on the biodiversity of Melastomataceae**. Disponível em <www.melastomataceae.net>.

SAFFORD H. D. Brazilian Paramos I. An introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. **Journal of Biogeography** 26: 693–712. 1999.

SCHAEFER, C. E. G. R.; MENDONÇA, B. A. F.; FERREIRA JR., W. G.; VALENTE, E. L.; CORRÊA, G. R. Relações solo-vegetação em alguns ambientes brasileiros: Fatores edáficos e florística. In: MARTINS, S. V. **Ecologia de Florestas Tropicais do Brasil**. 2.ed. Viçosa: UFV, p. 252-293, 2012.

SCHEER M. B.; CURCIO, G. R.; RODERJAN, C. V. Funcionalidades ambientais de solos altomontanos na Serra da Igreja, Paraná. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. **35**, n. 4, p. 1113-1126. 2011.

SCHERRER, D.; KÖRNER, C. Topographically controlled thermal-habitat differentiation buffers alpine plant diversity against climate warming. *J Biogeogr* 38:406–416. 2011.

SEGADAS-VIANNA F. & DAU L. Ecology of the Itatiaia range, Southeastern Brazil. II – Climates. **Arq. Museu Nacional** 53: 31-53. 1965.

SILVEIRA, F. A. O.; NEGREIROS, D.; BARBOSA, N. P. U.; BUISSON, E.; CARMO, F. F.; CARSTENSEN, D. W.; CONCEIÇÃO, A. A.; CORNELISSEN, T. G.; ECHTERNACHT, L.; FERNANDES, G. W.; GARCIA, Q. S.; GUERRA, T. J.; JACOBI, C. M.; LEMOS-FILHO, J. P.; LE STRADIC, S.; MORELLATO, L. P. C.; NEVES, F. S.; OLIVEIRA, R. S.; SCHAEFER, C. E.; VIANA, PEDRO L.; LAMBERS, H. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. **Plant Soil**, 403, 129–152 . <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2637-8>. 2016.

SOBRAL, M.; LUCAS, E.; LANDRUM, L.; SOARES-SILVA, L. Myrtaceae in Stheman, J.; R. forzza, R. C.; Salino, A.; Sobral, M.; Costa, D.P. e Kamino, L.H.Y. *Plantas da Floresta Atlântica*. **Rio de Janeiro**, pp. 352-366, 2009.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10823>>. 2015.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica sistemática*. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**. 640p, 2005.

TAKAHASHI K.; TANAKA S. Relative importance of habitat filtering and limiting similarity on species assemblages of alpine and subalpine plant communities. **Journal of Plant Research** 129: 1041– 1049. 2016.

ZEFFERMAN E.; STEVENS J. T.; CHARLES G. K.; DUNBAR-IRWIN M.; EMAM T.; FICK S.; MORALES L.V.; WOLF K. M.; YOUNG D. J.; YOUNG T. P. Plant communities in harsh sites are less invaded: a summary of observations and proposed explanations. **AoB Plants** 22;7. doi: 10.1093/aobpla/plv056. 2015.

ZHANG W.; HUANG D.; WANG R, L. J.; DU N. Altitudinal patterns of species diversity and phylogenetic diversity across temperate mountain forests of Northern China. **PloS One** 11: e0159995. 2016.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

**ARTIGO 1 - Leaf anatomy and gas exchange of *Pimenta pseudocaryophyllus* in a
montane cloudy forest gradient**

(VERSÃO PRELIMINAR)

**Artigo formatado conforme as normas para submissão da revista *South African Journal
of Botany*.**

Leaf anatomy and gas exchange of *Pimenta pseudocaryophyllus* in a montane cloudy forest gradient.

ABSTRACT

Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) L.R. Landrum is of considerable economic and ecological importance, with potential for use by the pharmaceutical industry. It is one of the few species capable of withstanding ample altitudinal variation due to its plasticity in anatomical and physiological characteristics. The objective of this work was to assess the influence of altitude on adaptive resources of *Pimenta pseudocaryophyllus*, distributed along an altitudinal gradient (1500, 1900 and 2100 m of altitude) in tropical montane cloud forests. Leaf gas exchange analysis was performed using an IRGA, and collected leaves were fixed and prepared following the usual procedures of plant tissue microscopy. The stomatal density was lower at 1500 m and higher at 2100 m. Photosynthesis and transpiration were higher at 2100 m altitude, while stomatal conductance was higher at 1500 m. The variations in the plant's anatomy and physiology can be a strategy for occupying those environments.

Keyword: Tropical montane cloud forest, mesophyll, chá-de-bugre

1. Introduction

Tropical montane cloud forests (TMCF) can be found in altitudes that range from 1000m to 2500m above sea level and are constantly subjected to fog, which conveys an additional water source for the plants inhabiting these forests (Fahey et al., 2016). In TMCFs, it is common to occur low-level clouds that contribute to the precipitation (Los et al., 2021), increasing the air's relative humidity and decreasing the solar radiation (Hamilton et al., 1995). When the clouds are absent, the increase in solar radiation becomes hostile to the vegetation due to high rates of evapotranspiration (Leuschner, 2000; Jones, 2013).

Altitude increases are important to TMCF because this is a variable that synthesizes other ecologically relevant variables such as humidity, precipitation, cloud cover, solar radiation and also soil properties, which are modified along an altitudinal gradient (Körner, 2007; Malhi et al., 2010; Gastauer et al., 2020). In this sense, increases in the altitudinal gradient can lead to changes in the environmental conditions and, consequently, in the vegetation, such as decreased tree's height, increased density of individuals, increased endemism rates and decreases in the species richness due to the strong selective filter in TMCFs (Webster, 1995; Oliveira-Filho and Fontes 2000; Alves et al., 2010; Rezende et al., 2015). Plants growing in TMCFs are directly affected by the harsh environmental conditions in those forests and tend to display direct influences on its anatomical and physiological characteristics, which favours peculiar characteristics (Barry, 1981; Fahey et al., 2016).

In Brazil, the TMCFs can be found in montane regions in the south and southwest of the country such as the Mantiqueira Range. The Mantiqueira Range is an important mountain range that extends through the States of Minas Gerais, São Paulo and Rio de Janeiro, and occurs inside the Atlantic Forest Domain, covering an area of approximately 4.074 km² of cloudy forests. Those altitudinal forests have great ecological importance because they harbour high rates of endemic species, contributing to maintaining the quality of the water and they are also a place that shelters a lot of headwaters of many important rivers (Hamilton et al., 1995; Bruijnzeel and Veneklaas, 1998; Bruijnzeel, 2000; Oliveira Filho et al., 2004). The TMCFs are now threatened due to a myriad of anthropic activities that destroy the Atlantic Forest, reducing its original forested area to a few sparse and isolated fragments (MMA, 2014). Also, only 17.5% of the area of the Mantiqueira Range is being protected as a Protected Area (PA) (Pompeu et al., 2018), a fact that makes those forests extremely vulnerable.

The Myrtaceae family is one of the families with the greatest diversity of highland forest species (Higuchi et al., 2013; Marcon et al., 2014). Myrtaceae is a botanical family with a wide

distribution range and can be found in tropical regions as well as subtropical areas, in forests along the whole South America, Australia, Africa and southeast region of Asia (Flora do Brasil, 2020). This family contains individuals capable of supporting different altitudes, such as the species *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum 1984, identified in Serra da Mantiqueira Range by Bertonecello et al. (2011) and Pompeu et al. (2014). *P. pseudocaryophyllus* is of great economic and ecological importance because this species has a great potential to be used by the pharmacy industry. The species has several chemical properties associated with its essential oils, as well as a cosmetic, insecticide, antibiotic and antifungal properties (Enoque et al., 2006; Paula et al., 2008; Farias, 2009). The species also display a wide distribution range in Brazil because it is a plastic species, presenting anatomical and physiological characteristics that allow the species to thrive in different ecological gradients (Sobral et al., 2015; Flora do Brasil, 2020).

Even though there's been a great effort from scientists to study the species that inhabit areas of altitudinal gradients, there's still a gap concerning the TMCs, particularly flagrant regarding endemic plants and their anatomy and physiology. It is urgent to increase the number of studies to understand those species morphology and physiology, associating the plants' distribution and the environment to understand how changes in the altitudinal gradients might affect those plants. Our study aims to fill a part of this gap by characterizing the anatomy and physiology from the leaves of the species *P. pseudocaryophyllus*. We investigated which anatomical and physiological adaptations allow this species to thrive in different altitudinal gradients. The following questions motivated our study: the individuals from *P. pseudocaryophyllus* experience intraspecific variation along the altitudinal gradients? Is there any relation between this plants stomatal density and the different altitudinal gradients? How the difference in the altitudinal gradient affects the anatomy and physiology of the species *P. pseudocaryophyllus*?

We hypothesize that *P. pseudocaryophyllus* trees at higher altitudes (1900m and 2100m) will present anatomical characteristics with a tendency to xeromorphism and dwarfism, while trees from the same species at lower altitudes (1500m) won't present those characteristics. We expect that plants at higher altitudes will have thicker leaves with a higher amount of trichomes as a strategy to deal with the low temperatures and constant wind in those regions. We also expect that this difference will be related to the environmental characteristics that are present in the altitudinal gradient (temperature, sunlight exposition, wind and water availability from the clouds).

2. Materials & methods

2.1 Study area

This study was carried at the Reserve of Private Natural Patrimony (Reserva Particular do Patrimônio Natural – RPPN Alto Montana) Montane Forest in Itamonte, Minas Gerais, in the Atlantic Forest Domain, Brazil. This Reserve is located between the States of Minas Gerais, Rio de Janeiro and São Paulo, under the coordinates 22°21'55 "S and 44 ° 48'32" W (Figure 1). The RPPN is composed of 672 ha of forest and continuous mountains, with an altitude that varies from 2100 to 2400m, and this area is continuous to the National Park of Itatiaia. The main vegetation in this region is the Dense High Montane Tropical Forest (IBGE, 2012), and can also be classified as broad-leaved perennial nebular super montane tropical forest, according to Oliveira-Filho (2009). The climate in the region is the Cwb of Köppen, with temperate humid summers and dry winters (Sá Júnior et al., 2012), the mean annual temperature varies from 17.4°C to 19.8°C, mean annual precipitation of 1.749 mm, and the soils are predominately Inceptisols (Pane and Pereira, 2005).

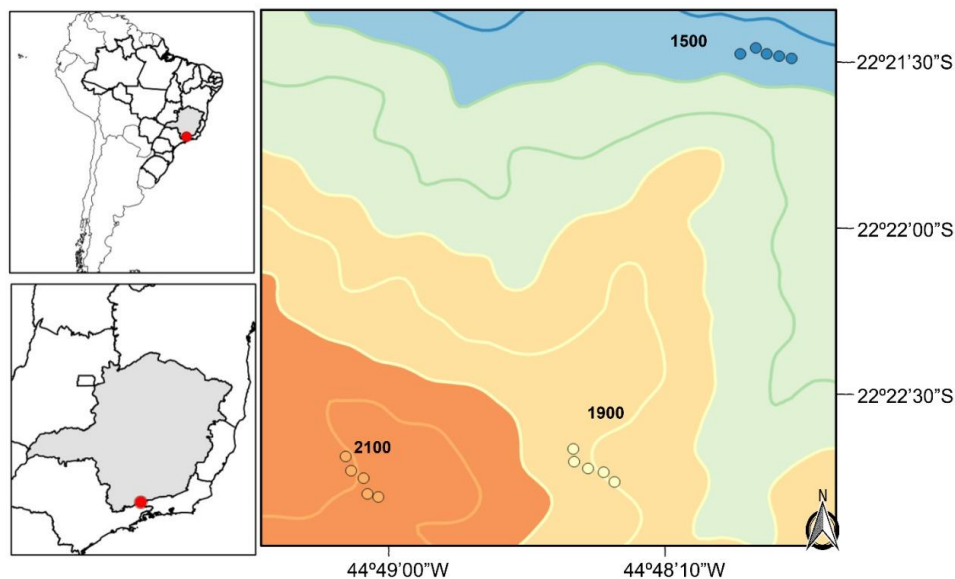


Fig. 1. Map from the study area showing the distribution of the altitudinal range at the Reserve of Private Natural Patrimony (Reserva Particular do Patrimônio Natural – RPPN Alto Montana) Montane Forest in Itamonte, Minas Gerais, in the Atlantic Domain, Brazil. The reserve is located between the States of Minas Gerais, Rio de Janeiro and São Paulo.

2.2 Sampling design and data collection

We chose *P. pseudocaryophyllus* in our study because it is a species that is capable to adapt and survive along the altitudinal gradient in the forests of the Serra da Matiqueira Range, experiencing the environmental and climatic variations caused by changes in altitude. We sampled five fully developed *Pimenta pseudocaryophyllus* trees in three different altitudes above sea level: 1500m, 1900m and 2100m). For each individual, we sampled 20 fully expanded leaves with good phytosanitary conditions, next to the plant stalk to evaluate the anatomical characteristics and gas exchange. The exsiccates were placed at the herbarium ESAL from Federal University of Lavras (Universidade Federal de Lavras) under the reference number 32,219.

2.3 Leaf anatomy and leaf micromorphometry

We fixed the fresh leaves samples in an F.A.A. solution at 70% concentration (Formaldehyde Alcohol Acetic Acid using the proportion of 1:1:18) for 72h and then placed them in an ethanol solution with 70% concentration until the samples were analysed. All the analyses were carried at the Vegetal Anatomy Laboratory (Laboratório de Anatomia Vegetal) from the Department of Biology at Federal University of Lavras (UFLA).

We utilized the method proposed by Jeffrey to dissociate the leaf epidermis, where the mesophyll was immersed in a mixture of chromic acid at a 10% concentration and nitric acid at 10% concentration for 24h (Johansen, 1940).

The anatomical slides were photographed using a camera Zeiss Axis Cam Erc 5s coupled to an optic microscope (Zeiss Microimaging, Heidelberg, Germany). We evaluated: stomatal density (number of stomata per mm²) and functionality (stomatal polar diameter/stomatal equatorial diameter) according to using the methodology proposed by Pereira et al. (2011). We utilized the protocol proposed by Johansen (1940) to perform the transversal sections, where the leaves were submitted to serial ethanol dehydration (70%, 80%, 90% and 100%, respectively). After that process, the leaves were then immersed in a pre-infiltration solution composed of 100% of ethanol and base resin (1:1) for 24h according to the manufacturer instructions (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Then we performed the infiltration using a BSE resin for 72h at 4°C. The transversal sections from the medium part of the leaves were sectioned using a rotational semi-automatic microtome model YD-335 (Jinhua Yidi Medical Appliance CO., LTD, Zhejiang, China) with a thickness of 8 to 10 µm, dyed with a solution of 1% concentration of toluidine blue (Feder and O'Brien, 1968). The anatomical

slides were then photographed using a camera model Zeiss Axis Cam Erc 5s coupled to an optic microscope (Zeiss Microimaging, Heidelberg, Germany). All the micromorphometry analysis was carried out using the software Image J.

To study the leaf surface from *P. pseudocaryophyllus* we used an electronic microscope, prepared the samples from 3 different altitudes and fixated them with a Karnovisc solution to perform the anatomical cuts. The analyses were carried at the Laboratory of Eletronic Microscopy and Ultrastructure Analysis (Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural) from the Phytopathology Department at Federal University of Lavras (Universidade Federal de Lavras). We then washed the samples using a solution of sodium cacodylate in a concentration of 0.05 M three times, 10 minutes each and post-fixated the samples at 1% osmium tetroxide solution (OsO_4) for 4h. After that, we dissected the samples in crescent series with acetone (25%, 50%, 75%, 90% and 100%, three times for ten minutes each), submitted to a critical point of dissection of CO_2 . The samples were finally analyzed using a Scanning Electron Microscopy (LEO EVO 40 XVP). The leaf area (mm^2) was analyzed by digitalizing the fresh leaves and then processing them using the software Image J.

2.4 Gas exchange

We measured the leaf gas exchange in the field, using 2 leaves per individual of *P. pseudocaryophyllus*, and we utilized the mean values from the 2 readings to calculate the individual leaf gas exchange for each tree. The leaf gas exchange analysis was performed using an IRGA model LI-6400XT (Li-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, SA), with a camera of 6cm^2 and LED light red/blue (LI-6400-02B, Li-Cor, Lincoln, Nebraska, EUA). All the measurements were evaluated in the mean portion of the fully expanded leaves, and were performed between 8 am to 11 am. The density of flux of photons photosynthetically active (PPFD) was standardized at $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. We evaluated the liquid photosynthetic rate (A), stomatal conductance (gs), transpiration rate (E) and water use efficiency.

2.5 Data analysis

We tested the normality of the data using the Shapiro-Wilk test at 5% of significance and then proceeded by using a one-way analysis of variance (ANOVA) or Kruskal Wallis test. Whenever data fitted the normality patterns, we proceeded by using a Tukey test, and when they didn't fit the normality, we utilized Dunn Tests. All analyses were carried using the software R studio version 4.0.3 (Team 2020).

3. Results

The leaves from *P. pseudocaryophyllus*, present their adaxial epidermis with glabrous structures, with anticlinal ticked straight cells that can vary to slightly sinuous (Figure 2). The abaxial epidermis has trichomes, with lots of unicellular elongated tector trichomes (Figure 3) and a great amount of anomocytic stomata, surrounded by 3 to 6 epidermic cells (Figure 4). They can be classified as hypostomatic due to the presence of stomata in the abaxial surface of the leaves of *P. pseudocaryophyllus*. Internally below the adaxial epidermis, there's a hypoderm composed of one to two layers of cells, which present higher volume when compared to the cells that compose the epidermis. There were no differences between those cells in the three different altitudes analysed in our study (Figure 5, Supplementary Table 1). The mesophyll is composed of chlorophyll parenchyma cells that are divided into palisade parenchyma and spongy parenchyma. The cells in the palisade parenchyma present a columnar morphology and can vary from one to two layers, while the spongy parenchyma presented variable morphology with lots of intercellular space. *P. Pseudocaryophyllus* leaves presented a uniseriate epidermis in both adaxial and abaxial layers and the dorsiventral mesophyll (Figure 5). We also found calcium oxalate crystals in the form of drusen in the leaves mesophyll.

There was no difference between the adaxial and abaxial epidermis for the individuals of *P. pseudocaryophyllus* in the altitudinal gradient analysed in our study. The epidermis cells showed a cuticle layer in both layers (adaxial and abaxial), but there was no difference in cuticle thickness in the altitudinal gradient. There was also no difference for the spongy parenchyma thickness, leaf thickness and stomatal polar diameter for the altitudinal gradient analysed in our study. There was a significant difference for the palisade parenchyma, where the 2100m altitude presented lower values than 1500m and 1900m (Figure 7, supplementary tables 1 and 2). The leaf area was also higher at lower altitudes (1500m) and decreased with increasing altitude (2100m with lower values of leaf area) (Figure 8, supplementary tables 1 and 2). The stomatal density was higher at higher altitudes (Figure 9), and the stomatal equatorial diameter was also higher at 1500m altitude and lower at 1900m altitude (Figure 10, supplementary tables 1 and 2). Stomatal functionality was higher at 1900m and lower at 1500m altitude (Figure 11, supplementary tables 1 and 2).

