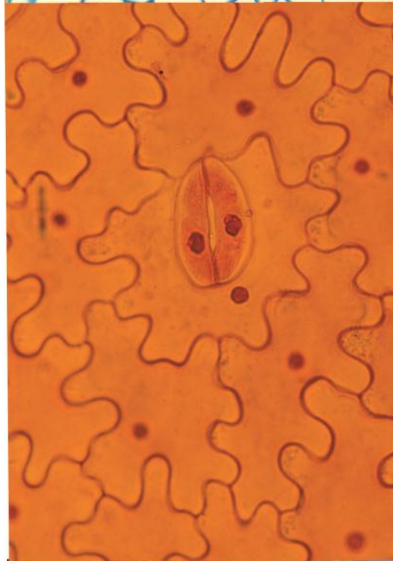
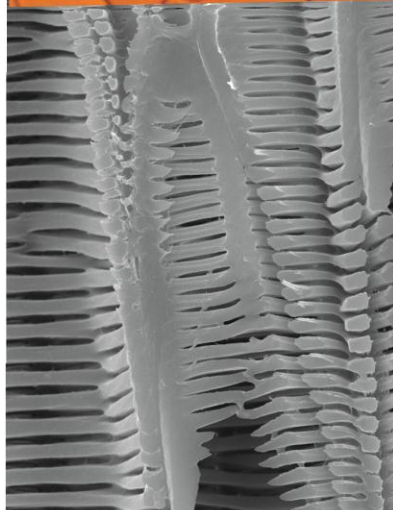


Anatomia, micromorfologia e evolução de caracteres em Aspleniaceae Newman.



Maria Luiza R. Wetzel



Orientador: Ricardo Cardoso Vieira
Co-orientadora: Lana da Silva Sylvestre

ANATOMIA, MICROMORFOLOGIA E EVOLUÇÃO DE CARACTERES EM
ASPLENIACEAE NEWMAN.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Botânica).

Orientador:Dr. Ricardo Cardoso Vieira
Co-orientadora:Dra. Lana da Silva Sylvestre

Rio de Janeiro
2015

ANATOMIA, MICROMORFOLOGIA E EVOLUÇÃO DE CARACTERES EM
ASPLENIACEAE NEWMAN.

Maria Luiza Ribeiro Wetzel

Orientador: Ricardo Cardoso Vieira
Co-orientadora: Lana da Silva Sylvestre

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Botânica).

Aprovada por:

Presidente, Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

Rio de Janeiro
2015

Wetzel, Maria Luiza Ribeiro.

Anatomia, micromorfologia e evolução de caracteres em Aspleniaceae Newman./

Maria Luiza R. Wetzel. - Rio de Janeiro: UFRJ/ ICB, 2015.xi, 130f.: il.; 31 cm.

Orientador: Ricardo Cardoso Vieira

Co-orientadora: Lana da Silva Sylvestre

Tese (doutorado) – UFRJ/ Museu Nacional/ Programa de Pós-graduação em
Ciências Biológicas (Botânica), 2015.

“A vida sem ciência é uma espécie de morte”

Sócrates

Dedico essa tese ao Dr. Ricardo Cardoso Vieira
e a meu filho Andreas R. Wetzel

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao meu orientador Dr. Ricardo Cardoso Vieira por toda a dedicação com a qual me orientou e sem o qual essa tese jamais teria sido concluída. Seu exemplo como educador, pesquisador e pessoa será sempre uma inspiração para mim.

À Dra. Lana da Silva Sylvestre por toda a dedicação, paciência e ajuda nas coletas.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro e ao Museu Nacional pelo espaço e material concedido para a realização dessa tese.

À Elaine Damasceno pela ajuda com as coletas e a convivência agradável.

À Vanessa L. de Lima por toda a ajuda com a filogenia e por ter gentilmente cedido seus dados de biologia molecular para o mapeamento de caracteres.

À Claudine Massi Mynssen e Monira por terem gentilmente cedido seus dados de *Diplazium* para a realização da filogenia.

À Noêmia do laboratório de Biofísica da UFRJ por toda a ajuda, persistência e principalmente paciência com a metalização e fotomicrografia do material.

À Amanda e Bia que me ajudaram com o MEV no Museu Nacional, sempre serei grata pelas belas imagens.

À Rodrigo Léo pela revisão e participação no seminários de tese.

Ao Dr. Marcelo Guerra Santos por ter me estimulado a trabalhar com as samambaias desde o início da minha graduação.

À Dra. Bárbara de Sá Haddad e Msc. Daniel Alves que sempre me receberam tão bem no Museu Nacional.

Aos amigos de laboratório Victor Tenório e André Gonçalves pela convivência sempre agradável.

À Alessandra Guimarães por todo o companheirismo e ajuda durante a realização dessa tese.

Aos meus amigos botânicos do trabalho Dr. João Rodrigues Miguel, Dra. Carine Quinet e Msc. Wellington Rodrigues de Mattos por todo o companheirismo durante esses anos.

À minhas amigas Dra. Mônica Teresa Prantera, Dra. Rozanda Guedes, Dra. Patrícia Domingues e Dra. Sula Salani por toda a amizade que certamente contribuiu para o meu trabalho.

Aos meus pais Altamiro Ferreira Ribeiro e Marciana R. da Costa Ribeiro por toda a educação que recebi.

À minha grande amiga Dra. Louise Moraes por toda a ajuda.

À Marta por ter cuidado tão bem do meu filho enquanto eu trabalhava.

Ao meu marido Andreas Wetzel por ter feito a revisão gramatical do texto.

À minha irmã Palmira Margarida R. da Costa Ribeiro por toda a ajuda.

Ao meu filho Andreas Wetzel por ser tão fofinho e inspirar a mamãe todos os dias.

ANATOMIA, MICROMORFOLOGIA E EVOLUÇÃO DE CARACTERES EM ASPLENIACEAE NEWMAN.

RESUMO

A anatomia vegetal vem se confirmado há tempo como uma fonte importante de dados para a taxonomia e filogenia. No entanto são escassos trabalhos que tratem de samambaias, em especial de órgãos como a raiz e o caule.