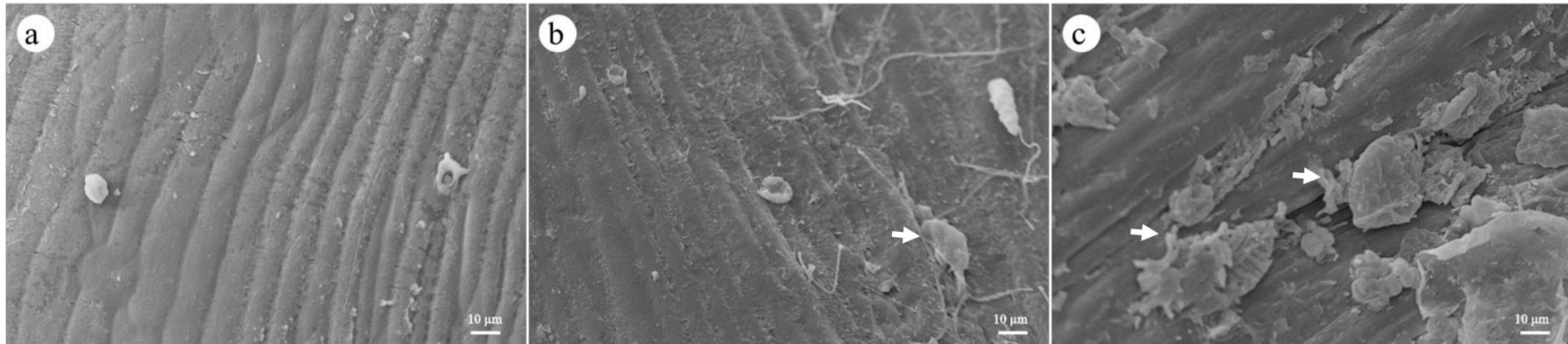


Fig. 2. Scanning electron microscopy of the adaxial epidermis of *P. pseudocaryophyllus* 1500 m (a), 1900 m (b), 2100 m (c) in altitude in a Tropical montane cloud forest in Itamonte, MG, Brazil. Bars: 10µm. Arrows indicate the waxes.

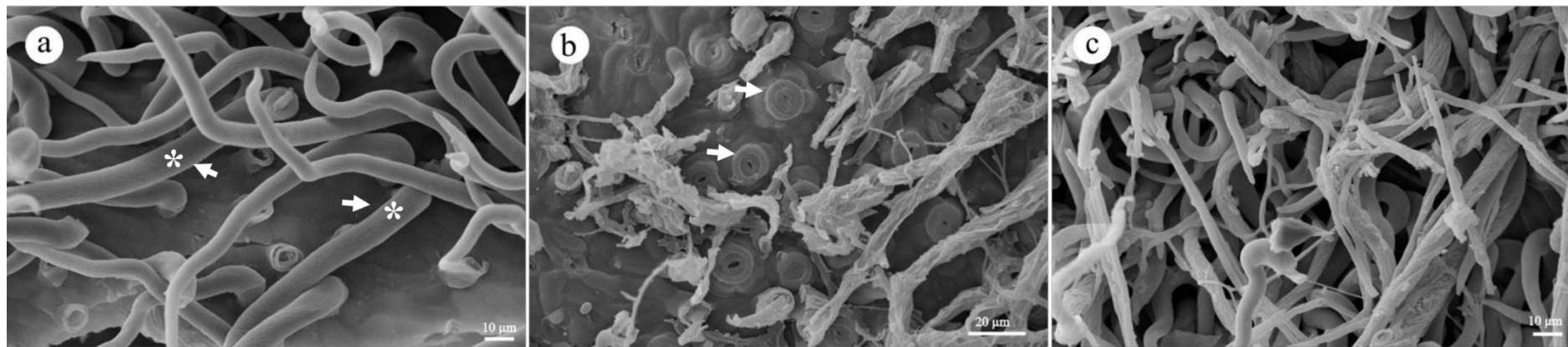


Fig. 3. Tector Trichome and stomata abaxial epidermis of *P. pseudocaryophyllus* 1500 m (a), 1900 m (b), 2100 m (c) in altitude in a Tropical montane cloud forest in Itamonte, MG, Brazil. Bars: 10µm and 20µm. Arrow indicate tector trichomes and stomata.

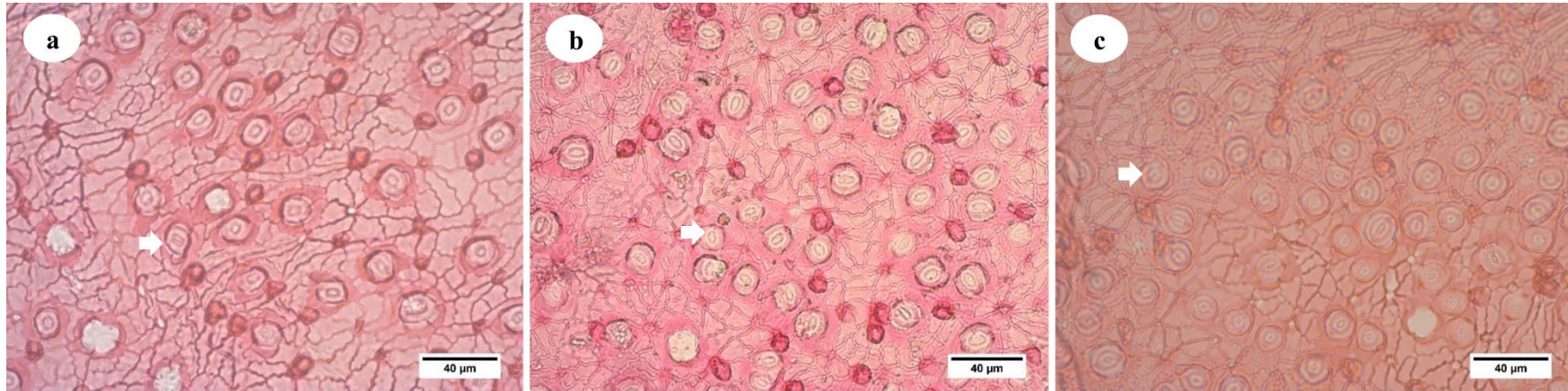


Fig. 4. Stomata in the abaxial epidermis of *P. pseudocaryophyllus* 1500 m (a), 1900 m (b), 2100 m (c) in altitude in a Tropical montane cloud forest in Itamonte, MG, Brazil. Bars: 40µm. Arrow indicate stomata.

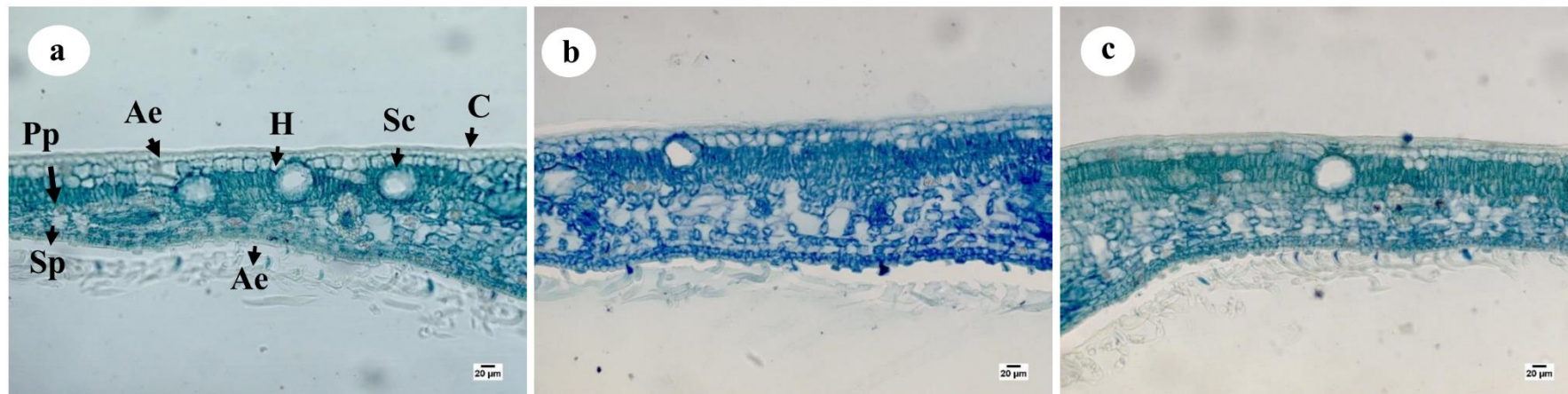


Fig. 5. Cross-section of a leaf of *P. pseudocaryophyllus* 1500 m (a), 1900 m (b), 2100 m (c) in altitude in a Tropical montane cloud forest in Itamonte, MG, Brazil. Bars: 20µm. Pp= palisade parenchyma, Sp= Spongy parenchyma, Ade= Adaxial epidermis, Abe= Abaxial epidermis, H= Hipoermis, Sc= Secretory channels, C=Cuticle.

The central vein in *P. pseudocaryophyllus* is composed of a layer of epidemic cells with a spherical and isodiametric shape. The vascular bundles are bilateral and surrounded by fundamental parenchyma, with no trichomes, while the sclerenchyma fibres that surround the vascular bundle are closed (Figure 6). The area from the central vein is different between the altitudes 1500m and 2100m (higher in the first altitude) (Figure 6, Supplementary tables 1 e 2). The phloem is continuously distributed along the xylem, and this pattern has already been described for the leaves of *P. pseudocaryophyllus*, (Farmacopéia Brasileira IV, 2002 and 2003). The xylem area differed among the altitudinal gradient, with lower values for the 2100m altitude (Figure 6, figure 13, Supplementary tables 1 e 2). There was no difference between the phloem area in the altitudinal gradients analyzed in our study (Supplementary Table 1). We also found secretory channels in the central vein and the edge of the mesophyll in both faces (adaxial and abaxial), with a higher number of them in the adaxial layer. Those structures were spherical and were delimited by flat cells, as described by Metcalfe and Chalk (1979) (Figures 5 and 6).

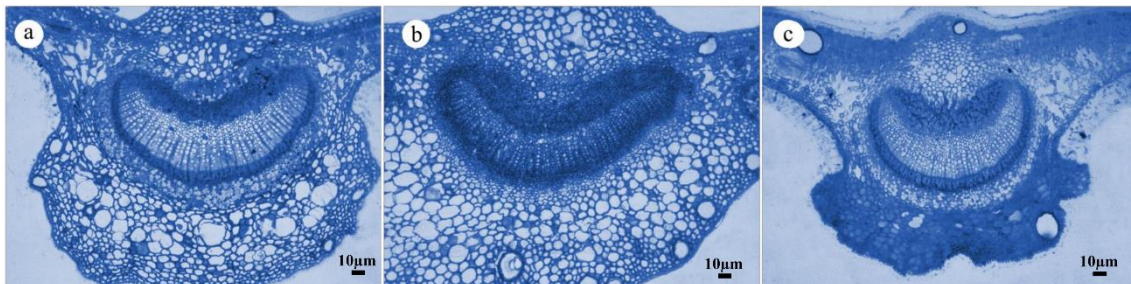


Fig. 1. The central vein of *P. pseudocaryophyllus* 1500 m (a), 1900 m (b), 2100 m (c) in altitude in a Tropical montane cloud forest in Itamonte, MG, Brazil. Bars: 10µm

We found a significant difference for the gas exchange, as well as photosynthesis and stomatal conductance in the altitudinal gradient. The photosynthetic rate (A) was higher at 1500m altitude when compared to 1900m and 2100m (Figure 15). The stomatal conductance (gs) was different in all the altitudes analysed in our study, with higher values at 1500m and lower values at 2100m altitude. The transpiration rate (E) and water use efficiency were not different in the altitudinal gradient analysed in our study (Figure 14, supplementary tables 1 and 2).

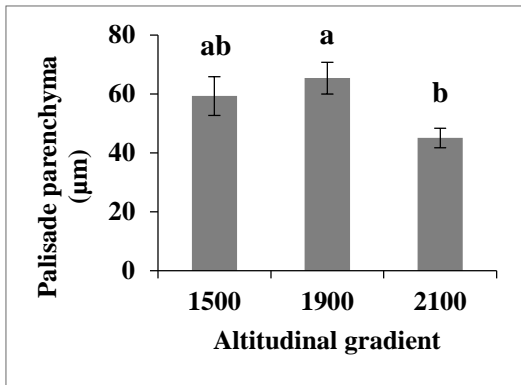


Fig. 7. Y-axis: mean values for the palisade parenchyma (μm) of *P. pseudocaryophyllus*, X-axis: Altitudes 1500 m (a), 1900 m (b), 2100 m (c) in a Tropical montane cloud forest Itamonte, MG, Brazil. Mean values with the same lowercase letters mean that there's no difference between the parameter analysed in the altitudinal gradient. The bars correspond to the standard erros.

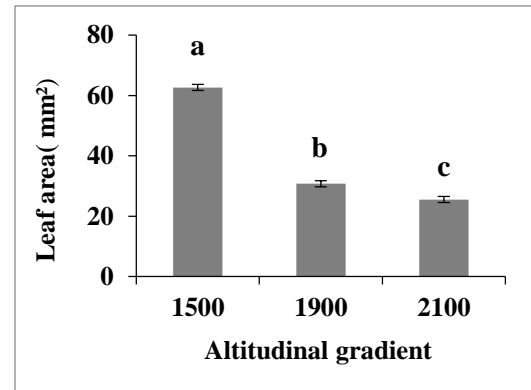


Fig. 8. Y-axis: mean values for leaf area (mm^2) of *P. pseudocaryophyllus*, X-axis: Altitudes 1500 m (a), 1900 m (b), 2100 m (c) in altitude in a Tropical montane cloud forest in Itamonte, MG, Brazil. Mean values with the same lowercase letters mean that there's no difference between the parameter analysed in the altitudinal gradient. The bars correspond to the standard erros.

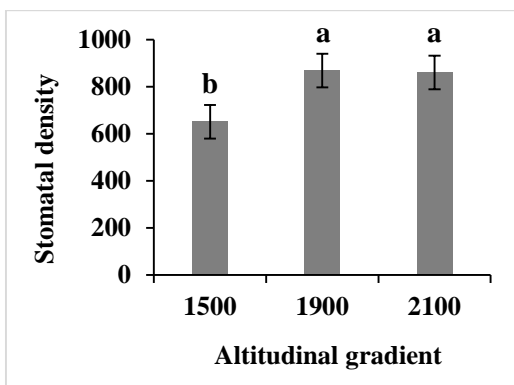


Fig. 9. Y-axis: mean values for stomata density (SD) of *P. pseudocaryophyllus*, X-axis: Altitudes 1500 m (a), 1900 m (b), 2100 m (c) in altitude in a Tropical montane cloud forest in Itamonte, MG, Brazil. Mean values with the same lowercase letters mean that there's no difference between the parameter analysed in the altitudinal gradient. The bars correspond to the standard erros.

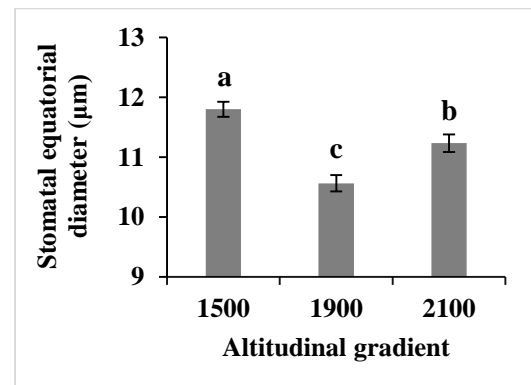


Fig. 10. Y-axis: mean values for equatorial diameter of *P. pseudocaryophyllus*, X-axis: Altitudes 1500 m (a), 1900 m (b), 2100 m (c) in a Tropical montane cloud forest in Itamonte, MG, Brazil. Mean values with the same lowercase letters mean that there's no difference between the parameter analysed in the altitudinal gradient. The bars correspond to the standard erros.

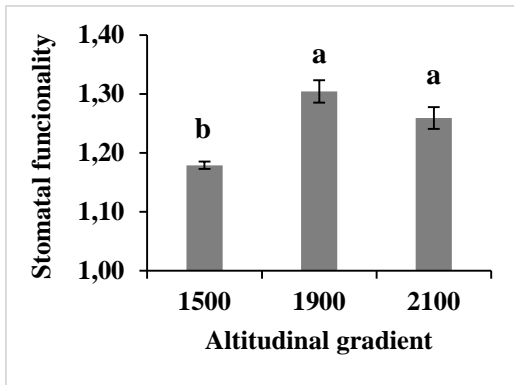


Fig. 11. Y-axis: mean values for stomata functionality (area in mm²) of *P. pseudocaryophyllus*, X-axis: Altitudes 1500 m (a), 1900 m (b), 2100 m (c) in a Tropical montane cloud forest in Itamonte, MG, Brazil. Mean values with the same lowercase letters mean that there's no difference between the parameter analysed in the altitudinal gradient. The bars correspond to the standard errors.

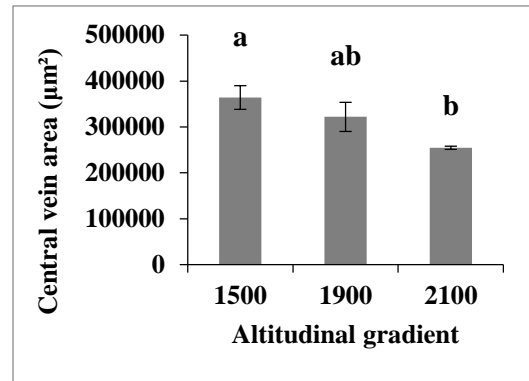


Fig. 12. Y-axis: mean values for central vein area (µm²) of *P. pseudocaryophyllus*, X-axis: Altitudes 1500 m (a), 1900 m (b), 2100 m (c) in a Tropical montane cloud forest in Itamonte, MG, Brazil. Mean values with the same lowercase letters mean that there's no difference between the parameter analysed in the altitudinal gradient. The bars correspond to the standard errors.

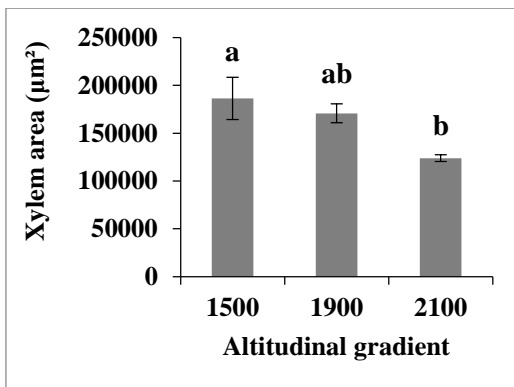


Fig. 13. Y-axis: mean values for xylem area (µm²) of *P. pseudocaryophyllus*, X-axis: altitudes 1500m (a), 1900m (b), 2100m (c) in a Tropical montane cloud forest in Itamonte, MG, Brazil. Mean values with the same lowercase letters mean that there's no difference between the parameter analysed in the altitudinal gradient. The bars correspond to the standard errors.

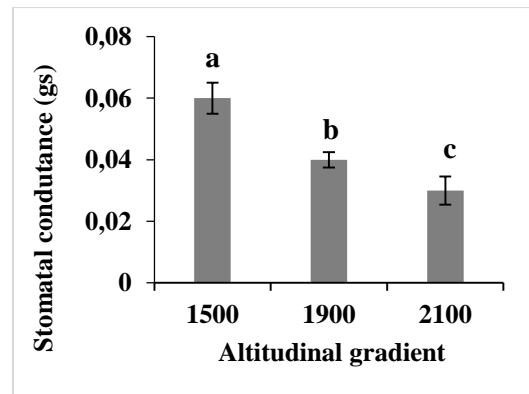


Fig. 14. Y-axis: Mean values for stomatal conductance (gs) of *P. pseudocaryophyllus*, X-axis: Altitudes 1500 m (a), 1900 m (b), 2100 m (c) in a Tropical montane cloud forest in Itamonte, MG, Brazil. Mean values with the same lowercase letters mean that there's no difference between the parameter analyzed in the altitudinal gradient. The bars correspond to the standard errors.

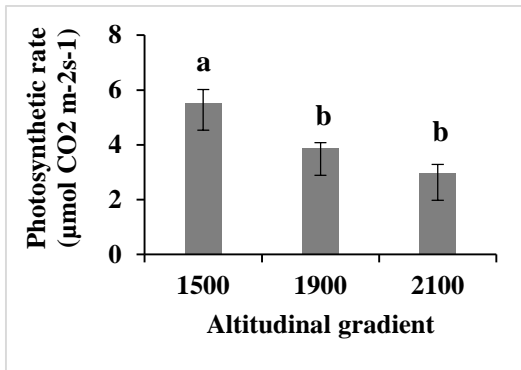


Fig. 15. Y-axis: photosynthetic rate (A) of *P. pseudocaryophyllus*, X-axis: Altitudes 1500 m (a), 1900 m (b), 2100 m (c) in in a Tropical montane cloud forest in Itamonte, MG, Brazil. Mean values with the same lowercase letters mean that there's no difference between the parameter analysed in the altitudinal gradient. The bars correspond to the standard erros.

4. Discussion

The species *Pimenta pseudocaryophyllus* showed intraspecific variations along the altitudinal gradient, with significant differences between altitudes in the mountainous tropical forest of Serra da Mantiqueira. Indicating plasticity of the species to respond to changes in environmental conditions imposed by differences in altitude. These variations were found in the anatomical and physiological characteristics of the leaves of this species, such as the increase in stomatal density and the presence of trichomes, suggesting a tendency toward xeromorphism.

The Serra Mantiqueira Range presents environmental conditions that are selective regarding the establishment of the species. Those forests are subjected to high amounts of water through the intense presence of fog in the region, which confers a high humidity to those forests (Segadas-Vianna and Dau, 1965; Eller et al., 2013), with decreasing temperature with increasing altitude. In Brazil, it is estimated that an increase of 126m in altitude leads to a decrease of 1°C in temperature (Fritzsons et al., 2008). Furthermore, an increase in altitude is usually associated with increases in sunlight radiation (Jones, 2013), which make those forests hostile to the vegetation when there's no fog, leading to aridity and high evapotranspiration rates (Leuschner, 2000). Consequently, only a few species can acclimatize to the environmental conditions imposed by the differences in the altitude in the tropical montane cloud forests (Barry, 1981; Oliveira et al., 2016).

There was a high density of tector trichomes in the adaxial epidermis of all individuals analyzed in our study in the three altitudes (1500m, 1900m and 2100m), a characteristic that is very common in the Myrtaceae family (Metcalf and Chalk, 1979). This pattern favours the entrance of water through the leaves, once the suspended water drops in the atmosphere in the form of fog can be absorbed by the leaves surface (Fahn, 1986; Eller et al., 2013; Fernandez et al., 2014). This mechanism is exclusive from the species that inhabit the tropical montane cloud forest, as those forests are usually shallow, which makes the absorption of water through the roots to the canopy slower (Zimmermann et al., 2007).

The high density of trichomes in the adaxial layer of the leaf can also be explained by the investment of the plant in protective structures, which decreases the leaf exposition to sunlight radiation, from the wind and also from the lower temperatures typically found at higher altitudes (Evert, 2013; Jones, 2013; Anderegg, 2014). Together with the trichomes, we can also find idioblasts carrying druses in the leaf mesophyll (Metcalf and Chalk, 1950), which can be

related to defence against herbivores, making the leaves less attractive to them (Konno et al., 2014).

The leaf area was higher in the plants at 1500m altitude and coupled with that the vascular bundles were also different, where the xylem and the central vein had higher values at 1500m altitude. This mechanism favours the water flux through the plant's tissues. Also, the stomatal equatorial diameter and the palisade parenchyma were higher at the 1500m altitude. The higher aperture in the stomatal equatorial diameter and the stomata increases the oxygen flux and the carbon dioxide in the leaf. In this sense, the palisade parenchyma eases the photosynthetic process in this altitude, where the major part of the chloroplasts are found (Castro et al., 2009). All of those characteristics contributed to a higher conductance rate and photosynthesis, indicating higher assimilation of carbon dioxide and biomass in the individuals of *P. pseudocaryophyllus* at the altitude of 1500m.

At the 2100m altitude the leaf area, photosynthetic rate, xylem area, central vein and palisade parenchyma area were lower. The lower leaf area in this altitude can be explained by the higher sunlight radiation in the higher parts of the mountain when there is no fog, which can lead to a dehydration process when combined with the cold winds. According to Niklas (1996), when they receive more sunlight, the leaf wouldn't need to invest in size, a process that can contribute to decreasing the water loss through evapotranspiration at the higher parts of the mountain. Also, the palisade parenchyma was thinner, a result that was also found by Cruz et al., (2014) when investigating the species *Drimys brasiliensis* Miers (1858) at the Serra da Mantiqueira Range. Those results indicate that the thinner palisade parenchyma can be a pattern for the species at higher altitudes. Reducing this tissue corroborate with a lower photosynthetic rate at this altitude, once it is the main tissue responsible for the plant's photosynthesis (Castro et al., 2009). Additionally, the lower xylem area and central vein in the individuals decreases the water flux through the tissues, influencing the plant's photosynthesis (Taiz et al., 2017). Lower xylem area in an altitudinal gradient can be an adaptation in the plant to help avoid embolism.

The leaves from *P. pseudocaryophyllus* are hypostomatic, with the presence of stomata in the abaxial layer, which contributes to avoiding water loss by reducing the transpiration rates and stomatal conductance (Kundu; Tigerstedt, 1998). This is an important characteristic because it contributes to the maintenance of the specific physiological processes when there's no fog and there's increased sunlight radiation. The stomatal density in *P. pseudocaryophyllus* was higher at a 2100m altitude, a result that was similar to Cruz et al. (2014) and Souza (2014), which found higher stomatal density for espécies *Drimys brasiliensis* and *Myrssiina umbellata*

Mart. (1841), respectively, at a 2100m altitude in the Serra da Mantiqueira Range, which could indicate a pattern. There was also a variation in the stomata size and density along the altitudinal gradient, a characteristic that favours the gas exchange and, consequently, the photosynthesis of the individuals at different altitudes. According to Bertolino et al. (2019), the variation in size and density of stomata can be a consequence of different genetic factors or because the plant grew under different environmental conditions. The high exposure to sunlight radiation in the fully expanded leaves, combined with lower levels of CO₂ increases the stomata production in the new leaves (Miyazawa et al., 2006). This might be a compensatory mechanism, where there's a higher investment in producing stomata as a form of balancing the lower availability of CO₂ in the higher parts of the mountain. With this mechanism it is possible that the plant can adjust its gas exchanges and regulate the water use efficiency, consequently increasing the photosynthesis under those environmental conditions.

Our results indicate that the external signals received by the older leaves could be inducing the development of new stomata in the new leaves, changing their pattern of stomata construction (Chater et al., 2014; Qi and Torii, 2018). Also, with high air humidity in the tropical montane cloud forests, there's increasing turgor in the guard cells, increasing stomata aperture and facilitating the stomatal conductance. As a consequence, there's an increment in the photosynthetic capacity (Bertolino et al., 2019). In this sense, even though changing the size and density of stomata are not the only variables influencing the leaf gas exchange, changing those characteristics allow for adjustments in the plant's photosynthesis and water use efficiency (Franks et al., 2009; Dow et al., 2014).

The presence of secretory channels in the central vein and edge of the mesophyll was already described for the Myrtaceae family by Metcalfe and Chalk (1979). We still need more studies to verify if there are any phytochemical differences between the different altitudinal gradients at the tropical montane cloud forests and which are the particular ecological implications for the species *P. pseudocaryophyllus*.

A lower leaf area, hypostomatic leaves, presence of numerous trichomes in the abaxial layer and sclerenchyma fibres that are involved in the vascular bundles are characteristics typically found in xeromorphic plants with a tendency of plasticity to allow acclimation of those plants in different degrees of light exposition and altitudinal gradients. Besides, other strategies of acclimation allow the species to thrive at different altitudes, increasing its adaptability and competitiveness. Only a few species are capable of this acclimation and we can infer that the responses of the species *P. pseudocaryophyllus* to the differences of altitude might be a form of adaptation that allows the plant to survive under distinct edaphoclimatic conditions. The

tropical montane cloud forests distinct environmental conditions lead to an evolutionary pressure that culminates in floristic differentiation from the species along the altitudinal gradient. The variations in the plant's anatomy and physiology also suggest that which can be a strategy for occupying those environments. Understanding how those species thrive at higher altitudes and the consequences for the plant's populations is key to studies aiming at the conservation of the tropical montane cloud forests. The knowledge gathered in our study contributes to increasing the information about the species in altitudinal gradients and can be utilized in future climatic projections in a scenario of major climatic changes.

Our results indicate that the species *P. pseudocaryophyllus* presents anatomical and physiological variations that allow them to survive along the whole extension of the altitudinal gradient at Serra da Mantiqueira Range.

5. Acknowledgements

To Universidade Federal de Lavras for the opportunity to study this topic and develop this research. To CAPES and CNPq to the scholarship. To RPPN Alto-Montana for the support, availability and access of the study area. To professor Marco Aurélio L. Fontes for the information regarding the species and the forest structure.

6. References

Alves, L.F., Vieira, S.A., Scaranello M.A., Camargo, P.B., Santos, F.A., Joly, C.A., Martinelli, la., 2010. Forest structure and live aboveground biomass variation along an elevational gradient of tropical Atlantic moist forest (Brazil). *For Ecol Manage* 260(5):679–691. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2010.05.023>

Anderegg, W. R. L., 2014. Spatial and temporal variation in plant hydraulic traits and their relevance for climate change impacts on vegetation. *New Phytologist*. n. 205, p. 1008 – 1014.

Barry, R. G., *Mountain weather and climate* third edition. University of Colorado, Boulder, USA. 1981.

Becker, G., Rodriguez, D., Zamudio, K. R., 2013. The Brazilian Adirondacks? *Science*, 340, 428. <http://www.sciencemag.org/>.

Bertolino, L. T., Caine, R. S., Gray, J. E., 2019. Impact of Stomatal Density and morphology on water-use efficiency in a changing world. *Frontiers in Plant Science*, 10, 225.

Bruijnzeel, L. A., 2000. Hydrology of tropical montane cloud forests: a reassessment. In: GLADWELL, J. S. (Ed.). *Proceedings of the Second International Colloquium*. Paris: UNESCO, p. 353-383.

Bruijnzeel, L. A.; Veneklaas, E. J., 1998. Climatic conditions and tropical montane forest productivity: the fog has not lifted yet. (*The Structure and Functioning of Montane Forests: Control by Climate, Soils, and Disturbance*). *Ecology, Tempe*, v. 79, n. 1, p. 10-15.

Castro E.M., Pereira, F.J., Paiva, R., *Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos*. Lavras, UFLA, p. 234. 2009.

Cruz, B. P., Castro, E.M., Cardoso, M., Souza, K., Machado, S., Pompeu, P., Fontes, M., 2014. Comparison of leaf anatomy and essential oils from *Drimys brasiliensis* Miens in a montane cloud forest in Itamonte, MG, Brazil. *Botanical Studies, New York*, v. 55, n. 41, p. 1-14.

Eller, C.B., Lima, L., Oliveira, R.S., 2013. Foliar uptake of fog water and transport belowground alleviates drought effects in the cloud forest tree species, *Drimys brasiliensis* (Winteraceae). *New Phytol* 199:151–162.

Enoque, M., Lima, L., Cordeiro, I., Cláudia, M., Marx Young, M. C., Sobra, M., Moreno, P., 2006. Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo state – Brazil. *Pharmacologyonline, Salerno*, vol. 3, p. 589-593.

Evert, R.F. *Anatomia das plantas de Esau: meristemas, células e tecidos do corpo da planta: sua estrutura, função e desenvolvimento*. 3.ed. São Paulo: Blucher, 728p. 2013.

Fahey, T. J., Sherman, R.E., Tanner, E. V., 2016. Tropical montane cloud forest: environmental drivers of vegetation structure and ecosystem function. *Journal of Tropical Ecology*, v. 32, n. 5, p. 35-367.

Fahn A., 1986. Structural and functional properties of trichomes of xeromorphic leaves. *Annals of Botany* 57, 631-637.

Farias, V., Ledyane D. R., K. H. P., Leila T.M., 2009. Organização estrutural da folha de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, Myrtaceae. *Acta bot. bras.* 23(2): 398-406.

Farmacopéia Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, parte 2. fasc. 4. 2002.

Feder N, O'Brien T.P., 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *Amer J Bot* 55:123–142.

Fernandez V., Sancho-Knapik D., Guzman P., Peguero-Pina J.J., Gil L., Karabourniotis G., Khayet M., Fasseas C., Heredia-Guerrero J. A., Heredia A., 2014. Wettability polarity, and water absorption of holm oak leaves: effect of leaf side and age. *Plant Physiology* 166: 168–180.

Flora-Herbário Virtual. 2020. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbárioVirtual/> Acesso em 20/04/2018

Fritzsons E., Mantovani L. E., Aguiar A.V., 2008. Relation between altitude and temperature: a contribution to climate zoning in the state of Paraná, Brazil. *Revista de Estudos Ambientais* 10, 49–64.

Gastauer M., Thiele J., Porembski S., Neri A. V., 2020. How do altitude and soil properties influence the taxonomic and phylogenetic structure and diversity of Brazilian páramo vegetation? *J Mt Sci* 17:1045–1057. <https://doi.org/10.1007/s11629-019-5403-1>

Hamilton, L.S., Juvik, J.O., Scatena, F.N., 1995. The Puerto Rico tropical cloud forest symposium: introduction and workshop synthesis. In *Tropical montane cloud forests* (L.S. Hamilton, J.O. Juvik & F.N. Scatena, eds). Springer Verlag, New York, p. 1-23.

Higuchi, P.; Silva, A.C.; Almeida, J.A.; Bortoluzzi, R.L.C.; Mantovani, A.; Ferreira, T.S.; Souza, S.T.; Gomes, J.P. & Silva, K.M., 2013. Florística e estrutura do componente arbóreo e análise ambiental de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista Alto-montana no município de Painel, SC. *Ciência Florestal* 23: 153-164.

IBGE. Manuais Técnicos em Geociências: Manual Técnico da Vegetação Brasileira. 2nd ed. Rio de Janeiro: IBGE, 2012.

Johansen, D. A. Plant microtechnique. New York: Mcgraw-Hill Book, 523 p, 1940.

Jones, H. *Plants and Microclimate: A Quantitative Approach to Environmental Plant Physiology*. Cambridge: Cambridge University Press. 2013.

Konno, K., Inoue, T.A., Nakamura, M., 2014. Synergistic defensive function of raphides and protease through the needle effect. *PLoS ONE*.

Körner C., 2007. The use of “altitude” in ecological research. *Trends Ecol Evol* 22:569–574. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.09.006>.

- Kundu, S. K.; Tigerstedt, P. M. A., 1998. Variation in net photosynthesis, stomatal characteristics, leaf area and whole plant phytomass production among ten provenances of neem (*Azadirachta indica*). *Tree Physiology*, n.19, p.47-52.
- Le Saout, S., Hoffmann, M., Shi, Y., Hughes, A., Bernard, C., Brooks, T.M., Bertzky, B., Butchart, S.H.M., Stuart, S.N., Badman, T., Rodrigues, A.S.L., 2013. Protected Areas and Effective Biodiversity Conservation. *Science*, 342: 803-805.
- Leuschner C., 2000. Are high elevations in tropical mountains arid environments for plants? *Ecology* 81: 1425–1436.
- Los, S.O., Street-Perrott, F.A., Loader, N.J., Froyd, C.A., 2021. Detection of signals linked to climate change, land-cover change and climate oscillators in Tropical Montane Cloud Forests. *Remote Sensing of Environment* 260: 112431.
- Malhi Y., Silman M., Salinas N, Bush M., Meir P., Saatchi S., 2010. Introduction: elevation gradients in the tropics: laboratories for ecosystem ecology and global change research. *Glob Change Biol* 16(12):3171–3175.
- Marcon, A.K.; Silva, A.C.; Higuchi, P.; Ferreira, T.S.; Missio, F.F. & Salami, B., 2014. Variação florísticoestrutural em resposta à heterogeneidade ambiental em uma floresta nebulosa em Ububici, Planalto Catarinense. *Scientia Forestalis* 42: 439-450.
- Metcalfe, C.R.; Chalk, L. *Anatomy of the dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem*. 2nded. Clarendon: Oxford University Press, v.1, 288 p. 1979.
- Miyazawa, S.I., Livingston, N.J. and Turpin, D.H. (2006) Stomatal development in new leaves is related to the stomatal conductance of mature leaves in poplar (*Populus trichocarpaxP-deltoides*). *J. Exp. Bot.* 57, 373–380.
- MMA (2014). Ministério do Meio Ambiente. Cadastro Nacional de Unidades de Conservação. Accessed 12 June 2017. <http://www.mma.gov.br/areas-protegidas/cadastronacional-de-ucs/dados-georreferenciados/>.
- Niklas KJ., 1996. Differences between *Acer saccharum* leaves from open and wind-protected sites. *Annals of Botany* 78:61–66.
- Oliveira Filho, A. T., Carvalho, D. A., Fontes, M. A. L., Van Den Berg, E., Curi, N., Carvalho, W. A. C., 2004. Variações estruturais do compartimento arbóreo de uma Floresta Semidecídua Alto-Montana na chapada das Perdizes, Carrancas, MG. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 291-309.
- Oliveira, J.D.; Alves, C.C.F.; Miranda, M.L.D.; Martins, C.H.G.; Silva, T.S.; Ambrosio, M.A.L.V.; Alves, J.M.; Silva, J.P., 2016. Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Campinas, v.18, n.2, p.502-510.
- Pane, E.; Pereira, S. Y., 2005. As Fontes Em Itamonte, Sul De Minas Gerais – Uma Contribuição Para O Entendimento Das Relações Entre Água Superficial E Subterrânea. *Águas Subterrâneas*, v. 19, n. 1, p. 1–14.

Paula, J. A., Paula, J. R., Bara, M. T., Rezende, M. H., Ferreira, H. D., 2008. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) R. Landrum - Myrtaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.2, p.265-278.

Pereira F.J., Castro E.M., Oliveira C., Pires M.F., Pasqual M., 2011. Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de aguapé para a tolerância à contaminação por arsênio. *Planta Daninha*. 2011, v. 29, n. 2 pp. 259-267. doi.org/10.1590/S0100-83582011000200003. ISSN 1806-9681.

Pompeu P. V., Fontes M. A., Santos R. M. dos, Garcia P. O., Batista T. A., Carvalho W. A. C., Oliveira Filho A. T., 2014. Floristic composition and structure of an upper montane cloud forest in the Serra da Mantiqueira Mountain Range of Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 28, n. 3, p. 456–464.

Pompeu, P. V., Fontes, M. A. L., Mulliganb, M. et al. Assessing Atlantic cloud forest extent and protection status in southeastern Brazil. *Journal for Nature Conservation*. 2018.

Raven, P.H., Eichhorn, S.E., Evert, R.F. *Biologia Vegetal*. 8ª Edição. Guanabara Koogan, 867p, 2014.

Rezende V. L, Miranda P. L, Meyer L., Moreira C.V., Linhares M.F., Oliveira-Filho A.T., Eisenlohr P.V., 2015. Tree species composition and richness along altitudinal gradients as a tool for conservation decisions: the case of Atlantic semideciduous forest. *Biodivers Conserv* 24(9):2149–2163. <https://doi.org/10.1007/s10531-015-0939-z>

Sá Júnior, A.; de Carvalho, L. G.; da Silva, F. F.; de Carvalho Alves, M.; 2012. Application of the Köppen classification for climatic zoning in the state of Minas Gerais, Brazil. *Theoretical and Applied Climatology*, Wien, v. 108, n. 1-2, p. 1-7, 2012.