O presente trabalho teve como objetivos: descrever a anatomia do eixo vegetativo de espécies de Aspleniaceae Newman ocorrentes no Brasil e avaliar a eficiência dos caracteres anatômicos da folha, da raiz e do caule para a segregação taxonômica dos gêneros e espécies; analisar a micromorfologia dos elementos traqueais contribuindo para um melhor entendimento do funcionamento do sistema vascular no grupo. Por fim incluir os dados anatômicos gerados na análise filogenética do grupo e mapear a evolução de determinados caracteres anatômicos. As 20 espécies coletadas foram tratadas com a metodologia usual em anatomia vegetal e a reconstrução dos estados ancestrais foi realizada com o auxílio do Mesquite. Os dados obtidos no presente trabalho confirmaram a importância da anatomia vegetal como fonte de dados para a taxonomia e também para a filogenia. A presença de células esclerenquimáticas de parede periclinal interna mais espessa na raiz e a disposição dos meristelos no caule, por exemplo, foram reconhecidas como uma sinapomorfias do gênero *Asplenium*. Já algumas características observadas na folha, como ráfides, tricomas, cloroplastos nas células ordinárias da epiderme, células mucilagionas e formato dos feixes vasculares mostraram-se diagnósticas para algumas espécies. O xilema da maior parte das espécies é constituído por traqueídes que ocorrem agrupados e apresentam faces repletas de pontoações escalariformes. Duas espécies, *Hymenasplenium triquetrum* e *Asplenium monanthes* apresentasm elementos de vaso. Dezoito características mostraram-se informativas para a filogenia. O tipo de esclereides ao redor da endoderme da raiz, por exemplo, separou o grupo externo

e os gêneros *Hymenasplenium* e *Asplenium*. A presença de linhas laterais é uma sinapomorfia do clado que agrega *A. auritum* e *A. auriculatum*, um já sabido grupo de afinidade morfológica. Já outras características parecem ter surgido independentemente enquanto outras regrediram em alguns clados.

Palavras-chave: samambaias, filogenia, elementos traqueais.

Rio de Janeiro

2015

ANATOMY, MICROMORPHOLOGY AND CHARACTER EVOLUTION IN A SPLENIACEAE NEWMAN.

ABSTRACT

The plant anatomy has been confirmed for time as an important data source for the taxonomy and phylogeny. However there are few works dealing with ferns, especially organs like the root and the stem. This study aimed to: describe the anatomy of the vegetative axis Species Aspleniaceae Newman occurring in Brazil and evaluate the efficiency of the anatomical characters of the leaf, root and stem to the taxonomic segregation of genera and species; analyzing the morphology of tracheary elements contributing to a better understanding of the functioning of the vascular system in the group. Finally include the anatomical data generated in the phylogenetic analysis of the group and map the evolution of certain anatomical characters. The 20 species collected were treated with the usual methodology in plant anatomy and reconstruction of ancestral states was carried out with the help of Mesquite. The data obtained in this study confirmed the importance of plant anatomy as a data source for taxonomy and also to phylogeny. The presence of sclerenchyma cells paraclinal inner wall thicker at the root meristemes and arrangement of the stem, for example, have been recognized as a synapomorphies *Asplenium* the like. Some features observed on the sheet, as raphids , trichomes , chloroplasts in the ordinary epidermal cells , mucilaginous cells and vascular bundles format proved to be diagnostic for some species . The xylem of most species consists of tracheids occurring faces have grouped and pits filled with scalariform. Two species, *Hymenasplenium triquetrum* and *Asplenium monanthes* has vessel elements. Eighteen characteristics proved informative for phylogenetics . The type of sclereids around the root endodermis, for example, separated and external group *Hymenasplenium* genera and *Asplenium*. The presence of lateral lines is a synapomorphy that adds *A. auritum* and *A.*

auriculatum, an already known affinity group morphological . Have other features seem to have arisen independently while others regressed in some clades .

Key-words: anatomy, micromorfology, ferns, phylogeny.

Rio de Janeiro

2015

SÚMARIO

I.	Introdução	
	1.1. Raiz.....	1
	1.2. Caule.....	2
	1.3. Folha.....	4
	2. O estudo anatômico de samambaias no Brasil.....	6
	3. A anatomia de Aspleniaceae.....	7
II.	Objetivos.....	11
III.	Justificativa.....	12
IV.	Capítulo1: Anatomia de espécies de Aspleniaceae Newman ocorrentes no Brasil: contribuição à taxonomia	
	Resumo.....	20
	Introdução.....	21
	Material e métodos.....	23
	Resultados.....	26
	Discussão.....	51.
	Referências Bibliográficas.....	57
V.	Capítulo2: Elementos traqueais de espécies de Aspleniaceae Newman ocorrentes no Brasil	
	Resumo.....	61
	Introdução.....	62
	Material e métodos.....	64
	Resultados.....	67
	Discussão.....	80
	Referências Bibliográficas.....	86

VI. Capítulo3: Evolução de caracteres anatômicos em Aspleniaceae Newman.	
Resumo.....	90
Introdução.....	91
Material e métodos.....	93
Resultados.....	97
Discussão.....	112
Referências Bibliográficas.....	116
VII. Considerações finais.....	119
VIII. Bibliografia geral.....	121

INTRODUÇÃO

Dentre todos os trabalhos que analisam a anatomia de samambaias, o intitulado “Comparative anatomy of vegetative organs of the pteridophytes” de Ogura (1972) pode ser considerada a documentação mais completa sobre o assunto, pois além de trazer informações gerais sobre a anatomia do grupo, também descreve as principais famílias e gêneros. Atualmente vários pesquisadores tem se dedicado ao tema e de acordo com White & Turner (1995), que fizeram uma extensa revisão sobre o assunto, a diversidade anatômica das samambaias fazem da anatomia comparativa funcional um campo de pesquisas promissor. A seguir são considerados os principais trabalhos sobre a anatomia de samambaias em diferentes órgãos e as principais tendências de linhas de pesquisa sobre o assunto.