Segadas-Vianna F., Dau L. Ecology of the Itatiaia range, Southeastern Brazil. II – Climates and altitudinal climatic zonation. *Arquivos do Museu Nacional* 53: 31–53. 1965.

Sobral, M., Proença, C., Souza, M, Mazine, F, Lucas, E., 2015. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10823>>.

Souza, Katiúscia Freire de *Dissertação_Comparação da anatomia foliar de Myrsine coriacea e Myrsine umbellata em diferentes cotas altitudinais.pdf*. 2014.

Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. M., & Murphy, A., 2017. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal* (6 ed., 888p). Artmed, Porto Alegre.

Team, R. *RStudio: Integrated Development for R*. Studio. Boston, MA Inc., 2015. Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>

Webster, G. L. The panorama of Neotropical cloud forests. In: Churchill, S. P., Balslev, H., Luteyn, J. L. (Ed.). *Biodiversity and conservation of Neotropical Montane Forests*. New York: The New York Botanical Garden, p. 53-77. 1995.

Supplementary Table 1

Anatomical characteristics for the leaf tissue of *P. pseudocaryophyllus* with the values of p for the normality test, ANOVA and Kruskal-Wallis at different altitudinal gradients in a tropical montane cloud forest in Itamonte, Minas Gerais, Brazil.

	Shapiro-Wilk (p value)	Anova (p value)	Kruskal-Wallis (p value)	
Leaf area (mm ²)	0,000038	-	0,00000465	*
Hypodermis (µm)	0,744	0,1376	-	
Stomatal density (stomata/mm ²)	0,756	0,0008	-	*
Stomatal equatorial diameter (µm)	0,853	0,0001	-	*
Stomatal polar diameter (µm)	0,031	0,562	-	
Stomata functionality (area in mm ²)	0,456	0,0004	-	*
Spongy parenchyma (µm)	0,5414	0,9501	-	
Palisade parenchyma (µm)	0,1773	0,04785	-	*
Central vein area (µm ²)	0,1326	0,02086	-	*
Phloem area (µm ²)	0,04672	-	0,1075	
Xylem area (µm ²)	0,1192	0,02257	-	*
Photosynthetic rate A (µmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	0,108	0,0000261	-	*
Transpiration rate E (mmol H ₂ O.m ⁻² .s ⁻¹)	0,01385	0,02005	-	
Stomatal conductance (gs) (mmol CO ₂ .m ⁻² .s ⁻¹)	0,001595	-	0,0006755	*
Water use efficiency	0,05264	0,2482	-	

Supplementary Table 2

Anatomical and physiological characteristics for the leaf tissues of *P. pseudocaryophyllus* at three different altitudes (1500m, 1900m, 2100m) followed by the mean values for the characteristic. Mean values with the same lowercase letters mean that there's no difference between the parameter analyzed in the altitudinal gradient. Standard error (SD) $P < 0.05$.

	1500	1900	2100
Leaf area (mm ²)	62,69 a ± 6,16	30,77 b ± 2,83	25,54 c ± 1,46
Stomatal density (stomata/mm ²)	651,32 b ± 32,33	868,71 a ± 32,52	860,35 a ± 34,80
Stomatal equatorial diameter (µm)	11,80 a ± 0,12	10,56 b ± 0,13	11,23 c ± 0,14
Stomatal functionality (area in mm ²)	1,17 b ± 0,006	1,30 a ± 0,019	1,25 a ± 0,018
Palisade parenchyma (µm)	59,34 ab ± 6,56	65,43 a ± 5,38	45,07 b ± 3,28
Central vein area (µm ²)	363888,67 a ± 25834,33	322031,82 ab ± 31611,23	254617,48 b ± 3292,43
Xylem area (µm ²)	186315,85 a ± 2,21E+04	170795,68 ab ± 9,98E+03	123933,67 b ± 3,48E+03
Photosynthetic rate A (µmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	5,53 a ± 0,48	3,89 b ± 0,18	2,98 b ± 0,30
Stomatal conductance (gs) (mmol CO ₂ .m ⁻² .s ⁻¹)	0,06 a ± 0,005	0,04 b ± 0,002	0,03 c ± 0,004

**ARTIGO 2 - Relação entre as características anatômicas e trocas gasosas da espécie
Pleroma estrelense e o solo em uma floresta nebulosa**

(VERSÃO PRELIMINAR)

Artigo formatado conforme as normas para submissão da revista *Australian Journal of Botany*.

RESUMO

Pleroma estrelense (Raddi) P.J.F.Guim. & Michelang é uma espécie endêmica do Brasil, podendo ser encontrada em florestas nebulares, arbustal, pastagens e brejos. A hipótese testada foi que os fatores edáficos e a interação solo-planta entre diferentes cotas altitudinais (1500m, 1700m, 1900m, 2100m) determinam as características anatômicas e fisiológicas da espécie *Pleroma estrelense* provocando uma pressão adaptativa na planta. Para verificar a influência da altitude na estrutura anatômica das folhas e do xilema secundário dos galhos da espécie analisada, foram coletadas amostras de folhas e galhos de indivíduos em 4 cotas altitudinais (1500, 1700, 1900, 2100 m) em uma floresta nebulosa na Serra da Mantiqueira. O material vegetal foi fixado e preparado seguindo os procedimentos usuais de microtécnica vegetal. Também foram realizadas análises das trocas gasosas das folhas em cada indivíduo. Amostras compostas de solo da camada superficial também foram coletadas nas mesmas 4 cotas altitudinais. Considerando as variações anatômicas da espécie: densidade estomática, espessamento dos tecidos parênquima paliçádico e esponjoso, epiderme adaxial e abaxial, cutícula adaxial e o diâmetro estomático equatorial na cota altitudinal 2100 m em relação as demais cotas e suas variações fisiológicas ao longo do gradiente, podemos perceber o quanto esses mecanismos estão interligados. Os resultados suportam a hipótese de que os fatores edáficos e a interação solo-planta entre as cotas têm forte influência sobre as características anatômicas e fisiológicas da espécie *Pleroma estrelense*.

Palavras-chave: *Pleroma estrelense*, *Xilema secundário*, *mesofilo*, *floresta nebulosa*.

ABSTRACT

Pleroma estrelense (Raddi) P.J.F.Guim. & Michelang is an endemic species of Brazil, and can be found in cloud forests, shrubs, pastures and swamps. The hypothesis tested was that edaphic factors and soil-plant interaction between different altitudes (1500m, 1700m, 1900m, 2100m) determine the anatomical and physiological characteristics of the *Pleroma estrelense* species, causing an adaptive pressure on the plant. To verify the influence of altitude on the anatomical structure of leaves and secondary xylem of branches of the analyzed species, samples of leaves and branches of individuals were collected at 4 altitudes (1500, 1700, 1900, 2100 m) in a cloud forest in Serra from Mantiqueira. The plant material was fixed and prepared following the usual plant microtechnical procedures. Samples composed of soil from the surface layer were collected at the same 4 altitudes. Considering the anatomical variations of the species: stomatal density, thickening of the palisade and spongy parenchyma tissues, adaxial and abaxial epidermis, adaxial cuticle and the equatorial stomatal diameter at the altitude of 2100 m in relation to the other levels and their physiological variations along the gradient, we can understand how these mechanisms are interconnected. The results support the hypothesis that the edaphic factors and the soil-plant interaction between the levels have a strong influence on the anatomical and physiological characteristics of the *Pleroma estrelense* species and that the increase in temperature due to climate change becomes a threat to the species present in these areas. altitude formations.

Keywords: *Pleroma estrelense*, secondary xylem, mesophyll, cloud forest.

Introdução

As florestas nebulares no Brasil encontradas na floresta Atlântica, são um hotspot com uma grande diversidade de espécies (Kier *et al.* 2009; Schaefer *et al.* 2012), com cerca de 20.204 espécies de plantas das quais 7.400 são endêmicas ((Fundação SOS Mata Atlântica 2018). Além disso, a Floresta Atlântica é responsável por manter a qualidade e quantidade de água que abastecem as nascentes de diversos rios (Oliveira Filho *et al.* 2004). Apesar de sua importância ambiental, essa floresta sofreu nos últimos séculos uma grande redução das suas áreas com o desmatamento e fragmentação devido à expansão da agricultura e pecuária no país, restando apenas 12,4% de sua cobertura vegetal (Fundação SOS Mata Atlântica 2018). Em reconhecimento de sua importância, foi criada a lei da Mata Atlântica nº 11.428/2006 visando a proteção desse Domínio Vegetacional.

A frequente ocorrência de neblina é uma característica climática definidora de florestas nebulares, que ocorrem sob uma ampla gama de regimes de precipitação anuais (de 600 a 4.500 mm) (Jarvis e Mulligan 2011). As florestas nebulares ocorrem em altitudes a partir de 1000 m no Brasil (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2012) e à medida que o gradiente de altitude aumenta, massas de ar resfriam-se adiabaticamente cerca de 1°C a cada 100 m (Money 2000). Esse resfriamento eventualmente pode atingir o ponto de formação de orvalho, conforme a saturação do ar, podendo ocorrer formação de gotículas de água sobre a vegetação (Money 2000).

As condições climáticas impostas pela altitude em florestas nebulares, tais como: constantes neblinas, ventos fortes, baixa temperatura e radiação solar, juntamente com os fatores edáficos influenciam diretamente a estrutura anatômica e fisiológica das plantas (França e Stehmann 2004; Schaefer *et al.* 2012). Assim, as vegetações em áreas mais elevadas apresentam árvores com troncos retorcidos, folhas pequenas, pubescentes e frequentemente coriáceas (Scheer *et al.* 2011).

Essas mudanças estruturais são resultado dos mecanismos de aclimação nas plantas para sobreviver às diferentes condições ambientais no meio, mudanças essas que se estendem aos galhos, um importante condutor hidráulico. Entender o sistema hidráulico do xilema tem proporcionado uma riqueza de dados sobre as leis físicas e a relação estrutura-função que controlam o fluxo de água nas plantas (Decombeix *et al.* 2019). Porém ainda há poucos dados sobre o xilema secundário relacionado às variações ambientais presentes na floresta nebulosa (Santos *et al.* 2021).

Devido às crescentes mudanças climáticas, com alterações em frequências de períodos de *El niño* e *La niña*, pesquisas recentes tem chamado a atenção sobre a mortalidade de florestas tropicais associadas ao aumento de duração das épocas de seca (Maia et al, 2020). A previsão de mudança climática para os próximos anos coloca em alerta a perda de biodiversidade em todo o mundo. Contudo, poucos estudos foram realizados com a vegetação em florestas nebulares no Brasil, destacando-se os trabalhos com florística em florestas nebulares (Scheer *et al.* 2011; Higuchi *et al.* 2013; Scheer *et al.* 2013; Koche Marcon *et al.* 2014; Pompeu *et al.* 2014; Mariano *et al.* 2020).

Além disso, o clima frio e úmido nas florestas nebulares diminui o intemperismo de minerais e rochas, tornando os solos montanos relativamente rasos e pobres em nutrientes, e se houver vegetação suficiente, com grande quantidade de matéria orgânica, que se decompõe lentamente (Scheer *et al.* 2011). Poucos estudos foram conduzidos relacionando a anatomia de folhas em floresta nebular ao longo de um gradiente altitudinal (Cruz *et al.* 2014; Santos *et al.* 2021), assim como trabalhos analisando a anatomia de folha e galho em floresta nebular e sua associação com os fatores edáficos. Devido a esta lacuna no conhecimento, além da diversidade florística que as florestas nebulares apresentam, faz-se necessário conhecer a estrutura anatômica, fisiológica e as características anatômicas do xilema das plantas e se estão associados também a fatores edáficos. Entender como as plantas se relacionam e se mantêm sob as variáveis climáticas presentes em florestas altitudinais é importante para prever os efeitos das mudanças climáticas nas espécies e assim fomentar maneiras de preservação.

Com isso, o objetivo do estudo foi investigar se há modificações nas características anatômicas e fisiológicas de folhas e galhos de plantas da espécie *Pleroma estrelense* (Raddi) P.J.F.Guim. & Michelang ao longo de uma alteração na altitude (1500 m, 1700 m, 1900 m, 2100 m) em Itamonte, MG e qual a relevância dos fatores edáficos nessas modificações. Diante disso, as seguintes perguntas conduziram este estudo: (a) O gradiente altitudinal condiciona as diferenças anatômicas e fisiológicas em folhas e galhos de *P. estrelense*? (b) Quais fatores edáficos melhor explicam as modificações anatômicas e/ou fisiológicas ao longo do gradiente altitudinal?

Hipotetizamos que as plantas presentes nas altitudes, 1900 m e 2100 m, colonizam solos mais ácidos e que essa diferença de pH irá causar alterações na absorção de minerais essenciais para a planta, como manganês, nitrogênio, acarretando em menor produção de clorofila, refletindo na atividade fotossintética da espécie.

Materiais e métodos

Caracterização da área de estudo

O estudo foi conduzido em uma área de Reserva Particular do Patrimônio Natural, denominada RPPN Alto-Montana, e integra a Área de Preservação Ambiental da Serra da Mantiqueira, em Itamonte, MG. Essa área faz parte do Bioma Mata Atlântica, e o tipo de formação vegetal predominante é a floresta tropical densa alto-montana (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2012).

A reserva é composta por 672 ha de floresta e montanhas contínuas, com altitude entre 2100 e 2400m. Segundo a classificação de Köppen, o clima na região é do tipo Cwb (altitude subtropical), caracterizado pelo inverno seco, podendo atingir máximas de somente 22°C (Pompeu *et al.* 2014). O tipo predominante de formação de vegetação é a floresta tropical densa de alta altitude. A temperatura média anual varia de 17,4°C a 19,8°C, com uma precipitação anual média de 1.749 mm e o solo predominante na região são Cambissolos (Pane e Pereira 2005).

Esses solos são pouco desenvolvidos, com horizonte B incipiente, resultando em baixa profundidade explorável pelas raízes. Em elevações graníticas como na Serra da Mantiqueira, tendem a apresentar fertilidade baixa a média, textura média a grosseira, e frequentemente pedregosos. As coordenadas geográficas aproximadas da área são 22 ° 21'55 " S e 44 ° 48'32 " W (Fig. 1).

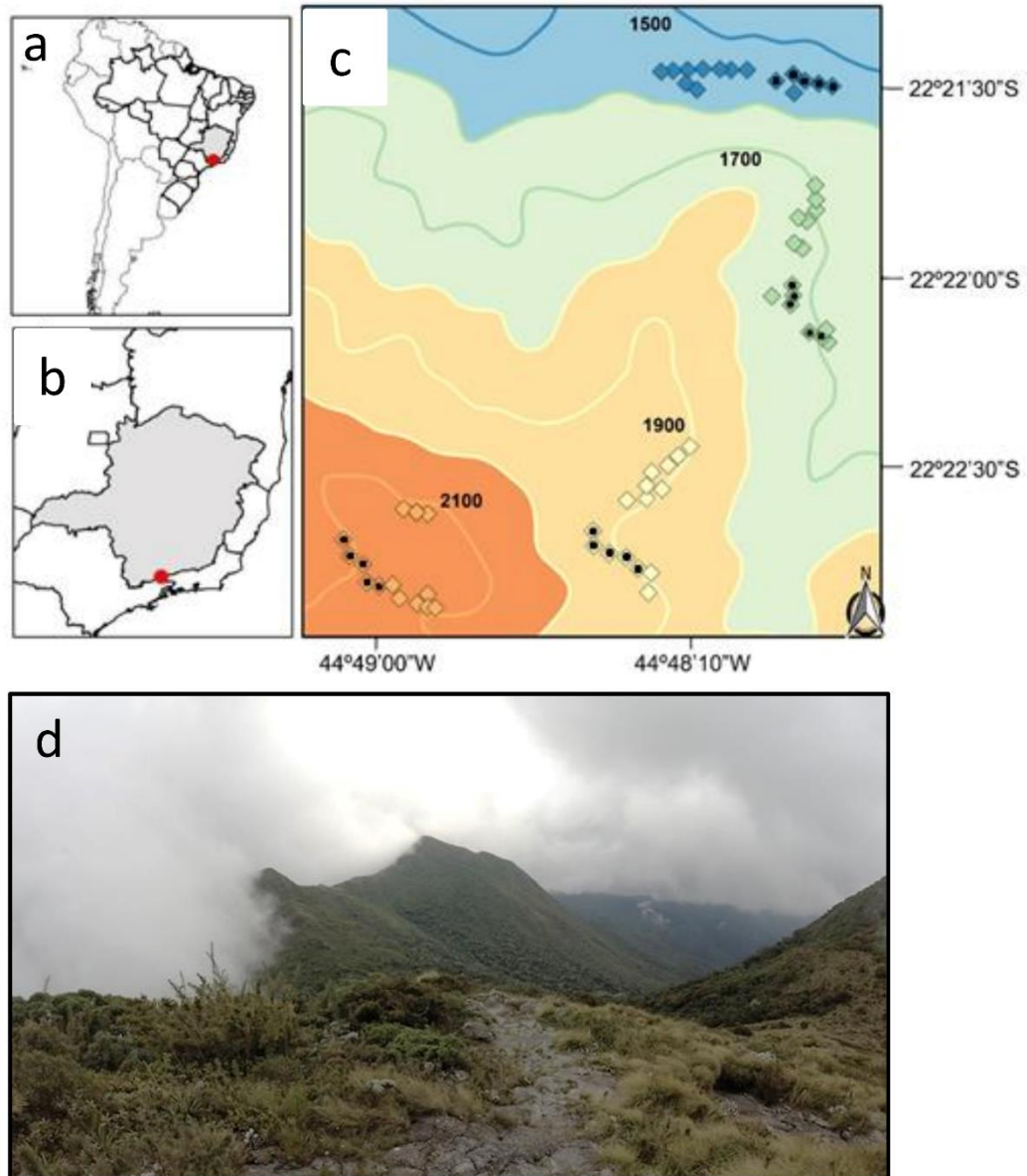


Fig. 1. Localização da área de estudo mostrando a distribuição altitudinal na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN Alto Montana). Fig. (a) América do Sul. Fig. (b) A floresta nebulosa está localizada entre os estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. Fig. (c) distribuição das parcelas (representadas em quadrado) e indivíduos da espécie *Pleroma estrelense* (Raddi) P. J. F. Guim. & Michelang (representadas por pontos) nas cotas altitudinais 1500 m, 1700 m, 1900 m e 2100 m. Fig. (d) alta nebulosidade na vegetação na cota 2100 m. (Foto cedida pelo Instituto Altomontana).

Coleta e preparo das amostras

A espécie estudada nesse trabalho *Pleroma estrelense* (Raddi) P.J.F.Guim. & Michelang pertence à família Melastomataceae. São árvores de aproximadamente 4-5 m de altura, possuem cálice verde e corola roxa (Flora do Brasil 2020). A espécie foi escolhida por ser uma das poucas espécies capazes de se manter e sobreviver ao longo do gradiente altitudinal nas matas da Serra da Mantiqueira (Pompeu *et al.* 2014). Além disso, a ausência de trabalhos anatômicos sobre a

espécie e pela sua importância ecológica, e por se tratar de uma espécie pioneira para a restauração ecológica em diversas regiões do estado de São Paulo (Barbosa *et al.* 2017), motivaram minha escolha.

A área da RPPN Alto Montana vem sendo investigada há alguns anos pelo grupo de estudos do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Lavras, e as amostras de *P. estrelense* foram coletadas dentro das parcelas previamente estudadas por Pompeu (et al., 2014). O delineamento amostral dos indivíduos da espécie *P. estrelense* foi casualizado com quatro tratamentos (1500 m, 1700 m, 1900 m e 2100 m) e cinco repetições. A parcela experimental compreendeu uma planta por réplica. Foram selecionados cinco indivíduos (repetições) por cada cota, totalizando 20 indivíduos. Coletamos amostras de folhas e galhos livres de herbivoria para a avaliação anatômica da folha e do xilema secundário dos galhos, análise fisiológica, e amostras de solo ao longo do gradiente altitudinal.