1.1. Raiz

As raízes das samambaias são adventícias e emergem de caules, ou bases de folhas para o substrato. Em caules eretos elas cobrem toda a base do caule formando um “manto de raiz” (Ogura 1972). A anatomia radicular já foi explorada em diversos trabalhos (Ogura 1972, Schneider, 1996,) que apontaram algumas tendências gerais para o grupo: coifa transitória produzida por um caliptrogênio, córtex contendo tecido mecânico em quase todas as espécies, espaços intercelulares pequenos, estelo constituído de um cilindro vascular central e periciclo circundado por uma camada de endoderme.

A anatomia da raiz é considerada por Schneider (1996) como uma boa fonte de características para a sistemática e filogenia. O autor é certamente um dos pesquisadores mais entusiasmados pelo assunto tendo não só comparado raízes de várias famílias, mas também relacionado a evolução da anatomia do órgão com o habito da planta, função e ambiente. Analisando Hymenophyllaceae o autor postulou uma progressão evolutiva de samambaias com um sistema radicular bem desenvolvido para samambaias sem raiz. De acordo com o autor, as espécies epífitas são caracterizadas pela redução do sistema radicular e uma transferência das funções das raízes para outros órgãos. Em muitas espécies as folhas podem absorver água e nutrientes devido à ausência de uma cutícula espessa, enquanto outras absorvem água pelo rizoma que costuma apresentar cutícula muito fina ou ausente e indumentos que podem reter água por capilaridade.

1.2. Caule

Existe uma grande variedade de formas e tamanhos de caules de samambaias e essa diversidade se reflete na anatomia desse órgão. Ogura (1972) aponta que a diferenciação do caule em epiderme, córtex e estelo é muito clara e certamente o último é o mais estudado.

Durante a segunda metade do século vinte o aumento da ênfase colocada na importância do sistema vascular levou a formulação da “teoria do estelo”. O conceito de estelo foi usado por Van Tieghen para designar não somente os tecidos vasculares primários, mas também os tecidos conjuntivos associados: periciclo, raios vasculares e, quando presente, o tecido medular (Gifford & Foster 1989). Essa visão trouxe um forte impacto na forma de interpretar os dados sobre vascularização, pois os vários feixes que formam o sistema vascular de uma planta passaram a ser tratados como equivalentes morfológicos de uma coluna única de sistema vascular. Antes da introdução do conceito um único feixe era equiparado a toda uma coluna de tecido vascular (Beck *et al.* 1982).

O conceito é amplamente utilizado em samambaias, já que a endoderme é sempre muito marcante e os limites do estelo podem ser facilmente identificados, o que não ocorre com as Fanerógamas (Ogura 1972). De acordo com Schmidt (1982), essa facilidade em reconhecer o estelo em plantas vasculares sem sementes, levou a uma série de trabalhos (Boodle 1901; Lang 1912). Em samambaias é possível observar espécies com protostelo, sifonostelo e dictiostelo e por algum tempo os pesquisadores acreditaram que o eustelo das plantas com sementes tinha evoluído por uma dissecção contínua do sifonostelo das samambaias (Jefrey 1902). No entanto Namboodiri e Beck (1968) observando o estelo de progimnospermas demonstraram que o eustelo evoluiu diretamente do protostelo e que sifonostelo e eustelo não compartilham a mesma história evolutiva.

Os elementos traqueais de samambaias também têm gerado especial atenção por parte dos pesquisadores (Bancroft 1911, Carlquist 1975, Carlquist & Schneider 1997a, 1997 b, 1998a, 1998b, 1998 c, 1999, 2000a, 2000b, 2000c, Carlquist *et al.* 1999, 2000, 1997, Schneider & Carlquist 1997, 1998a, 1998b, 1998c, 1998d, 1999a, 1999b, 1999c, 2000a, 2000b, 2001). Tamanho interesse

surge do fato de algumas espécies apresentarem elementos traqueais únicos que são observados somente em samambaias. Esses elementos apresentam placas de perfuração laterais e são denominados vasos escalariformes. Os autores concluem que esses elementos traqueais ocorrem em fascículos e o contato tão direto entre as células de transporte sugere condução de água. Isso pode ser especialmente útil em samambaias, já que suas raízes são adventícias e elementos traqueais do caule e raiz podem ser facilmente conectados. De acordo com os autores, embora todas as samambaias apresentem características em comum, a diversidade anatômica do xilema no grupo é enorme e sugere que muito ainda deva ser aprendido, principalmente sobre os aspectos fisiológicos envolvidos no processo de condução de água.

1.3. Folha

Nas samambaias as folhas constituem os órgãos dominantes e podem ser inteiras ou compostas com pinas e pínulas arranjadas ao longo da raque (Figuras 1, 2,3 e 4). Apresentam delimitação adaxial e abaxial clara, com tecido laminar suprido por muitos traços vasculares (Vasco *et al.* 2013). Na lâmina foliar a epiderme é certamente o principal foco de estudos da folha, tendo o mesofilo sido fonte de poucos trabalhos. Já no pecíolo a epiderme é pouco explorada pelos pesquisadores sendo o sistema vascular o principal interesse.

A epiderme das espécies de samambaias provavelmente despertou o interesse dos anatomistas por suas peculiaridades, como a presença de cloroplastos, por vezes maiores e em maior quantidade que os encontrados em outros tecidos da mesma folha (Wylie 1948, Ogura 1972). A ausência de cloroplastos na epiderme de plantas com sementes (exceto células-guarda) é melhor interpretada como uma perda que acaba por representar uma sinapomorfia para as Fanerógamas (Vasco *et al.* 2013). Outra característica incomum em grupos mais derivados é a presença de corpos silicosos na epiderme. Em um amplo estudo realizado por Mazundar (2010) esses cristais foram observados em 163 espécies de samambaias e aparentemente estão relacionados com uma otimização de captura de luz.



Figura 1. Lâmina foliar de *Asplenium uniseriale* e Figura 2. *A. oligophyllum* evidenciando lâmina pinada e soros lineares.