De cada indivíduo foram coletados 2 (dois) galhos localizados na segunda bifurcação em relação ao comprimento total da árvore. De cada galho foram retiradas amostras a 0, 50, e 100% do seu comprimento total. Os galhos retirados tinham em média de 2,0 a 3,0 cm. Para cada indivíduo, calculou-se o valor médio em relação a cada variável. Amostras frescas de folhas e caules foram fixadas em F.A.A.70% (formaldeído, ácido acético e etanol 70%) por 72 horas e transferidas para etanol a 70% até as realizações das análises microscópicas em laboratório (Kraus e Arduim 1997).

Para a realização das medições das trocas gasosas foliares, as folhas foram destacadas e avaliadas em 5 indivíduos em cada cota altitudinal e para cada indivíduo foram realizadas 2 leituras para cada folha. As medições foram realizadas utilizando o IRGA até as 11h da manhã para evitar o fechamento dos estômatos. Os dados foram calculados para cada réplica sendo utilizado a média desses valores por indivíduo. Os espécimes de voucher ESAL 32.633 foram depositados no herbário da Universidade Federal de Lavras.

Anatomia e micromorfometria foliar

As folhas coletadas de cada indivíduo foram levadas ao laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras para as avaliações anatômicas. Para obtermos a área foliar (mm²), imagens de 5 folhas de cada indivíduo que não foram inseridas na fixação, foram digitalizadas através de um scanner de mesa e software de imagem Image J.

Realizamos os cortes paradérmicos manualmente nas faces adaxial e abaxial, e em seguida, foram clarificadas com hipoclorito de sódio 5%, por cerca de 10 minutos e depois

lavadas em água destilada. Logo após, as amostras foram coradas com safranina aquosa a 0,1% (m v-1) e montadas em lâminas com glicerina 50% (Kraus e Arduim 1997). Através das imagens foi avaliado a densidade (número de estômatos por mm²) e a funcionalidade (diâmetro polar estomático / diâmetro equatorial estomático) dos estômatos de acordo com Pereira *et al.* (2011).

Para obter as secções transversais, fragmentos foliares foram retirados na região mediana das folhas. Os fragmentes passaram por uma série etanólica crescente para desidratação (70, 80, 90 e 100%). Logo após, o material foi imerso em uma solução de pré-infiltração composta de 100% de etanol e resina de base (1: 1) por 24 horas, (Leica Historresin®). Em seguida, foi realizado a infiltração de resina base por 72 horas a 4 °C, conforme instruções de Johansen (1940). Secções transversais da região mediana das folhas foram realizadas em um micrótomo rotacional semi-automático modelo YD-335 (Jinhua Yidi Medical Appliance CO., LTD, Zhejiang, China) com espessura de 8 a 10 µm e corada em solução azul de toluidina a 1% (O'Brien *et al.* 1965) e montadas com Entellan®. Com as secções transversais na região do terço mediano nós avaliamos quantitativamente a espessura da cutícula na face adaxial e abaxial, epiderme na face adaxial e abaxial, parênquima paliçádico e esponjoso (n = 30). Na região mediana da nervura central foi mensurado a área total do feixe vascular do xilema e do floema. As imagens das secções paradérmicas e transversais foram obtidas através de uma câmera (Zeiss Axis Cam Erc 5s) acoplada ao microscópio ótico (Zeiss Microimaging, Heidelberg, Alemanha).

Microscopia Eletrônica de Varredura

Para visualização da superfície da epiderme foliar foram realizados cortes de aproximadamente 2 cm² das folhas dos indivíduos nas 4 cotas altitudinais e fixados em soluções de Karnovisc até o momento das análises no laboratório. As amostras foram lavadas em uma solução cacodilato de sódio 0.05 M, por 3 vezes, 10 minutos cada e pós-fixado em 1% de tetraóxido de ósmio (OsO₄), durante 4 horas. Após esse período, foram desidratadas em séries crescentes de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%, 3 vezes, 10 minutos cada) e submetidos a um ponto crítico de dessecação de CO₂. As imagens da superfície foliar foram obtidas através do microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XVP no laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

Anatomia do galho

Para as análises anatômicas dos galhos, os corpos de provas (galhos retirados diretamente da solução fixante) foram seccionados em cortes transversais e longitudinal com espessura de 18 μm por meio de um micrótomo de deslize (Leica SM 2000R). As secções foram clarificadas, lavadas (álcool 20%), coradas (safranina) e montadas em glicerina (KRAUS; ARDUIM, 1997). Para a dissociação dos elementos celulares dos galhos utilizamos peróxido de hidrogênio e ácido acético, nas proporções de 1:1, em uma estufa a 60°C por 24 h. Após esse período o material macerado foi lavado, corado com safranina 1% e montado em lâminas com glicerina Franklin (1945).

Com o auxílio de uma câmera (Zeiss Axis Cam Erc 5s) acoplada ao microscópio ótico (Zeiss Microimaging, Heidelberg, Alemanha) as lâminas foram fotografadas e as análises de micromorfometria realizadas no software de análise de imagem image J. Para cada característica anatômica observada, foram realizadas 30 medições/indivíduo. As análises microscópicas qualitativas e quantitativas dos galhos foram descritas conforme IAWA Committee (1989). As variáveis mensuradas foram: comprimento (μm), diâmetro tangencial (μm) e frequência dos elementos de vaso (mm^2). Já para as fibras, foram medidos o seu comprimento (μm) e espessura da parede (μm). Índice de vulnerabilidade de Carlquist foi calculado por meio do diâmetro de vaso/frequência de vasos (mm^2), conforme proposto por Carlquist (2001).

Análises fisiológicas

As análises das trocas gasosas foram realizadas por meio de um analisador de gás infravermelho (IRGA) modelo LI-6400XT (Li-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, SA), com câmera de 6 cm^2 e fonte de luz LED vermelha / azul (LI-6400-02B, Li-Cor, Lincoln, Nebraska, EUA). Medidas na região mediana das folhas completamente expandidas foram realizadas entre 8-11h e a densidade de fluxo de fótons fotosinteticamente ativos (DFFFA) foi padronizada em 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Os parâmetros avaliados foram Condutância estomática (gs), taxa de transpiração (E), taxa fotossintética (A) e o uso eficiente da água (UEA).

Análises de solo

Para a coleta de solo, foram alocadas 15 parcelas de 400 metros quadrados distribuídas igualmente nas 4 cotas altitudinais, totalizando 60 parcelas (40 \times 10 m cada). Foram coletadas amostras compostas do solo da camada superficial (0–20 cm de profundidade), em locais distribuídos em diferentes posições. Em cada parcela foram retiradas três amostras, uma no

centro e duas nos pontos finais e, a seguir, homogêneas e posteriormente armazenadas em sacos plásticos limpos e etiquetados, totalizando 500 g de solo. As análises texturais e químicas do solo foram realizadas no Laboratório de Análises de Solo da Universidade Federal de Lavras. As variáveis químicas incluíram: potássio (K), fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e alumínio (Al), acidez potencial (Al + H), soma de bases (S), CTC efetivo (t), CTC a pH 7,0 (T), saturação por Al (m), saturação por bases (V), e carbono orgânico. Todos os procedimentos seguiram o protocolo da EMBRAPA (1997). A coleta de solos foi realizada pelo Laboratório de Ecologia Florestal da UFLA em 2011 e cedidas para ingressar nesse trabalho.

Análises estatísticas

Todos os resultados foram submetidos a teste de normalidade dos dados usando o teste de Shapiro-Wilk a 5% de significância, e então uma análise de variância (ANOVA) ou teste de Kruskal Wallis. Sempre que os dados se enquadravam nos padrões de normalidade, procedemos com o teste de Tukey e, quando não se enquadravam na normalidade, utilizamos os testes de Dunn. Todas as análises foram realizadas no software R studio versão 4.0.3 (Team 2020).

Buscando explicar se as características do solo influenciam nas variáveis anatômicas e fisiológicas, foram realizados modelos lineares, usando as características de solo como variáveis explicativas e as características anatômicas e fisiológicas como variáveis dependentes. Para isso, calculamos a média de cada característica de solo das 15 parcelas em cada cota, utilizando o valor médio como explicativo nos modelos.

Para os modelos lineares ajustados sob suposições de normalidade, avaliamos a normalidade residual e a homocedasticidade por meio de inspeção residual. Aplicamos a transformação logarítmica nas variáveis respostas para atender às premissas de normalidade. As relações entre as variáveis de solo (explicativas) e as variáveis anatômicas e fisiológicas foram analisadas através de modelos lineares simples. Foram selecionados os modelos com R^2 acima de 0,25. Nós usamos o programa R Statistical software v3.1.1 (R Core Team, 2018) os pacotes Vegan (Oksanen et al., 2020), lme4 (BATES et al., 2015), MuMIn (Barton, 2018) e car (Fox J, Weisberg S (2019)).

RESULTADOS

Caracterização anatômica foliar

As folhas da espécie *P. estrelense* são compostas por uma camada de epiderme unisseriada em ambas as faces em formato tabular, sem espaços intercelulares (Fig. 2 e 3). É

possível visualizar os estômatos do tipo anomocítico (Fig. 2), presentes apenas na epiderme abaxial, sendo classificadas como uma folha hipoestomática. A densidade estomática apresentou diferença estatística entre as altitudes, onde foi menor na cota altitudinal 1500 m. Já os diâmetros polar e equatorial foram maiores na cota 2100 m de altitude, enquanto que a funcionalidade estomática não apresentou diferença entre as cotas (Tabela suplementar 1 e 2).

As epiderme das faces adaxial e abaxial possuem uma cutícula espessa e tricomas tectores (Fig. 2 e 3). A espessura foliar não apresentou diferença significativa entre os indivíduos presentes nas cotas altitudinais, enquanto na área foliar há uma diferença significativa entre os indivíduos, sendo maior na cota altitudinal 1500 m (Tabela suplementar 1 e 2).

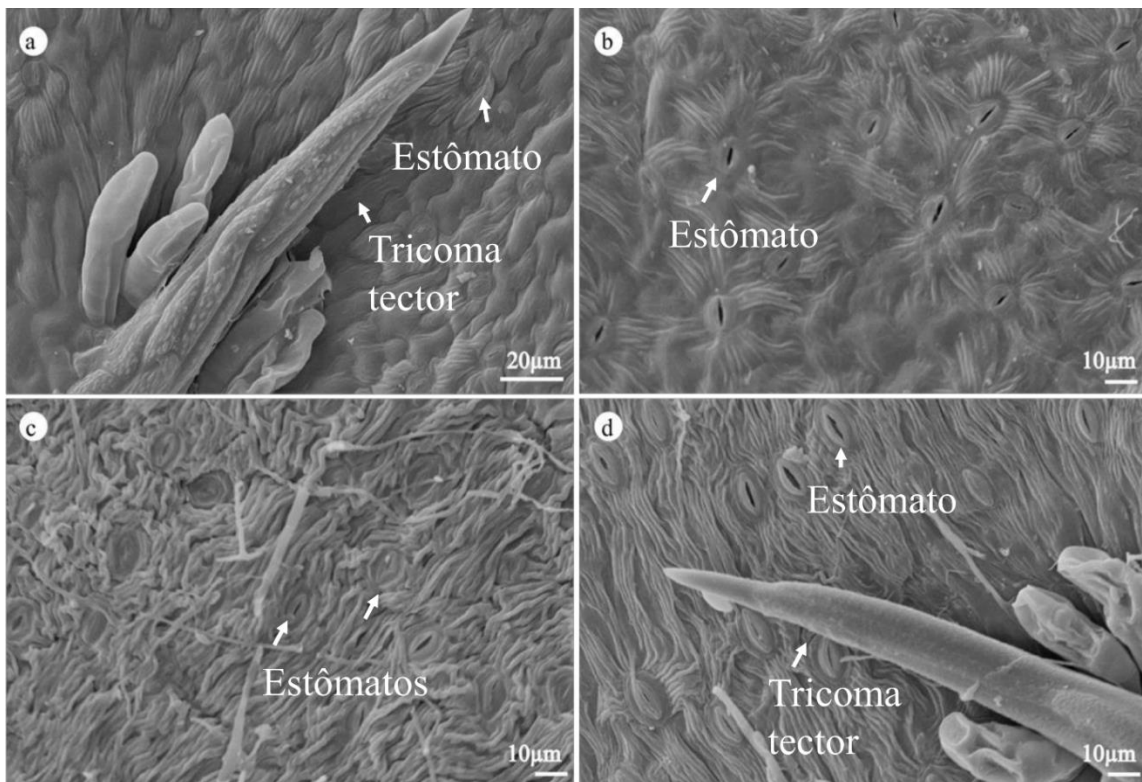


Fig. 2. Tricomas tectores e estômatos na face abaxial da epiderme da espécie *Pleroma estrelnense* em 1500m (a), 1700m (b), 1900m (c), 2100m (d) de altitude em uma floresta nebulosa em Itamonte, MG, Brasil. Barras: 10µm e 20 µm.

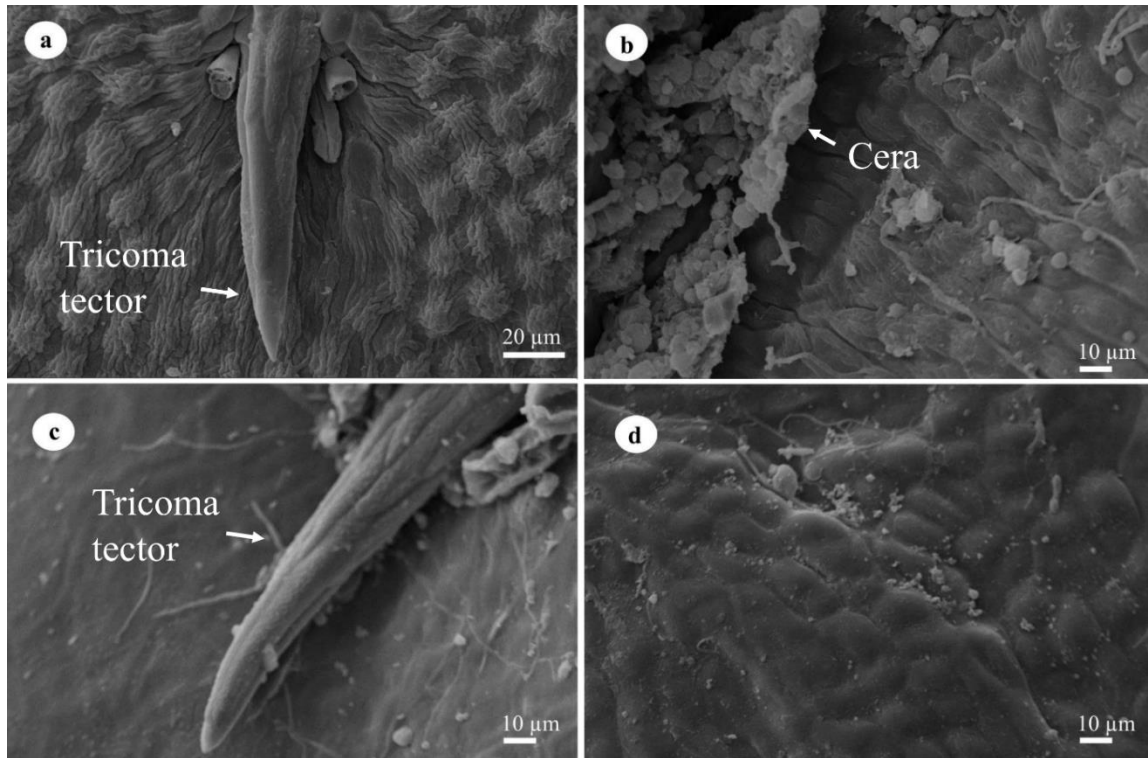


Fig. 3. Epiderme na face adaxial da espécie *Pleroma estrelense* (Raddi) P.J.F.Guim. & Michelang com tricoma tector e cera em destaque nas cotas altitudinais 1500m (a), 1700 m (b), 1900 m (c), 2100 (d) em uma floresta nebulosa em Itamonte, MG, Brasil. Barras: 10 μ m e 20 μ m.

Na secção transversal, as folhas de *P. estrelense* são revestidas externamente por uma espessa camada de cutícula adaxial, cuja espessura apresentou diferença significativa entre as cotas altitudinais, onde os indivíduos da cota 2100 m apresentaram maior espessura entre os demais (Tabela suplementar 1 e 2).

Conforme ilustrado nas secções transversais, as folhas de *P. estrelense* apresentaram o mesofilo dorsiventral, uma vez que o parênquima paliádico, formado por uma única camada de células, se encontra logo abaixo da face adaxial da folha, seguido pelo parênquima esponjoso, que se dispõe em várias camadas de células e espaços intercelulares (Fig. 4). Observou-se a presença de idioblastos como drusas e cristais de oxalato de cálcio no mesofilo (Fig. 4a, b, c, d). As epidermes das faces adaxial e abaxial apresentaram diferenças significativas entre as cotas altitudinais onde as médias foram maiores na cota de 2100 m (Fig. 4a, b, c, d) (Tabela Suplementar 1 e 2). Foi observada também uma diferença significativa nos parênquimas esponjoso e paliádico entre os indivíduos analisados nos gradientes de altitude, onde apresentaram médias maiores nas cotas mais altas (Fig. 4a, b, c, d) (Tabela suplementar 1 e 2), porém esses resultados não afetaram a espessura da folha.