A estrutura e a ontogenia dos estômatos têm sido investigadas devido à sua diversidade (Mickel & Lersten 1967, Rolleri *et al.* 1991, Sem & De 1992). Mickel & Lersten (1967) discutiram a questão dos estômatos flutuantes (adetostomia) ocorrentes em algumas famílias, enquanto a ontogenia e classificação dos estômatos das principais famílias de samambaias foram bem exploradas no

trabalho de Sem & De (1992) que, analisando todas as famílias, observaram 24 diferentes tipos de estômatos, sendo o tipo polocítico o de maior ocorrência.



Figuras 3 e 4. *Asplenium auritum* e *A. auriculatum* respectivamente.

O pecíolo geralmente é estudado pela diversidade de formatos de xilema e consequente aplicação à taxonomia (Ogura 1972). Tal característica é por si só tão importante que já foi utilizada para a construção de uma chave de espécies de samambaias ocorrentes na Europa. No entanto, atualmente, a filogenia parece ser o principal interesse da maior parte dos taxonomistas e, um recente trabalho (Hernandez- Hernandez *et al.* 2012) chamou a atenção por evidenciar o potencial de uma característica para a filogenia. Os autores analisaram no pecíolo de 89 espécies de samambaias a presença de uma camada mais interna do tecido fundamental adjacente a endoderme denominada “banda circundodérmica” ou CB. Os autores observaram que as espécies de famílias mais derivadas apresentavam a CB (54 espécies) e evidenciaram ainda que estados de caracter do pecíolo, como o número de feixes vasculares e a presença e configuração da CB, contribuem no entendimento da evolução das samambaias.

3. O estudo anatômico de samambaias no Brasil

A anatomia de samambaias brasileiras foi pouco estudada e quase sempre com enfoque taxonômico, como no trabalho de Graçano & Prado (2001) que analisaram a anatomia foliar de espécies da família Pteridaceae do Parque Estadual do Rio Doce em Minas Gerais ou no de Barros & Silva (1996) que estudaram os estômatos de *Pteris schwackeana*.

Kraus *et al.* (1993), no entanto, optaram por analisar a atividade meristemática estudando a anatomia das galhas de *Microgramma squamulosa* (Kauf.) Sota (Polypodiaceae). Já Ribeiro *et al.* (2007 a, 2007 b, 2011) estudaram o gênero *Anemia* Sw. com um enfoque ecológico analisando a anatomia de espécies ocorrentes em afloramentos rochosos e a variação intraespecífica de diferentes populações. Os autores observaram que as samambaias respondem ao ambiente da mesma forma que as Angiospermas, ou seja, com variações no tamanho e quantidade de estômatos, tricomas, camadas de mesofilo e etc.

Para a família Aspleniaceae, o único trabalho encontrado no país é a dissertação de mestrado de Ferrari (2009) que analisou seis espécies de *Asplenium* ocorrentes na Serra do Brigadeiro em Minas Gerais.

Apesar das samambaias serem foco de estudo constante por anatomistas no mundo, existe poucos anatomistas dedicando-se ao grupo no Brasil e isso fica evidente ao considerarmos o número de trabalhos citados nesse texto. Windisch (2000) fez um comentário sobre a escassez de estudos em samambaias ocorrentes no Brasil e ressalta que esses estudos podem trazer importantes contribuições para a pteridologia brasileira. De acordo com Prado (1989) os caracteres anatômicos podem ter grande utilidade sobre a evolução e as relações filogenéticas entre os grupos de Monilophyta.

4. A anatomia de Aspleniaceae

Atualmente são reconhecidas 78 espécies de Aspleniaceae Newman. no Brasil, sendo 23 endêmicas (Sylvestre 2014). Essas espécies ocupam diferentes ambientes, sendo particularmente abundantes nos ecossistemas florestais. Algumas espécies são tipicamente terrícolas, mas em sua maior parte são ervas

preferencialmente epífitas ou rupícolas, sendo a terceira família de samambaias em número de espécies epífitas. Muitas são epífitas facultativas e algumas são preferenciais podendo ser encontradas, muito raramente, em substrato rochoso, tais como *A. mucronatum*. Outras espécies são comuns ao longo de cursos d'água, geralmente entre ou sobre rochas. Algumas, como *Hymenasplenium triquetrum*, crescem praticamente dentro dos córregos ou nas cachoeiras (Sylvestre 2001).

Aspleniaceae é comumente apontada como uma família derivada dentro das samambaias (Schneider 2004). Acredita-se que com a proliferação das Angiospermas foram criados novos espaços nos quais certas linhagens puderam se diversificar e muitas samambaias modernas como Aspleniaceae crescem preferencialmente em condições de baixa luz presentes nas florestas de Angiospermas ou como epífitas.

Tryon & Tryon (1982) consideraram que as espécies do gênero *Asplenium* nunca foram satisfatoriamente delimitadas em uma classificação infragenérica e que evidentemente representam uma multiplicidade de linhas evolutivas que não são prontamente classificadas dentro de sub-gêneros ou seções. Dessa forma, optaram por não estabelecerem categorias infragenéricas formais, reconhecendo apenas grupos afins. Tal tendência foi seguida por Sylvestre (2001) em sua revisão taxonômica de espécies de Aspleniaceae ocorrentes no Brasil, onde reconheceu tais grupos de afinidade nas espécies que analisou.

A filogenia da família Aspleniaceae começou a ser analisada no final da década de noventa por Murakami *et al.* (1998, 1999). Tais estudos indicam que folhas com lâminas simples são um exemplo de características morfológicas que talvez tenham evoluído independentemente várias vezes dentro da família. trabalho mais expressivo sobre a filogenia de Aspleniaceae é, no entanto, o de Schneider (2004) que baseando-se em dados de sequência de *rbcL* e *trnL-F* analisou a filogenia da família e suas implicações para a biogeografia. Esse estudo, o autor reconhece oito clados de *Asplenium* (Figura 5) e indica que a distribuição da família não pode ser explicada unicamente por eventos de dispersão e extinção, mas principalmente por eventos de vicariância.

A anatomia da família Aspleniaceae foi descrita por Ogura (1972). De acordo com o autor a família se caracteriza por apresentar raízes diarcas com epiderme coberta de pêlos radiculares; caule com sistema vascular dictiostélico;

pecíolos com dois meristelos em forma de arco que na região distal se unem formando xilema em forma de V, X ou T e lâmina foliar hipostomática com mesofilo diferenciado em paliçadico e lacunoso.

Muitos trabalhos focaram a taxonomia do grupo e ficou evidente que o sistema vascular é uma das características mais prósperas para a sistemática de Aspleniaceae. Um bom exemplo é dado por Umikalsom (1992) que descreveu espécies de Aspleniaceae e concluiu que alguns aspectos do sistema vascular fornecem informações taxonômicas úteis para a segregação dos gêneros analisados. Outro trabalho expressivo foi o de Hayata (1927), que reconheceu a organização do estelo como uma característica útil para distinguir os gêneros da família. De acordo com o autor a família apresenta espécies com dictiostelo típico, perfurado e dorsiventral sendo que o último tipo foi utilizado para descrever o gênero *Hymenasplenium* Hayata. Atualmente a filogenia de Schneider (2004) apoia o reconhecimento do gênero *Hymenasplenium*.

A lâmina foliar de Aspleniaceae já despertou interesse de muitos pesquisadores como Chaerle e Viane (2004) que analisaram falsas nervuras em 16 espécies africanas de *Asplenium* e concluíram que estas podem ser vestígios da fusão de pinas, o que promoveu uma evidência independente para uma antiga hipótese de que espécies de *Asplenium* com folhas menos lobadas originaram-se de ancestrais com folhas pronunciadamente lobadas. Além disso, os autores observaram que juntamente com outras características anatômicas a ocorrência de falsas venações é de grande utilidade na segregação das espécies.

Lavaelle e Prada (2007) analisaram vários aspectos anatômicos e morfológicos de *Asplenium daredoides* Desv. e observaram estômatos polocíticos e face abaxial da epiderme com paredes anticlinais menos sinuosas. Apostolakos e Galatis (1999) descreveram a morfogênese dos estômatos de *Asplenium nidus* L., sendo o único trabalho em ultraestrutura encontrado para a família. Os autores observaram que as células estomáticas de *Asplenium* seguem um processo de morfogênese incomum, no qual os microtubulos e os filamentos de actina têm importância crucial.

Asplenium apresenta uma raiz muito peculiar com características que parecem ser fonte não somente para a taxonomia, mas também para o entendimento da ecologia do grupo. Uma dessas características incomuns em

samambaias é a presença de espessamentos em hélice nas células corticais da raiz que se assemelham com os espessamentos de células de Orquídeas, mas ocorrem em células vivas e podem ser uma adaptação ao estresse hídrico (Leroux *et al.* 2011 a). Leroux *et al* (2011 b) analisaram ainda a composição desses espessamentos, basicamente de homogalacturonano, xiloglucano e celulose, e concluíram que talvez sejam uma reação à invasão de micróbios. O sistema estelar do tipo dictiostele (Ogura 1972) e as camadas mais internas do córtex da raiz contendo esclereides com paredes periclinais internas muito espessas e paredes periclinais externas delgadas (Schneider 1996), são características encontradas em todas as Aspleniaceae. A anatomia típica da raiz pode até mesmo ser considerada uma sinapomorfia do gênero (Schneider 2004). Características como tipo de estômatos (Sen & De 1992), formato dos feixes vasculares, presença de substâncias ergásticas e compostos fenólicos variam de espécie para espécie sendo potencialmente aplicáveis na taxonomia do grupo.

Existem ainda alguns poucos trabalhos que descreveram a anatomia de raiz, caule e folha de determinadas espécies como *Asplenium ruta-muraria* (Bercu 2005) e *Asplenium lepidum* (Bercu 2007).