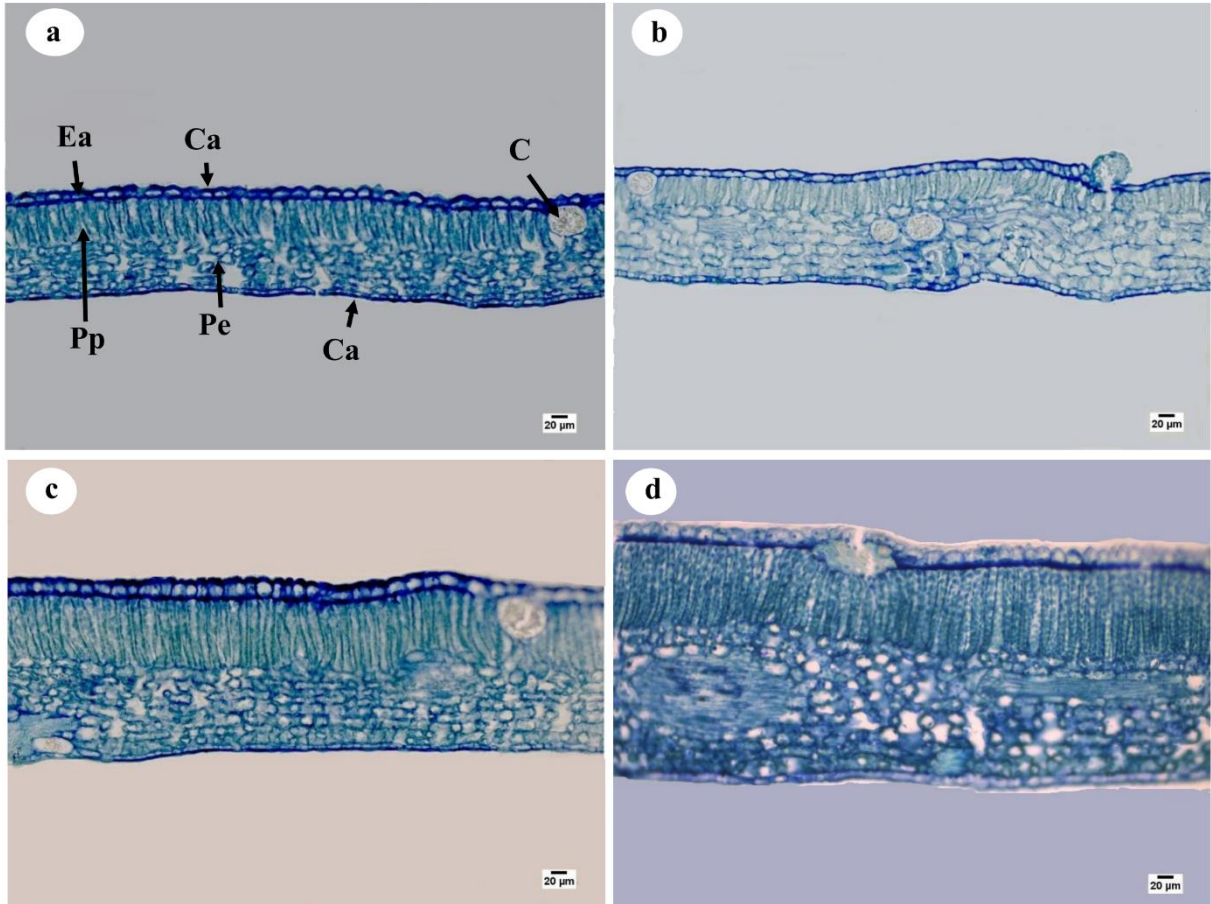


Fig. 4. Folha em secção transversal de *Pleroma estrelense* (Raddi) P.J.F.Guim. & Michelang 1500 m (a), 1700 m (b), 1900 m (c), 2100 (d) de altitude em uma floresta nebulosa em Itamonte, MG, Brasil. Barras: 20µm

A nervura central das folhas de *P. estrelense* é formada por uma camada de células epidérmicas com formato arredondado e isodiamétrico, apresenta em seus pólos o xilema circundado do floema. O feixe vascular é aberto do tipo bicolateral envolvidos por parênquima fundamental (Figure 5). A nervura central, o xilema e o floema apresentaram diferenças significativas entre os gradientes de altitude, onde foram significativamente maiores no gradiente de 2100 m (Figure 5 a,b, c, d), (Tabela suplementar 1 e 2).

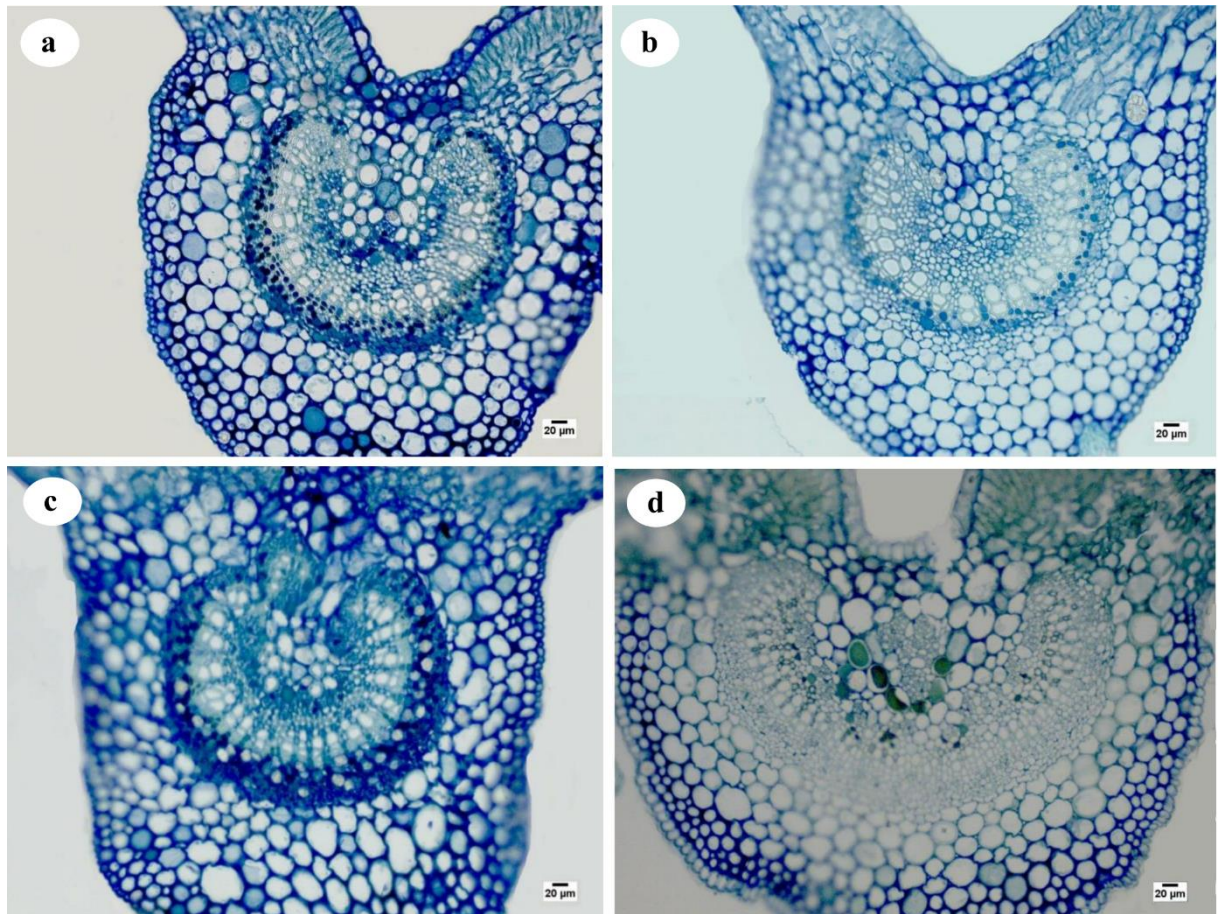


Fig. 5. Secção transversal da nervura central de *Pleroma estrelense* (Raddi) P.J.F.Guim. & Michelang 1500 m (a), 1700 m (b), 1900 m (c), 2100 m (d) de altitude em uma floresta nebulosa em Itamonte, MG, Brasil. Barras: 20µm

Caracterização anatômica do galho

O xilema secundário dos galhos (Figura 6) apresenta anéis de crescimento distintos, delimitados pelo achatamento das fibras. Observa-se que é necessária uma atenção especial quanto a esta característica, quanto à variação na espessura das paredes das fibras na superfície do plano transversal. Já que estas se apresentam como faixas mais escuras que se alternam com faixas mais claras e as faixas claras podem ser confundidas com linhas/faixas de parênquima axial.

A porosidade dos vasos é difusa, representada por 73,80% de vasos solitários com contorno angular e 26,20% de vasos múltiplos (geminados em sua maioria). A média do diâmetro tangencial dos elementos de vaso é de 34,47 µm, tendo a frequência média de 140,78/mm² e comprimento médio de 338,52 µm. Os raios são de duas larguras distintas: unisseriados e multisseriados (2 a 3 células) (Fig. 6).

Os elementos de vaso apresentam placa de perfuração simples e apêndices, que podem ou não ocorrer em uma ou em ambas as extremidades. As pontoações intervasculares são

escalariformes, pequenas, média de 5,2 μm . As fibras são libriformes curtas ou medianas, com o comprimento médio de 400,42 μm , diâmetro tangencial do lume de 9,75 μm , com parede espessa de 3,75 μm e septadas. O parênquima axial paratraqueal apresenta dois tipos: vasicêntrico e escasso, com 3 a 7 células de bainha na secção tangencial (Fig. 6).

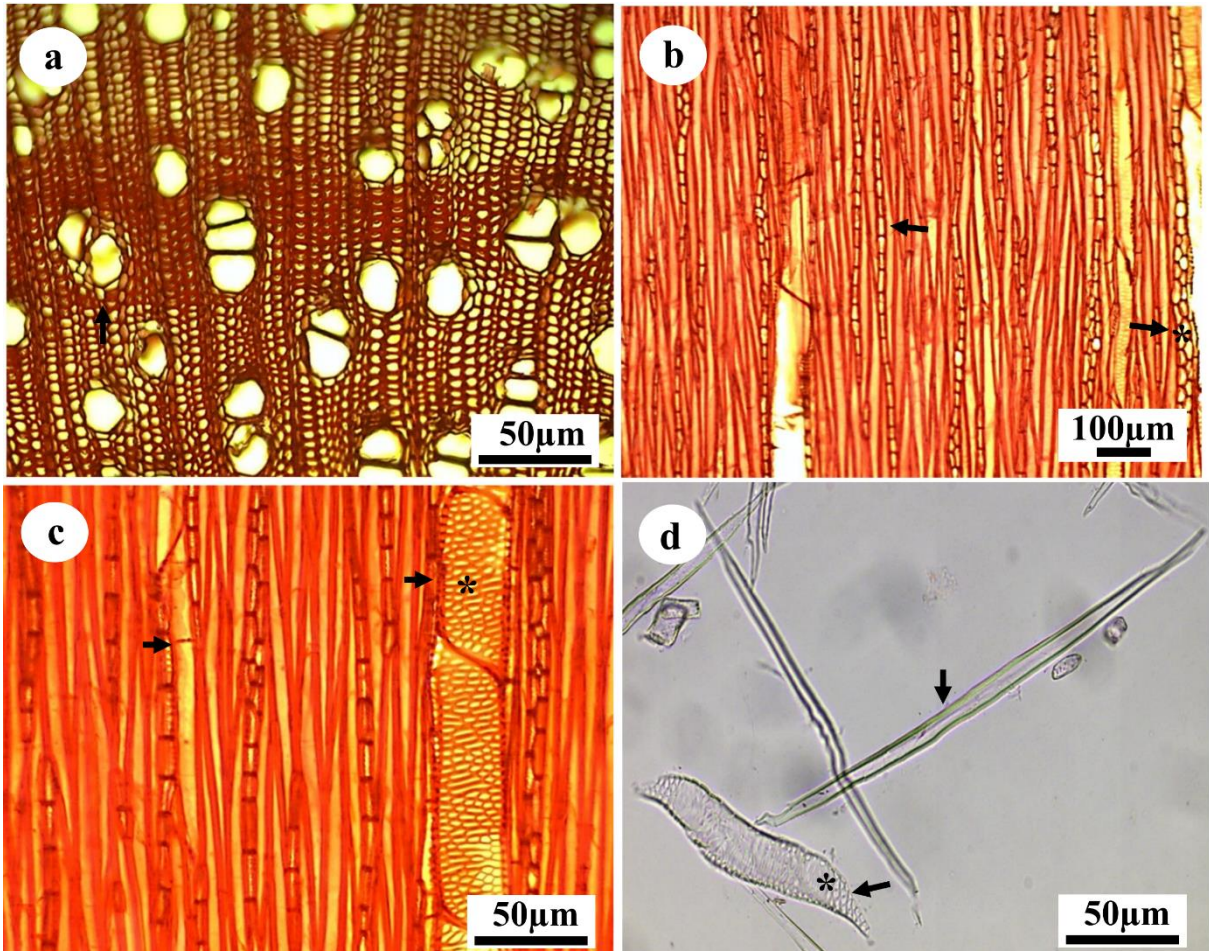


Fig. 6. Cortes dos galhos de *Pleroma estrelese* (Raddi) P.J.F.Guim. & Michelang em uma floresta nebulosa em Itamonte, Minas Gerais, Brasil. Barras: 50 μm e 100 μm . Fig. (a) secção transversal mostrando anéis de crescimento distintos por camadas de fibras com parede mais espessa. Fig. (b) secção tangencial com raios uni e multisseriados *. Fig. (c) secção tangencial, fibra septada e pontuações escalariformes *. Fig. (d) macerado do xilema mostrando a fibra libriforme e placa de perfuração simples *.

Os elementos de vaso apresentam um padrão entre as cotas tendo vasos solitários em sua maioria, com alguns geminados e múltiplos radiais. Não houve diferença estatística na densidade de vasos entre as cotas altitudinais analisadas (Tabela suplementar 1). Na cota 1500 os vasos solitários representaram 73,80% enquanto os vasos múltiplos de dois representaram 18,07% e os múltiplos de três com 8,13%. Na cota 1700m, vasos solitários representaram 80,93%, enquanto múltiplos de dois 12,53%, múltiplo de três 6,54%. Na cota altitudinal 1900

m 66,13% de vasos solitários, múltiplo de dois 21,08% e múltiplo de três 12,79%. Na cota altitudinal 2100 m 71,34 % dos vasos solitários, vasos múltiplos de dois 20,37% e múltiplos de três 8,29%.

O comprimento de vasos apresentou diferença significativa entre as cotas altitudinais, sendo menores na cota 1700m em relação às outras cotas analisadas (Tabela suplementar 1 e 2). Enquanto as fibras apresentaram diâmetro variável, com diferença significativa em seu comprimento, onde apresentaram valores maiores nas extremidades altitudinais 1500 e 2100m (Tabela suplementar 1 e 2).

Variáveis fisiológicas

Todas as variáveis fisiológicas analisadas apresentaram diferenças significativas entre as cotas altitudinais. As taxas fotossintéticas foram maiores nas cotas 1500 e 1700m de altitude quando comparada com as cotas 1900 e 2100m (Figure 19). Enquanto a condutância estomática e a transpiração foram maiores na cota altitudinal 1700m. A eficiência do uso da água apresentou diferença entre as cotas, com maiores resultados para a cota 1500m (Tabela suplementar 1 e 2).

Análise do solo

Existem diferenças significativas entre as propriedades do solo ao longo do gradiente de altitude (1500m, 1700m, 1900m e 2100m). Conforme ilustrado na tabela 1, há diferença em todas as propriedades do solo entre cotas. Na tabela 2, é possível visualizar as propriedades do solo e em quais cotas altitudinais as diferenças entre as variáveis são mais relevantes. Basicamente, os teores de areia e silte tendem a aumentar com a altitude, em detrimento do teor de argila, sugerindo menor intemperismo. Os teores de C orgânico aumentam intensamente com a altitude, o que se reflete também em maior acidez (maiores valores de pH, Al e Al+H), ao passo que os teores de bases trocáveis caem (Ca, Mg, K).

Tabela 1. Propriedades do solo em diferentes gradientes de altitude (1500m, 1700m, 1900m e 2100m de altitude) seguidas de valores de p para teste de normalidade por meio de ANOVA com comparações pareadas de Tukey e Kruskal-Wallis comparações pareadas do Teste de Dunn em uma floresta altomontana em Itamonte, MG, Brasil ($p \leq 0,05$).

	Shapiro-Wilk (p value)	Anova (p value)	Kruskal-Wallis (p value)	
Areia	2,66E-05	-	0,001017	*
Silte	0,09299	1,46E-07	-	*
Argila	0,04896	-	1,38E-07	*
PH	0,003697	-	1,09E-06	*
P	1,31E-10	-	4,60E-07	*
K	4,85E-07	-	2,79E-07	*
Ca ²⁺	4,41E-12	-	4,82E-10	*
Mg ²⁺	4,23E-11	-	2,84E-10	*
Al ³⁺	0,2862	1,85E-08	-	*
H+Al	0,02378	-	2,07E-08	*
SB	4,77E-11	-	8,90E-09	*
(t)	0,2255	3,89E-05	-	*
(T)	0,0002802	-	2,88E-07	*
V	6,34E-11	-	4,75E-09	*
m	3,55E-08	-	1,71E-08	*
MO	0,003142	-	3,93E-10	*
P-rem	0,0003123	-	2,33E-08	*

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão (DP) das propriedades do solo em diferentes gradientes de altitude (1500m, 1700m, 1900m e 2100m de altitude). Grupos estatisticamente semelhantes no nível de $p \leq 0,05$ são indicados com as mesmas letras minúsculas, conforme testado por meio de ANOVA com comparações pareadas de Tukey e Kruskal-Wallis seguido de Dunn test.

	1500	1700	1900	2100
Areia	15,66 ± 0,99 b	16,8 ± 1,08 b	22,13 ± 2,85 ab	24,8 ± 1,53 a
Silte	27,4 ± 1,42 b	27,4 ± 1,07 b	38,8 ± 1,82 a	36,4 ± 1,58 a
Argila	56,93 ± 1,99 a	55,8 ± 0,98 a	39,06 ± 3,02 b	38,8 ± 2,10 b
PH	5,12 ± 0,06 a	4,50 ± 0,07 b	4,66 ± 0,07 b	4,37 ± 0,06 c
P	2,29 ± 1,01 b	1,32 ± 0,09 b	3,62 ± 0,32 a	3,36 ± 0,27 a
K	133,06 ± 9,57 a	84 ± 6,43 b	64,2 ± 2,87 c	69,6 ± 3,10 b
Ca ²⁺	1,61 ± 0,28 a	0,22 ± 0,06 b	0,10 ± 0,006 b	0,1 ± 3,71E-18 b
Mg ²⁺	0,76 ± 0,073 a	0,2 ± 0,06 b	0,1 ± 3,71E-18 b	0,1 ± 3,71E-18 b
Al ³⁺	1,49 ± 0,18 b	2,47 ± 0,24 a	2,42 ± 0,22 a	3,86 ± 0,24 a
H+Al	11,26 ± 0,66 b	16,30 ± 0,93 a	16,94 ± 0,72 a	24,36 ± 1,26 a
SB	2,72 ± 0,36 a	0,64 ± 0,11 b	0,37 ± 0,01 b	0,37 ± 0,01 b
(t)	4,22 ± 0,29 a	3,11 ± 0,19 b	2,79 ± 0,22 b	4,23 ± 0,24 a
(T)	13,99 ± 0,49 c	16,97 ± 0,86 b	17,33 ± 0,72 b	24,74 ± 1,26 a
V	20,01 ± 2,88 a	4,29 ± 1,05 b	2,19 ± 0,11 b	1,58 ± 0,09 c
m	38,32 ± 5,01 c	77,46 ± 4,36 b	85,08 ± 1,54 a	90,57 ± 0,65 a
MO	5,44 ± 0,26 b	6,49 ± 0,14 b	11,54 ± 0,55 a	11,64 ± 0,49 a
P-rem	10,18 ± 0,56 a	8,28 ± 0,21 a	3,21 ± 0,61 b	3,75 ± 0,59 b

Tabela 3. Modelo linear mostra a correlação entre as variáveis anatômicas e fisiológicas com as cotas altitudinais. Das variáveis que apresentaram diferença significativa (ANOVA), apenas o comprimento de vaso e fibra não sofreram influência nas cotas em que as plantas estão inseridas.

Variáveis	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
Área foliar	-0.0008796	0.0002913	-3.020	0.00736	**
Densidade estomática	-0.0008796	0.0002913	-3.020	0.00736	**
Diâmetro equatorial	0.0003333	0.0001169	2.851	0.010606	*
Cutícula	0.0003631	0.0001330	2.730	0.01374	*
Epiderme adaxial	0.0008690	0.0002307	3.767	0.00141	**
Epiderme abaxial	0.0004749	0.0001110	4.279	0.000452	***
Parênquima lacunoso	0.0004711	0.0001423	3.31	0.0039	**
Parênquima paliçádico	0.0008989	0.0001855	4.846	0.00013	***
Nervura central	0.0005473	0.0001281	4.271	0.000459	***
Xilema	0.0005473	0.0001281	4.271	0.000459	***
Floema	0.0004525	0.0001703	2.657	0.0161	*
Comprimento de vaso	9,84E-03	1,30E-01	0.076	0.94	-
Comprimento de fibra	0.0001535	0.0001137	1.35	0.194	-
Fotossíntese	-0.0015499	0.0006319	-2.453	0.02459	*

Significado dos códigos: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '- ' não significativo.