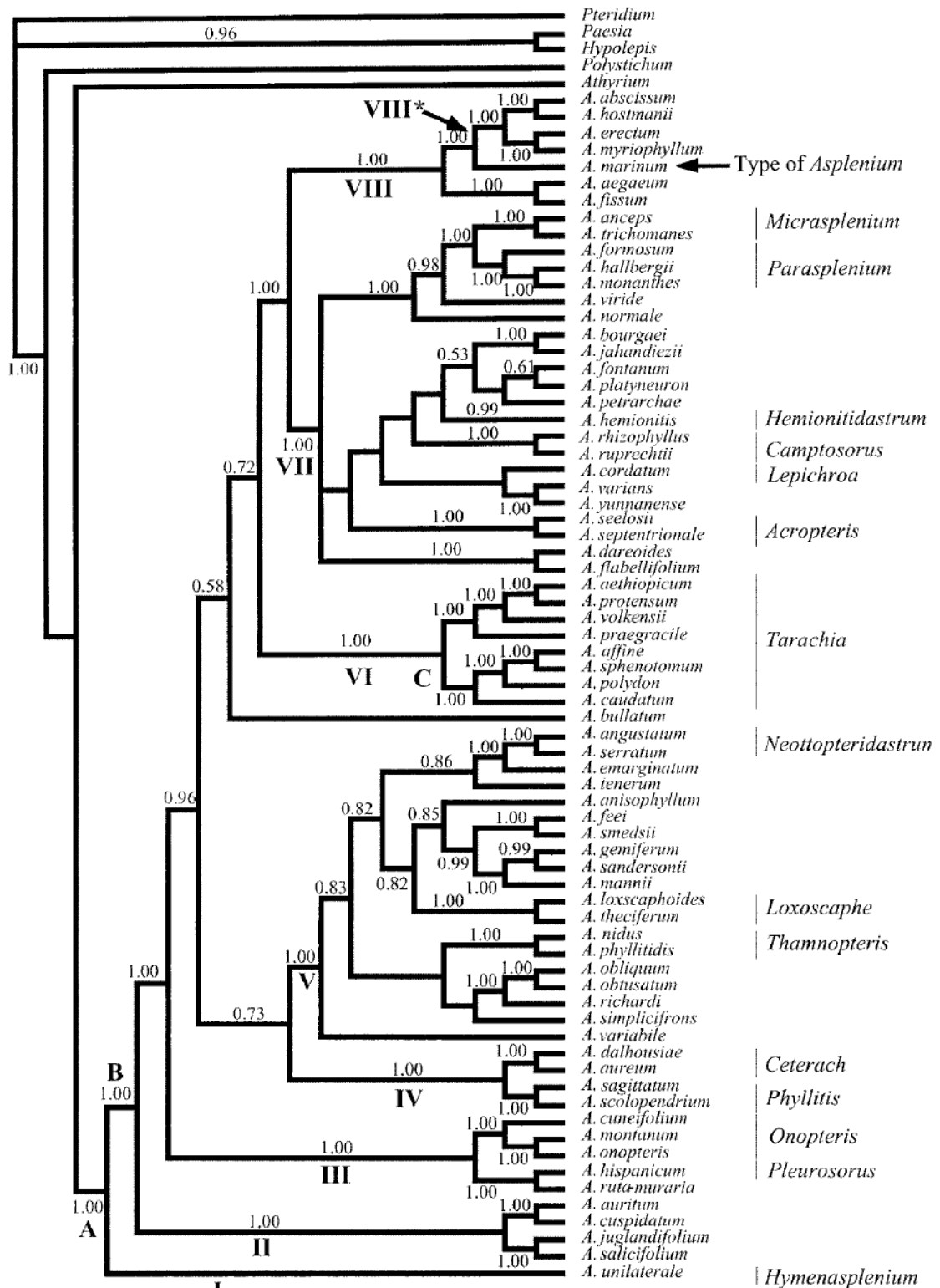


Figura 5. Cladograma proposto por Schneider *et al.* (2004) evidenciando os oito cladogramas propostos pelo autor. O clado A se refere ao atual gênero *Hymenasplenium* e o clado B ao gênero *Asplenium*.

OBJETIVOS

Capítulo 1. **Anatomia de espécies de Aspleniaceae Newman ocorrentes no Brasil.: contribuições à taxonomia.**

- Descrever a anatomia do eixo vegetativo de espécies de Aspleniaceae ocorrentes no Brasil e agrupar as espécies analisadas.
- Avaliar a eficiência dos caracteres anatômicos da folha, da raiz e do caule para a segregação taxonômica dos gêneros e espécies.
- Analisar se a anatomia da raiz, caráter referido como uma das sinapomorfias de Aspleniaceae, é constante nas espécies ocorrentes no Brasil.

Capítulo 2. **Elementos traqueais de espécies de Aspleniaceae Newman ocorrentes no Brasil.**

- Analisar e descrever os elementos traqueais em detalhes contribuindo para um melhor entendimento do funcionamento do sistema vascular no grupo.

Capítulo 3. **Evolução de caracteres anatômicos em Aspleniaceae Newman**

- Incluir os dados anatômicos gerados na análise filogenética do grupo.
- Analisar a evolução de determinados caracteres anatômicos no grupo

JUSTIFICATIVA

A descrição da anatomia do eixo vegetativo das espécies de Aspleniaceae ocorrentes em um dos principais centros de especiação da família no Neotrópico (regiões sul e sudeste do Brasil) ajudará a preencher uma lacuna nessa área, não só fornecendo dados básicos sobre *Asplenium*, mas também contribuindo para a segregação das espécies. Além disso, a inclusão de dados referentes a anatomia na filogenia do grupo contribuirá na compreensão da evolução do grupo e permitirá uma comparação com a filogenia proposta por Schneider (2004).

BIBLIOGRAFIA

- APOSTOLAKOS, P. & GALATIS, B. 1999. Microtubule and actin filament organization during stomatal morphogenesis in the fern *Asplenium nidus*. II. Guard cells. *New Phytol.* 141: 209-223.
- BANCROFT, B. 1911. On the xylem elements of the Pteridophyta. *Ann. Bot. (Oxford)* 25: 746-759.
- BARROS, I. C. L, SILVA, M. B. C. 1996. Taxonomia, padrão de venação e aparelhos estomáticos de *Pteris schwackeana* Chris. (Pteridophyta, Pteridaceae). *Bol. Soc. Brot.* 67: 257-262.
- BECK, C. B., SCHMID, R. e RODWELL, G. W. 1982. Stelar morphology and the primary vascular system of seed plants. *Botanical Review* 48:691-816.
- BERCU, R. 2005. Contribution to the anatomy of *Asplenium ruta-muraria*. *Studia bot. hung* 36: 13-20.
- BERCU, R. 2007. On the anatomy of the endangered plant species *Asplenium lepidum* (Aspleniaceae). *Studia bot. hung* 38:125-131.
- BOODLE, F. L. S. 1901. Comparative anatomy of the Hymenophyllaceae, Schizaeaceae and Gleicheniaceae. *Am. Bot.* 15: 351-421.
- CARLQUIST, S. 1975. Ecological strategies of xylem evolution. University of California Press, Berkeley, California, USA.
- CARLQUIST, S. 1992. Pit membrane remnants in perforation plates of primitive dicotyledons and their significance. *Am. J. of Bot.* 79: 666-672.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L 1997a. SEM studies on vessel in ferns.2. *Pteridium*. *Am. J. of Bot.*84: 581-587.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L 1997b. SEM studies on vessel in ferns. 4. *Astrolopsis*. *Am. fern J.* 87: 43-50.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 1997c. SEM studies on vessels in ferns. 1. *Woodsia obtusa*. *Am. Fern J.* 87:1-8.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L 1998a. Origin and nature of vessels in monocotyledons. 5. Araceae family Colocasioidae. *Bot. J.Linne.Soc.* 128: 71-86.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L 1998b. SEM studies on vessel in ferns. 6. *Woodsia ilvensis*, with comments on vessel origin in ferns *Flora* 193: 179-185.

- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 1998c. SEM studies on vessel in ferns. 10. Selected Osmudaceae and Schizaeaceae. *Int. J. of Plant Sci.* 159:788-797.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 1999. Marratiaceae, with comments on vessel patterns in eusporangiate ferns. *Am. J. of Bot.* 86:457-464.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 1999b. SEM studies on vessels in ferns. 8. *Platyzoma*, *Aust. J. of Bot.* 47:277-282.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 2000a. SEM studies of vessel in ferns. 14. *Ceratopteris*. *Aquatic Bot.* 66:1-8.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 2000b. SEM studies on Vessels in Ferns. 16. Pacific Tree Ferns (*Blechnaceae*, *Cyatheaceae*, *Dicksoniaceae*). *Pacific Sci.* 54: 75-86.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 2000c. SEM Studies on Vessels in Ferns. 18. Montane Cheilanthoid Ferns (*Pteridaceae*) of North America. *Aliso* 19: 31-39.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 2000d. SEM Studies on Vessels in Ferns. 20. Hawaiian Hymenophyllaceae. *Pacific Science* 54: 365-375.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 2001. Vessels in ferns: structural, ecological, and evolutionay significance. *Am. J. of Bot.* 8: 1-13.
- CHERLE, P. & VIANE, R. L.L. 2004. Leaf anatomy and the occurrence of false veins in *Asplenium* (*Aspleniaceae*, *Pteridophyta*). *Bot. J. of the Linnean Soc.*145: 187-194.
- FERRARI, F. B. 2009. Anatomia de espécies de *Aspleniaceae* Newman ocorrentes no Brasil: contribuições à taxonomia. Dissertação de mestrado, UFV.
- GIFFORD, E. M. & FOSTER 1989. Morphology and evolution of vascular plants. W. H. Freeman, 626 p.
- GRAÇANO, D, AZEVEDO A.A. & PRADO, J. 2001. Anatomia foliar das espécies de *Pteridaceae* do Parque Estadual do Rio Doce (PERD)-MG. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, 24: 333-347.
- GWYNNE-VAUGHAN. D. T. 1901. Observations on the anatomy of solenostelic ferns I. *Loxosoma*, *Ann. of Bot.* 15: 71-98.
- HAYATA, B., 1927. On the systematic importance of the stelar system in the Filicales I. *Bot. Mag., Tokyo*, 41: 697-174.
- HERNANDES- HERNANDEZ, V., TERRAZAS, T., MEHLTRETER K. & ANGELES G. 2012. Studies of petiolar anatomy in ferns: structural diversity and systematic

- significance of the circuendodermal band. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169, 596-610.
- KRAUS, J.E; MONTENEGRO, G. & KIM, A. J. 1993. Morphological studies on entomogenous stem galls of *Microgramma squamulosa* (Kauf.) Sota (Polypodiaceae)
- LAVAELE, M.C E PRADA, C. 2007. Morfologia del esporófito y el gametófito de *Asplenium dareoides* (Aspleniaceae, Pteridophyta). *Darwiniana* 45 (1).
- LANG, W. H. 1912. On the interpretation of the vascular anatomy of the Ophioglossaceae. *Mem Proc. Manchester Lit. Philosophy society* 56 (12): 1-15.
- LEROUX, A. BAGNIEWSKA-ZADWORNA, S. K. RAMBE, J. P. KNOX, S. E.MARCUS, E. BELLEFROID, D. STUBBE. CHABERT, A. HABRANT, M. CLAEYS AND R. L. L. VIANE, 2011. Non-lignified helical cell wall thickenings in root cortical cells of Aspleniaceae (Polypodiales): histology and taxonomical significance. *Annals of Botany* 107: 195–207, 2011
- LIU,H; WANG, Q. & TAYLOR, W 2006. Morphological and anatomical variation in sporophylles of *Isoetes sinensis* Palmer (Isoteaceae), an endangered quillwort in China. *American Fern Journal* 96 (3):67-74.
- JEFREY, E. C. (1902). The structure and development of the stem in Pteridophyta and Gymnosperms. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 95-119.
- MAZUNDAR, J. 2010. Phytoliths of pteridophytes. *South African Journal of Botany* 20p.
- MICKEL, J. T. & LESTERN, N. R. 1967. Floating stomates (adetostomy) in ferns: distribution and ontogeny. *Am. J. of Bot.* 54 (9): 1181-1185.
- MURAKAMI N. S., YOKOYAMA X. CHENG H. IWASAKI R. IMAICHI K. IWATSUKI 1998. Molecular α -taxonomy of *Hymenasplenium obliquissimum* complex (Aspleniaceae) based on *rbcL* sequence comparisons. *Plant Species Biology*13: 51-56.
- MURAKAMI N. S. NOGAMI M. WATANABE K. IWATSUKI 1999a. Phylogeny of Aspleniaceae inferred from *rbcL* nucleotide sequences. *American Fern Journal*89: 232-243