Tabela 4. Relação entre as variáveis explicativas (solo) com as variáveis anatômicas e fisiológicas, como dependentes, obtidas através de regressão simples.

Variável resposta	Variável preditora	R²	Valor de P
Área foliar	pH	0.5175	0.0002112
Área foliar	K	0.4032	0.001569
Área foliar	Ca	0.4746	0.0004691
Área foliar	Mg	0.4581	0.0006276
Área foliar	Al	0.3472	0.003707
Área foliar	Hal	0.3372	0.004292
Área foliar	SB	0.4669	0.0005386
Área foliar	V	0.4705	0.0005049
Área foliar	m	0.4638	0.0005685
Densidade estomática e ph?			
Densidade estomática	K	0.4032	0.001569
Densidade estomática	Ca	0.4746	0.0004691
Densidade estomática	Mg	0.4581	0.0006276
Densidade estomática	Al	0.3472	0.003707
Densidade estomática	H+AL	0.3372	0.004292
Densidade estomática	SB	0.4669	0.0005386
Densidade estomática	T	0.2586	0.01285
Densidade estomática	V	0.4705	0.0005049
Densidade estomática	m	0.4638	0.0005685
Cutícula	Areia	0.3177	0.005685
Cutícula	T	0.3198	0.005518
Epiderme abaxial	Areia	0.3738	0.002482
Epiderme abaxial	pH	0.4772	0.0004478
Epiderme abaxial	Ca	0.2988	0.007424
Epiderme abaxial	Mg	0.3069	0.00663
Epiderme abaxial	Al	0.5993	3,74E-02
Epiderme abaxial	H+AL	0.5883	4.81e-05
Epiderme abaxial	SB	0.3009	0.007204
Epiderme abaxial	T	0.5818	5,56E-02
Epiderme abaxial	V	0.3221	0.005341
Epiderme abaxial	m	0.3744	0.002461
Epiderme adaxial	Areia	0.298	0.007504
Epiderme adaxial	pH	0.4776	0.0004449
Epiderme adaxial	K	0.3013	0.007165
Epiderme adaxial	Ca	0.339	0.004181
Epiderme adaxial	Mg	0.3406	0.004083
Epiderme adaxial	Al	0.5055	0.0002657
Epiderme adaxial	H+ Al	0.4949	0.0003239
Epiderme adaxial	SB	0.3386	0.004207
Variável resposta	Variável preditora	R²	Valor de P

Epiderme adaxial	V	0.3549	0.003307
Epiderme adaxial	m	0.3905	0.001918
Parênquila esponjoso	pH	0.5491	0.0001121
Parênquila esponjoso	K	0.3784	0.002314
Parênquima esponjoso	Ca	0.4507	0.0007133
Parênquima esponjoso	Mg	0.4371	0.0009003
Parênquima esponjoso	Al	0.428	0.001047
Parênquima esponjoso	H+AL	0.4134	0.00133
Parênquima esponjoso	SB	0.4438	0.0008034
Parênquima esponjoso	m	0.4602	0.0006057
Parênquima esponjoso	V	0.4526	0.0006905
Parênquima esponjoso	Areia	0.4363	0.0009114
Parênquima Paliçadico	Argila	0.3214	0.005391
Parênquima Paliçadico	pH	0.5304	0.0001638
Parênquima Paliçadico	Ca	0.4441	0.0007996
Parênquima Paliçadico	Mg	0.4568	0.0006426
Parênquima Paliçadico	Al	0.5659	7,88E-02
Parênquima Paliçadico	H+AL	0.5704	7,15E-02
Parênquima Paliçadico	SB	0.4489	0.0007359
Parênquima Paliçadico	T	0.5178	0.0002097
Parênquima Paliçadico	V	0.4667	0.0005396
Parênquima Paliçadico	Prem	0.3614	0.003
Nervura Central	Areia	0.4822	0.0004093
Nervura Central	Argila	0.2939	0.007943
Nervura Central	Al	0.5846	5,23E-02
Nervura Central	H+AL	0.5877	4,88E-02
Nervura Central	T	0.6795	4,78E-03
Xilema	Areia	0.4606	0.0006012
Xilema	pH	0.3117	0.006195
Xilema	Al	0.6673	6,73E-03
Xilema	H+AL	0.6579	8,71E-03
Xilema	T	0.7473	5,41e-07
Xilema	MO	0.2514	0.01413
Floema	H+AL	0.2646	0.01186
Floema	Al	0.2582	0.01291
Floema	T	0.3258	0.005063
Comprimento de vaso	t	0.5805	5,73E-02
Fotossíntese	Areia	0.2662	0.0116
Fotossíntese	Argila	0.3441	0.003877
Fotossíntese	Silte	0.3729	0.002516
Fotossíntese	P	0.3625	0.002948
Fotossíntese	MO	0.3387	0.0042
Fotossíntese	Prem	0.3402	0.004107

Os dados referentes a transpiração, condutância estomática, diâmetro equatorial estomático e o Índice de Vulnerabilidade apresentaram correlações baixas em relação ao solo, com $R^2 < 0,25$ por isso não foram mostrados.

Discussão

A análise geral dos resultados permitiu uma correlação entre os fatores edáficos e as características anatômicas e fisiológicas da espécie *P. estrelense*. Em apoio à nossa hipótese, as características anatômicas e as trocas gasosas da espécie *P. estrelense* se modificam ao longo da variação altitudinal, determinando assim, as características da planta. Além disso, os fatores edáficos mostraram uma correlação nas alterações de estrutura e fisiologia das plantas, e ajudaram a elucidar as modificações nos indivíduos da *P. estrelense* ao longo do gradiente altitudinal.

As florestas altomontanas nebulares são ricas em biodiversidade, provavelmente pela rápida mudança nas condições climáticas em distâncias geográficas curtas, onde as condições abióticas de altas altitudes podem ser hostis às plantas, devido à baixa temperatura, alta radiação solar, vento forte e, neblina (Wieser 2007). Tais características influenciam na diversidade vegetal ao longo do gradiente altitudinal, logo, a riqueza de espécies que se encontra nessas formações vegetais é resultado das condições ambientais e do isolamento biogeográfico sob o qual esse ecossistema de montanha evoluiu, abrigando assim muitas espécies endêmicas (Soares *et al.* 2016).

No caso da altitude, promotora de diferenças significativas encontradas, por sintetizar importantes variáveis geográficas e climáticas, gerando impactos na relação solo/planta. À medida que a aumenta a altitude, os indivíduos apresentam significativas modificações. Essas alterações anatômicas nos tecidos foliares da espécie *P. estrelense* apresentaram uma aclimatação em resposta as condições edafoclimáticas diferentes ao longo do gradiente altitudinal, onde a maioria das características anatômicas foliares, convergem para maiores alterações na cota mais alta (2100 m), sendo elas: densidade estomática, diâmetro equatorial, cutícula na face adaxial, epiderme nas faces adaxial e abaxial, parênquima paliçádico e esponjoso, nervura central (xilema e floema).

As folhas apresentaram parênquima paliçádico mais espesso e uma área foliar menor a 2100 m de altitude. Embora uma grande área foliar favoreça a planta na absorção da luz solar, folhas grandes se tornam desvantajosas devido à vulnerabilidade a ventos fortes, característicos dessas regiões, com maiores perdas de água para o meio (Takahashi 2014; Ohdo e Takahashi 2020). Já o parênquima paliçádico mais espesso seria uma forma de compensar a área foliar menor, já que esse tecido facilita um coeficiente de extinção de luz mais alto, favorecendo a taxa fotossintética (Asmar *et al.* 2013). Logo, as folhas que se desenvolveram sob altos níveis de radiação presentes na cota 2100 m ajustaram a sua morfologia, como o espessamento do

mesófilo, permitindo que a planta tenha melhor troca gasosa (Zhu *et al.* 2015; Liu e Su 2016). Assim como a espécie *P. estrelense*, em outros estudos realizados em florestas altomontanas as espécies também apresentaram uma redução na área foliar (Ohdo e Takahashi 2020) e parênquima paliçádico mais espesso (Souza *et al.* 2014; Kuster *et al.* 2016) em altitudes elevadas.

Assim como *P. estrelense* apresentou epiderme adaxial e abaxial, parênquima paliçádico e esponjoso maiores na cota 2100 m, o estudo realizado na Serra da Mantiqueira (Souza *et al.* 2014) com a espécie *Myrsine coreiacea* (Sw.) R.Br. ex Roem. & Schult) também apresentou resultados semelhantes nessa altitude. A formação de epiderme mais espessa parece estar relacionada a proteção contra o excesso de radiação, refletindo a irradiância excessiva, evitando assim a perda de água e a volatilização (Coupe *et al.* 2006; Ivancich *et al.* 2012). Por outro lado, o maior investimento no parênquima paliçádico e esponjoso seria um mecanismo de aclimação para aumentar a fixação de carbono (Gratani *et al.* 2006; Niinemets *et al.* 2009).

Diferenças morfológicas como densidade estomática e o diâmetro equatorial maiores têm o potencial de influenciar o funcionamento dos estômatos, e conseqüentemente a fotossíntese, condutância e o uso eficiente da água (Haworth *et al.* 2018). Assim, *P. estrelense* investiu em uma maior produção de estômatos nos indivíduos da cota altitudinal 2100 m para melhor captação de CO₂ atmosférico nessas altitudes (Dickison 2000), promovendo assim uma aclimação ao ambiente. Além disso, *P. estrelense* possui folhas hipoestomáticas, o que possibilita um melhor controle da perda de água através da transpiração (Evans e Loreto 2000).

A densidade estomática é constante entre indivíduos da mesma espécie, podendo sofrer alterações devido aos fatores ambientais como salinidade do solo, radiação, altitude, temperatura (Castro *et al.* 2009; Oliveira *et al.* 2016). Condições estas que influenciaram nos indivíduos da espécie *P. estrelense* aumentando a densidade à medida que ascendia as cotas altitudinais. Outro fator delimitante em florestas nebulares é a lâmina d'água que se forma nas folhas devido às constantes neblinas que ocorrem no local, reduzindo a velocidade de absorção do CO₂ em até 10⁴ vezes mais lento através da água do que pelo ar (Brewer e Smith 1997). Fator que também pode ter influenciado as taxas fotossintéticas dos indivíduos da espécie *P. estrelense*, onde as taxas fotossintéticas foram inversamente proporcionais à altitude.

Os feixes vasculares foliares (xilema, floema e a nervura central) também apresentaram valores significativos maiores na cota 2100 m, com conseqüentes alterações no sistema vascular (no diâmetro) implicando em maior condutância hídrica para a planta, favorecendo a condução hídrica da planta nas cotas altitudinais mais altas (Castro *et al.* 2009). Devido a quantidade de chuvas orogênicas que ocorrem nas florestas altomontanas nebulares, propicia-se uma

facilidade na absorção de água pelas folhas, proporcionando que a planta tenha os feixes vasculares com os diâmetros maiores nessa cota. Ademais, as consequências fisiológicas positivas, a absorção da água pelas folhas em ambiente com neblina é uma estratégia benéfica para as plantas (Limm *et al.* 2009).

Já as características da madeira têm uma variação anatômica menor do que as folhas entre os indivíduos da espécie *P. estrelense*, mostrando poucas alterações entre as cotas altitudinais. Os vasos condutores dos galhos dos indivíduos, por exemplo, apresentaram menor comprimento dos vasos na cota 1700 m garantindo maior resistência ao fluxo da água (Baas *et al.* 2004) e apresentaram o menor índice de vulnerabilidade de Carlquist. Esses índices retratam a relação dos elementos de vaso com o ambiente, onde o menor comprimento do vaso garante uma segurança hídrica para as plantas presentes na cota altitudinal 1700 m. Ao contrário do que foi encontrado nas demais cotas altitudinais, onde os vasos apresentaram maior comprimento dos vasos condutores, o que caracteriza em uma menor resistência da água, consequentemente melhorando a condutância hídrica na planta, porém ficando mais susceptíveis à cavitação (Vico *et al.* 2017; Tng *et al.* 2018).

O comprimento das fibras também apresentou valores menores na cota 1700 m de altitude. As fibras são o principal tecido de resistência mecânica nas angiospermas e a espessura da parede da fibra varia entre as espécies (Pratt *et al.* 2007). Longui *et al.* (2012) sugere que em regiões montanhosas as paredes das fibras sejam mais espessas nas áreas mais altas, tornando-as mais resistentes, porém no presente trabalho as fibras não apresentaram diferenças na espessura ao longo das altitudes. Santos *et al.* (2021) em um estudo com a espécie *Clethra scabra* Pers, na Serra da Mantiqueira, analisaram as características da anatomia do galho e verificaram que houve uma diminuição no comprimento dos elementos de vaso com o aumento da altitude na cota de 2100 m. Assim como o comprimento e diâmetro das fibras diminuíram com elevação da altitude.

Adicionalmente, vários estudos em florestas altomontanas mostraram que a altitude também é responsável pelas alterações nos teores de nutrientes e propriedades do solo, causando mudanças na matéria orgânica e no carbono da biomassa microbiana (por exemplo, Benavides e Vitt 2014; Mendoza *et al.* 2020). Isso ocorre, devido às baixas temperaturas presentes nessas florestas que são responsáveis por retardar o intemperismo do solo, tornando-o mais raso e com menor capacidade de retenção de água havendo, portanto, menos água para as plantas.

Como era esperado, o solo apresentou maior acidez nas cotas 1900 m e 2100 m devido à lenta decomposição da serapilheira que se acumula devido ao clima frio e úmido durante a maior parte do ano nesses ambientes, ainda que a biomassa vegetal seja menor nas áreas mais

altas (Cooper *et al.* 2015; Hribljan *et al.* 2015; Soares *et al.* 2016). Temos como resultado decorrente uma maior acidez (Al, Al+H) dada a grande quantidade de matéria orgânica no solo e grande humificação do material orgânico produzindo grupos COOH, que acidificam o solo ao protonar (Silva Neto *et al.* 2018). Tal efeito pode causar alterações na absorção de nutrientes essenciais a planta como o cálcio e magnésio, promovendo baixa produção de clorofila e atividade fotossintética das plantas (Ordoñez *et al.* 2009).

Em acréscimo, os teores disponíveis de Ca, Mg e K mostraram-se em menor quantidade nas cotas mais altas, o que pode ter contribuído para uma menor taxa fotossintética dos indivíduos da espécie *P. estrelense*, presentes nessas cotas. Arelado a isso, o teor de areia foi maior à medida que a altitude se eleva e o teor de argila menor, resultado do menor intemperismo nas cotas altas devido a menores temperaturas, característica de floresta nebulosa (Silva Neto *et al.* 2018). Ohdo e Takahashi (2020) verificaram em um estudo em florestas nebulosas que além da altitude, a quantidade de nitrogênio disponível no solo para as plantas foi um importante filtro na disposição de espécies na comunidade vegetal presente. Embora o teor de N total nos solos não tenha sido determinado, é extremamente provável que sejam maiores com o aumento de altitude, uma vez que são sempre proporcionais aos teores de C orgânico. O cálcio, essencial ao crescimento da raiz, e pode limitar seu desenvolvimento quando encontrado em níveis baixos como o apresentado nas cotas altas (Raij, 1991). Desta forma, os prováveis maiores teores de N podem não favorecer a atividade fotossintética, uma vez que os níveis de Ca e Mg são baixos, resultando em desbalanço nutricional.

P. estrelense apresentou adaptações em suas características anatômicas e fisiológicas para suportar as condições abióticas presentes nas formações mais altas, demonstrando que há uma plasticidade adaptativa em espécies que apresentam amplo potencial de aclimação. Assim como outros estudos com árvores de florestas nebulosas (Eller *et al.* 2013), neste trabalho pudemos perceber o quanto esses mecanismos estão interligados. Apesar da importância ecológica e econômica das espécies arbóreas, ainda são poucos os trabalhos com anatomia de folha e do galho em florestas altomontanas, por exemplo, Santos *et al.* (2020), assim como ausência de trabalhos até o momento que avaliam as interações: solo/altitude/anatomia vegetal de folhas e galhos em floresta nebulosa no Brasil.

Florestas de montanha são importantes ecossistemas com alto valor de conservação (Scherrer *et al.* 2011). Estudos similares ao aqui apresentado devem ser realizados com outras espécies em florestas altomontanas nebulosas, mas os resultados desse trabalho aumentam nossa compreensão com base nas alterações da espécie (características anatômicas, fisiológicas) e suas interações com o solo em florestas altomontanas. O entendimento de como as espécies

se comportam nesses ambientes é importante para o desenvolvimento de uma compreensão preditiva dos efeitos das mudanças climáticas sobre essas formações vegetais, já que o aumento da temperatura nessas regiões diminuiria a formação de neblinas, e se tornariam uma ameaça à biodiversidade presente nesses ambientes condicionados a temperaturas mais baixas.

O sucesso da espécie *P. estrelense* em se manter e persistir em diferentes altitudes está relacionado à sua adaptação anatômica e fisiológica. Modificações nos tecidos das folhas e galhos da espécie e sua relação com os fatores edáficos foram relevantes para o sucesso da espécie em uma floresta nebulosa na RPPN Alto Montana. O conhecimento sobre a anatomia e fisiologia vegetal em florestas nebulosas nos trópicos avançou substancialmente, entretanto ainda há várias questões a serem elucidadas e este estudo vem agregar conhecimentos sobre o tema, é o primeiro trabalho a respeito da caracterização da espécie *Pleroma estrelense*. Este trabalho também contribuiu sobre a condutividade hidráulica de uma espécie arbórea em uma floresta nebulosa, além de acrescentar sobre a correlação com propriedades do solo com anatomia vegetal em uma floresta nebulosa.

Conclusões

Como podemos constatar com os resultados das características anatômicas e trocas gasosas, além dos modelos lineares e a regressão simples, a altitude e o solo são responsáveis por grandes alterações na anatomia e nas trocas gasosas da espécie *P. estrelense*, influenciando a maioria das variáveis do estudo. O aumento da temperatura e as mudanças climáticas são cenários previstos para o futuro e aumentam a importância em compreender os mecanismos das plantas em sobreviver nesses ambientes, sendo assim necessários mais trabalhos como o aqui apresentado, fornecendo bases para o entendimento do funcionamento das espécies em florestas nebulares.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa. À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento e bolsas de pesquisa concedidas para realizar o presente estudo. À RPPN alto-Montana pelo apoio e acesso à área de estudo. Ao professor Marco Aurélio L. Fontes por ceder os dados do solo nas cotas altitudinais em Itamonte, Minas Gerais.

Referências

- Asmar AS, Castro EM, Pasqual M, Pereira FJ, Soares JDR (2013) Changes in leaf anatomy and photosynthesis of micropropagated banana plantlets under different silicon sources. *Scientia Horticulturae*. **0304-4238** <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.07.021>.
- Baas P, Ewers FW, Davis SD, Wheeler EA (2004) Evolution of xylem physiology. In: *The Evolution of Plant Physiology* (eds Hemsley, A.R. & Poole, I.). Elsevier Academic Press, London, San Deigo, pp. **273–295**.
- Barbosa L M, Shirasuna R T, Lima F C, Ortiz P R T (2017) Lista de espécies indicadas para restauração ecológica para diversas regiões do Estado de São Paulo. São Paulo: Instituto de Botânica. 344 p.
- Barton K, MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.15.1. (2015) Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>>. Acesso em: 13 set. 2018.
- Bates D, Mächler M, Bolker, B, Walker S (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, **67**(1), 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Benavides JC, Vitt DH (2014) Response curves and the environmental limits for peat-forming species in the northern Andes. *Plant Ecol*. **2014;215:937-52**. <https://doi.org/10.1007/s11258-014-0346-7>.
- Benites V M, Schaefer C E G R, Simas F N B, Santos H G (2007) Soils associated with rock outcrops in the Brazilian mountain ranges Mantiqueira and Espinhaço. *Rev Bras Bot* **30**: 569-577, 2007.
- Brewer CA, Smith WK (1997) Patterns of leaf surface wetness for montane and subalpine plants. *Plant, Cell & Environment* **20**: 1–11.
- Carlquist, S (2001) *Comparative wood anatomy: systematic, ecological and volutionary*. New York: Springer, **418 p**.
- Cooper D J, Kaczynski K, Slayback D, Yager K (2015) Growth and organic carbon production in peatlands dominated by *Distichia muscoides*, Bolivia, South America. *Arct Antarct Alp Res*. **2015**; 47:505-10. <https://doi.org/10.1657/AAAR0014-060>.
- Coupe SA, Palmer BG, Lake JA, Overy SA, Oxborough K, Woodward FI, Gray JE, Quick WP (2006) Systemic signalling of environmental cues in *Arabidopsis* leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**, 329–341. doi:10.1093/jxb/erj033.
- Cruz B, de Castro, E M, Cardoso, M, de Souza, K F, Machado, S Pompeu, P V, Fontes, M (2014) Comparison of leaf anatomy and essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers in a montane cloud forest in Itamonte, MG, Brazil. *Botanical studies*, **55**(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s40529-014-0041-y>.
- Dickison WC (2000) *Integrative Plant Anatomy*. Academic Press, USA, **533 p**. DUZ, S.R.; SIMIN.
- Eller C B, Lima A L, Oliveira R S (2013) Foliar uptake of fog water and transport belowground alleviates drought effects in the cloud forest tree species, *Drimys brasiliensis* (Winteraceae).

Department of Plant Biology, Institute of Biology, University of Campinas – UNICAMP, CP6109, Campinas, So Paulo, Brazil.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos análises de solos. Rio de Janeiro: Embrapa, 1997. 212 p.

Evans J, Loreto F (2000) Acquisition and diffusion of CO₂ in higher plant leaves. In: Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S (eds) Photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration, vol 9. Springer, Dordrecht, pp 321–351. https://doi.org/10.1007/0-306-48137-5_14

Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB606917>>. Acesso em: 24 jan. 2021

França GS, Stehmann JR (2004) Composição florística e estrutura do componente arbóreo de uma floresta altimontana no município de Camanducaia, Minas Gerais, Brasil. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 19-30.

Franklin, G. L. Preparation of thin sections of synthetic resin and wood: resin composites, and a new macerating method for wood. Nature, London, v. 155, n. 3924, p. 51, 1945.

Fox J, Weisberg S (2019) An R Companion to Applied Regression, Third edition.

Fundação SOS Mata Atlântica; Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (Brasil). Atlas dos remanescentes florestais da mata atlântica período 2016-2017. Relatório Técnico. São Paulo, 2018. 63 p.

Gratani L, Covone F, Larcher W (2006) Leaf plasticity in response to light of three evergreen species of the Mediterranean maquis. Trees **20**:549–558. <https://doi.org/10.1007/s00468-006-0070-6>

Haworth M, Scutt C P, Douthe C, Marino G, Gomes M T G, Loreto, Flexas J, Centritto M (2018) Allocation of the epidermis to stomata relates to stomatal physiological control: stomatal factors involved in the evolutionary diversification of the angiosperms and development of amphistomaty. Environ. Exp. Bot. **151**, 55–63. doi: 10.1016/j.envexpbot.2018.04.010

Higuchi P, Silva A C, Almeida J A, Bortoluzzi, R L C, Mantovani A, Ferreira T S, Souza S T, Gomes J P, Silva K M (2013) Florística e estrutura do componente arbóreo e análise ambiental de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista Alto-montana no município de Painel, SC. Ciência Florestal, Santa Maria, v. 23, n. 1, p. 153-164.

Hribljan JA, Cooper DJ, Sueltenfuss J, Wolf EC, Heckman KA, Lilleskov EA, Chimner RA. (2015) Carbon storage and long-term rate of accumulation in high altitude Andean peatlands of Bolivia. Mires Peat. **15**:12.

Iawa Committee International Association of Wood Anatomists (1989). List of microscopic features for hardwood identification. **IAWA Bulletin**, v. 10, n. 3, p. 220-332, 1989.

Ivancich HS, Lencinas MV, Pastur GJM, Esteban RMS, Hernández L, Lidstrom I (2012) Foliar anatomical and morphological variation in *Nothofagus pumilio* seedlings under controlled irradiance and soil moisture levels. Tree Physiol **32**:554–564. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps024>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Manual Técnico da Vegetação Brasileira. Rio de Janeiro (2012) 271 p.

Jari Oksanen, F. Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan McGlenn, Peter R. Minchin, R. B. O'Hara, Gavin L. Simpson, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Eduard Szoecs and Helene Wagner (2020). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-7. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Jarvis A, Mulligan M (2011) The climate of cloud forests. *Hydrological Processes* **25**: 327–343. <https://doi.org/10.1002/hyp.7847>

Johansen D A (1940) Plant microtechnique. New York: McGraw Hill, 523 p.

Kier G, kreft H, Lee TM, Jetz W, Ibisch P L, Nowicki C, Mutke J, Barthlott W (2009) A global assessment of endemism and species richness across island and mainland regions. *PNAS*, [s. l.], v. **106**, n. 23, jun. DOI: 10.1073 pnas.081030610.

Koche Marcon, Amanda & Silva, Ana & Higuchi, Pedro & Ferreira, Tiago & Missio, Francieli & Salami, Bruna & Rosa, Angélica & Negrini, Marcelo & Bento, Marco & Júnior, Fernando. (2014). Variação florístico-estrutural em resposta à heterogeneidade ambiental em uma floresta nebulosa em Ububici, Planalto Catarinense. *Scientia Forestalis/Forest Sciences*. 42. 439-450.

Kraus J E, Arduin M (1997) Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro: EDUR, 198 p.

Kuster V C, Castro S A B de, Vale F H A (2016) Photosynthetic and anatomical responses of three plant species at two altitudinal levels in the Neotropical savannah. *Australian Journal of Botany*, Clayton, v. **64**, n. 8, p. 696-703.

Lei Mata Atlântica nº 11.428/2006. Dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica, e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/111428.htm

Limm E B, Simonin K A, Bothman A G, Dawson, TE (2009) Foliar water uptake: a common water acquisition strategy for plants of the redwood forest. *Oecologia*, **161**(3), 449-459. DOI 10.1007/s00442-009-1400-3.

Liu W, Su J (2016) Effects of light acclimation on shoot morphology, structure, and biomass allocation of two *Taxus* species in southwestern China. *Sci Rep* 6:35384. <https://doi.org/10.1038/srep35384>.

Maia, V A, Santos, A, de Aguiar-Campos, N, de Souza, CR, de Oliveira, M, Coelho, P A, Morel, J D, da Costa, L S, Farrapo, CL, Fagundes, N, de Paula, G, Santos, PF, Gianasi, F M, da Silva, W B, de Oliveira, F, Girardelli, D T, de Carvalho Araújo, F, Vilela, T A, Pereira, R T, da Silva, L, Dos Santos, R M (2020) The carbon sink of tropical seasonal forests in southeastern Brazil can be under threat. *Science advances*, **6**(51), eabd4548. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd4548>.

Mariano RF, Rezende VL, Mendes CN, Santos RM dos, Souza C R de, Machado FS, Pompeu Patrícia Vieira, Carvalho, W A C, Fontes M A L (2020) Phylogenetic beta diversity in an upper

montane Atlantic Forest along an altitudinal gradient. *Plant Ecol* **221**, 671–682. <https://doi.org/10.1007/s11258-020-01041-0>.

Maurício Bergamini Scheer, Alan Yukio Mocoichinski, Carlos Vellozo Roderjan Scheer M, Mocoichinski A, Roderjan C (2011) Tree component structure of tropical upper montane rain forests in Southern Brazil. *Acta Botanica Brasilica*. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062011000400002>.

Mendoza, B, Béjar J, Luna D, Osorio M, Jimenez M, Melendez J R (2020) Differences in the ratio of soil microbial biomass carbon (MBC) and soil organic carbon (SOC) at various altitudes of Hyperalic Alisol in the Amazon region of Ecuador. *F1000 Research*, 9, **443**. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22922.1>.

Money D C (2000) *Weather and climate*. pp. 16. Focus on geography. Nelson Thornes Ltd. – UK.

Moreira F M S, Cares J E, Zanetti R, Sturmer S L (2013) *O ecossistema solo*. Editora UFLA. ISBN: 9788581270234. 352 pg.

Niinemets Ü, Díaz-Espejo A, Flexas J, Galmés J, Warren CR (2009) Role of mesophyll diffusion conductance in constraining potential photosynthetic productivity in the field. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2249–2270. doi:10.1093/jxb/erp036

O'brien T P, Feder N, Mccully, M E (1965) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, New York, v. **59**, n. 2, p. 368-373, jun.

Ohdo T, Takahashi K (2020) Plant species richness and community assembly along gradients of elevation and soil nitrogen availability. *AoB PLANTS* **12**: plaa014; doi: 10.1093/aobpla/plaa014

Oliveira EC, Miglioranza E, Almeida L H C (2016) Frequência estomática entre cultivares de mandioca avaliada por gráficos de caixa. *Agropecuária Científica no Semiárido, Campina Grande*, v.**12**, n.2, p.230-236.

Oliveira Filho A T, Carvalho, D A, Fontes M. A. L, Van Den Berg, E, Curi N, Carvalho W A C (2004) Variações estruturais do compartimento arbóreo de uma Floresta Semidecídua Alto-Montana na chapada das Perdizes, Carrancas, MG. *Revista Brasileira de Botânica, São Paulo*, v. **27**, n. 2, p. 291-309.

Pane E, Pereira, S Y (2005) As Fontes Em Itamonte, Sul De Minas Gerais – Uma Contribuição Para O Entendimento Das Relações Entre Água Superficial E Subterrânea. *Águas Subterrâneas*, v. **19**, n. 1, p. 1–14.

Pratt R B, Jacobsen A L, Ewers F W, Davis S D (2007) Relationships among xylem transport, biomechanics and storage in stems and roots of nine Rhamnaceae species of the California chaparral. *New Phytol.*, **174**, 787–798.

Pereira F J, Castro E M, Oliveira C, Pires M F, Pasqual M (2011) Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de aguapé para a tolerância à contaminação por arsênio. *Planta Daninha* **29**:259–267.

Pompeu P V, Fontes M A, Santos R M dos, Garcia P O, Batista T A, Carvalho W A C, Oliveira Filho A T (2014) Floristic composition and structure of an upper montane cloud forest in the Serra da Mantiqueira Mountain Range of Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, v. **28**, n. 3, p. 456–464.

Raij B Van (1991) Fertilidade do solo e adubação. São Paulo-SP, CERES/POTAFOS. 343p

Santos M, Ribeiro A, Castro E, Miranda K F, Lira M F P, Pereira M P, Ferreira C A, Mori F A (2021) Anatomia comparada de *Clethra scabra* Pers. (Clethraceae) em diferentes altitudes na Serra da Mantiqueira, Minas Gerais, Brasil. *Ciência Florestal*, **31(3)**, 1407-1426. doi:<https://doi.org/10.5902/1980509842333>.

Schaefer C E G R, Mendonça B A F, Ferreira J R W G, Valente E L, Corrêa G R (2012) Relações solo-vegetação em alguns ambientes brasileiros: Fatores edáficos e florística. In: Martins, S. V. *Ecologia de Florestas Tropicais do Brasil*. **2.ed.** Viçosa: UFV, p. 252-293.

Scheer M B, Curcio G R, Roderjan C V (2013) Carbon and water in in Upper Montane Soils and Their Influences on Vegetation in Southern Brazil. *ISRN Soil Science, Philadelphia*, v. **2013**.

Scheer M B, Curcio G R, Roderjan C V (2011) Funcionalidades ambientais de solos altomontanos na Serra da Igreja, Paraná. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. **35**, n. 4, p. 1113-1126.

Scherrer, D.; Körner, C. Topographically controlled thermal-habitat differentiation buffers alpine plant diversity against climate warming. *J Biogeogr* 38:406–416. 2011.

Segadas-Vianna F, Dau L (1965) Ecology of the Itatiaia range, Southeastern Brazil. II – Climates and altitudinal climatic zonation. *Arquivos do Museu Nacional* **53**: 31–53.

Silva Neto EC, Santos JJS, Pereira MG, Maranhão DDC, Fabiana da Costa Barros FC, Anjos LHC dos (2018) Paleoenvironmental Characterization of a High-Mountain Environment in the Atlantic Forest in Southeastern Brazil. *Revista Brasileira Ciências do Solo*. ISSN **1806-9657**. <https://doi.org/10.1590/18069657rbc20170415>.

Soares P F C, Anjos L H C, Pereira M G, Pessenda L C R (2016) Histosols in an upper montane environment in the Itatiaia Plateau. *Rev Bras Cienc Solo*. **40**:e0160176. <https://doi.org/10.1590/18069657rbc20160176>.

Souza, Katiúscia Freire de (2014) [DISSERTAÇÃO Comparação da anatomia foliar de *Myrsine coriacea* e *Myrsine umbellata* em diferentes cotas altitudinais.pdf](#).

Takahashi K (2014) Effects of wind and thermal conditions on timberline formation in central Japan: a lattice model. *Ecol Res* 29:121–131.

Tng, D.Y.P.; Apgaua, D. M. G.; Ishida, Y. F.; Mencuccini, M.; LLOYD J, Laurance W F, Laurance S G W (2018) Rainforest trees respond to drought by modifying their hydraulic architecture. *Ecology and Evolution*, n. September, p. ece3.4601.

Vico G, Dralle D, Feng X, Thompson S, Manzoni S (2017) How competitive is drought deciduousness in tropical forests? A combined eco-hydrological and eco-evolutionary approach. *Environmental Research Letters*, v. 12, n. 6.

Wieser G (2007) Chapter: Climate at the upper timberline. In: Wieser G, Tausz M (eds) *Trees at their upper limit*. Springer, Dordrech.

Zhu SD, Li R.H, Song J, He P C, Liu H, Berninger F, Y Q (2015) Different leaf cost-benefit strategies of ferns distributed in contrasting light habitats of sub-tropical forests. *Ann Bot* 87:3046–3054. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv179>.

Material Suplementar

Tabela suplementar 1. Diferenças entre características anatômicas e fisiológicas de *P. estrelense* seguidas de valores de p para teste de normalidade por meio de Shapiro Wilk com comparações pareadas de Tukey e Kruskal-Wallis seguida de Dunn test, em diferentes gradientes de altitude (1500m, 1700m, 1900m e 2100m de altitude) em uma floresta altomontana em Itamonte, MG, Brasil. $P < 0,05$.

	Shapiro-Wilk (p value)	Anova (p value)	Kruskal-Wallis (p value)	
Área Foliar (mm ²)	0,02589	-	0,02886	*
Espessura Foliar (µm)	0,3204	0,7038	-	
Densidade estomática (estômato/mm ²)	0,008271	-	0,03487	*
Diâmetro Polar (µm)	0,1749	0,07021	-	
Diâmetro Equatorial (µm)	0,8395	0,01773	-	*
Funcionalidade estomática área (mm ²)	0,132	0,3086		
Cutícula (µm)	0,2895	0,006926	-	*
Epiderme abaxial (µm)	0,08083	0,0007697	-	*
Epiderme adaxial (µm)	0,1158	0,00637	-	*
Parênquima esponjoso (µm)	0,9573	0,005017	-	*
Parênquima paliçádico (µm)	0,05122	0,001909	-	*
Nervura central área (µm ²)	0,02278	-	0,01033	*
Xilema área (µm ²)	0,0006248		0,009101	*
Floema área (µm ²)	0,7056	0,007578	-	*
Densidade de vaso do galho (µm)	0,03549	-	0,2195	
Comprimento de vaso do galho (µm)	0,4001	0,009502	-	*
Diâmetro de vaso do galho (µm)	1,49E-05	-	0,224	
Comprimento de fibra do galho (µm)	0,4824	4,65E-07	-	*
Parede de fibra do galho (µm)	0,05798	0,484	-	
Índice de vulnerabilidade	0,0002069	-	0,02048	*
Fotossíntese	0,055	8,65E-05	-	*
Condutância	0,000677	-	0,006283	*
Transpiração	0,0122	-	0,00953	*
Eficiência do uso da água	0,02674	-	1,06E-06	*

Tabela suplementar 2. Valores médios e desvio padrão (DP) das características anatômicas e fisiológicas de *P. estrelense* presentes 1500m, 1700m, 1900m e 2100m de altitude. Grupos estatisticamente semelhantes no nível de $P < 0,005$ são indicados com as mesmas letras minúsculas, conforme testado por meio de ANOVA com comparações pareadas de Tukey e Kruskal-Wallis seguido de Dunn test.

Medidas	1500	1700	1900	2100
Área Folia (mm ²)	21,44 ± 2,02 a	11,81 ± 1,01 b	14,34 ± 2,65 ab	11,23 ± 0,56 b
Densidade estomática (estômato/mm ²)	0,41 ± 0,01 b	0,53 ± 0,04 a	0,44 ± 0,01 ab	0,48 ± 0,01 a
Diâmetro Equatorial (µm)	3,97 ± 0,20 b	4,72 ± 0,20 b	4,39 ± 0,19 b	5,09 ± 0,28 a
Cutícula (µm)	3,85 ± 0,2 ab	3,52 ± 0,2 b	3,92 ± 0,08 ab	4,73 ± 0,28 a
Epiderme abaxial (µm)	7,029 ± 0,19 b	8,14 ± 0,38 b	7,90 ± 0,52 b	9,76 ± 0,302 a
Epiderme adaxial (µm)	14,01 ± 0,46 b	20,17 ± 1,81 ab	18,95 ± 2,74 ab	26,07 ± 2,33 a
Parênquima esponjoso (µm)	81,51 ± 3,48 b	108,65 ± 6,40 a	100,45 ± 8,62 ab	114,48 ± 1,94 a
Parênquima paliçádico (µm)	49,39145 ± 1,8 b	68,34 ± 5,86 ab	70,84 ± 8,31 ab	89,74 ± 5,65 a
Nervura central área (µm ²)	50670,28 ± 2635,56 b	49482,62 ± 2154,709 b	51619,34 ± 1901,08 b	71563,06 ± 995,37 a
Xilema área (µm ²)	25572,24 ± 1170,79 b	26374,08 ± 1502,44 b	25935,43 ± 456,94 b	38637,53 ± 1363,28 a
Floema área (µm ²)	25,09 ± 2,244691 b	23,108 ± 1,437761 b	25,68 ± 1,761706 b	32,24 ± 0,91 a
Comprimento de vaso do galho (µm)	365,37 ± 13,003 a	290,67 ± 10,63 b	356,42 ± 11,26 a	343,48 ± 12,29 a
Comprimento de fibra do galho (µm)	423,76 ± 10,85 a	343,66 ± 8,13 c	381,050 ± 5,94 b	453,14 ± 7,91 a
Índice de vulnerabilidade	0,39 ± 0,04 a	0,25 ± 0,02 b	0,35 ± 0,02 a	0,29 ± 0,02 ab
Fotossíntese	5,38 ± 0,88 a	5,33 ± 0,74 a	2,25 ± 0,66 b	3,102 ± 0,804 b
Condutância	0,03 ± 0,002 b	0,06 ± 0,005 a	0,05 ± 0,009 ab	0,03 ± 0,005 b
Transpiração	0,79 ± 0,04 b	1,27 ± 0,09 a	1,002 ± 0,16 b	0,78 ± 0,10 b
Eficiência do uso da água	6,66 ± 0,64 a	4,20 ± 0,22 b	2,17 ± 0,23 c	3,85 ± 0,34 b