- NAMBOODIRI, K. K. e BECK, C. B. 1968. A comparative study of the primary vascular system of conifers. III. Stelar evolution in Gymnosperms. *Amer. J. Bot.* 55: 464-472.
- OGURA, Y. 1972. Comparative anatomy of vegetative organs of the pteridophytes. Gebruder Borntraeger, Berlin.
- PERRIE, L. R & ROWNSEY, P.J. 2005. Insights into the biogeography and polyploidy evolution of New Zealand *Asplenium* from chloroplast DNA sequence data. *American Fern Journal* 95 (1): 1-21.
- PRADO, J. 1998. Pteridófitas do estado de São Paulo. Pp 47-61. In: C. E. M. Bicudo & G. J. Sheperd (eds), *Biodiversidade do Estado de São Paulo*. 2. Fungos macroscópicos & plantas. FAPESP, São Paulo.
- RIBEIRO, M.L.R. DA C., COSTA, C. G. & BARROS, C. F. 2007 a. Anatomia e micromorfologia foliar de duas espécies e de um híbrido de *Anemia* Sw. (Anemiaceae-Monilophyta). Dissertação de mestrado, UFRJ, 73p.
- RIBEIRO, M. L. R. da C., MORAES, M & SANTOS, M. G. 2007 b. Leaf anatomy of two *Anemia* SW. Species (Schizaeaceae- Pteridophyta) from a rocky outcrop in Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 30(4):695-702.
- RIBEIRO, M.L.R. DA C., SANTOS, M. G., COSTA, C. G & BARROS, C. F. 2011. Intraespecific variation in four distinct populations of *Anemia villosa* Humb. & Bonpl. ex. Willd (Anemiaceae) occurring in Rio de Janeiro, Brazil. *American Fern Journal* 101(2): 70-80
- ROÇAS, G., BARROS, C. F, SCARANO, F.R. 1997. Leaf anatomy plasticity of *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae) under distinct light regimes in a Brazilian montane Atlantic rain forest. *Trees* 11 (8): 469-473.
- ROLLERI, C., DEFERRI, A., LAVAELE., M DEL C., 1991. Epidermal morphology of the pinnae of *Angiopteris*, *Danaea*, and *Marattia*. *Am. Fern J.* 81 (2): 44-62.
- SEN, U. & DE, B. 1992. Structure and ontogeny of stomata in ferns. *Blumea* 37: 239-261.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1997. SEM studies on vessels in ferns. 3. *Phlebodium* and *Polystichum*. *Int. J. of Plant Sci.* 1158: 343-349.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1998a. Origin and nature of vessels in monocotyledons. 4. Araceae subfamily Philodendroidae. *Journal of the Torrey Bot. Soc.* 125: 253-260.

- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1998b. SEM studies on vessels in ferns. 5. *Woodsia scopulina*. Am. Fern J. 88:17-23.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1998c. Sem studies on vessels in ferns. 7. *Microgramma nitida*. Ann. del Inst. Biol. de la Uni. Auton. de Méx. 69:1-7.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1998d. SEM studies on vessels in ferns. 9. *Dicranopteris* (Gleicheniaceae) and vessels patterns in leptosporangiate ferns. Am. J. of Bot. 85: 1028-1032.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1999a. SEM studies on vessels in ferns. 11. *Ophioglossum*. Bot. J. of the Linn. Soc. 129:105-114.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1999b. SEM studies on vessels in ferns. 13. *Nephrolepis* Am. Fern J. 89: 171-177.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1999c. SEM studies on vessels in ferns.. 15. Selected rosette epiphytes Aspleniaceae, Elaphoglossaceae, Vittariaceae). Int. J. of Plant Sci. 160: 1013-1020.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 2000. SEM Studies on Vessels in Ferns. 17. Psilotaceae. Am. J. of Bot. 87:176-181.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 2000. SEM Studies on Vessels in Ferns. 19. Marsilea. Am. Fern J. 90: 32-41.
- SCHNEIDER, S.M 1993. "Plasticity as a selectable trait: replynto via, American naturalist 142: 371-373.
- SCHLITING, C. D 1986. The evolution of phenotypic plasticity in plants. Ann. Rev. of Ecol.. Syst.. 24:35-68.
- SCHMID, R. 1982. The terminology and classification of steles: historical perspective and the outlines of a system. The Bot.Rev. 48: 817-931.
- SYLVESTRE, L.S. 2001. Revisão taxonômica das espécies da família Aspleniaceae A. B. Frank ocorrentes no Brasil. São Paulo: USP. 571p. Tese de doutorado.
- SYLVESTRE, L. DA S. 2014. Coords. Lista de espécies: samambaias e licófitas. In Forzza, R. C, org., *et al.* Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Catálogo de plantas e fungos do Brazil (on line).
- TRYON, R. M. & TRYON, A. F. 1982. Ferns and allied plants with special reference to Tropical America. Springer-Verlag.
- UMIKALSON, Y. 1992. Anatomical studies of the Malasyan Aspleniaceae and Athyriaceae. Bot. J. of the Linn. Soc. 110: 111-119.

-
- VASCO, A., ROBBIN, C. M., & AMBROSE, B. 2013. The evolution, morphology, and development of fern leaves. *Frontiers in Plant Science* 4:1-15.
- WHITE, R.A., TURNER, M.D. 1995. Anatomy and development of the fern sporophyte. *The Bot. Ver.* 6 n4.
- WINDISCH, P. G. 2000. Pteridologia no Brasil no ano 2005: possíveis cenários P.p 122-125. *In: Tópicos Atuais em Botânica. Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia/ SBB, Brasília.*
- WYLIE, R. B. 1948. The dominant role of the epidermis in leaves of *Adiantum*. *Am. J of Bot:* 35: 465-47.

Capítulo 1

Anatomia de espécies de Aspleniaceae Newman ocorrentes no Brasil: contribuição à taxonomia.

M.L.R WETZEL

Museu Nacional, São Cristóvão, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

L. DA S. SYLVESTRE

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Bloco A, Brasil

R. C. VIEIRA

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Bloco A, Brasil

Anatomia de espécies de Aspleniaceae Newman ocorrentes no Brasil: contribuição à taxonomia.

RESUMO

Vários trabalhos sobre a família Aspleniaceae vem demonstrado a utilidade dos caracteres anatômicos para a taxonomia do grupo, no entanto trabalhos sobre a anatomia de espécies ocorrentes no Brasil são escassos. Com o objetivo de ajudar a preencher tal lacuna o presente trabalho descreve a anatomia do eixo vegetativo de espécies de Aspleniaceae ocorrentes no Brasil e avalia a eficiência dos caracteres anatômicos da folha, da raiz e do caule para a segregação taxonômica dos gêneros e espécies. De fato, a anatomia do grupo se mostrou ser uma boa fonte de informações para a sistemática. Características como a presença de esclerênquima com células de paredes periclinais internas mais espessas na raiz e a distribuição dos meristelos no caule são importantes na segregação do gênero *Hymenasplenium*. Já a ocorrência de ráfides, pequenos cristais, tricomas e o formato do xilema são diagnósticos para algumas espécies.

Palavras-chave: samambaias, Aspleniaceae, *Hymenasplenium*.

ABSTRACT

Several studies on the Aspleniaceae family has demonstrated the usefulness of anatomical characters for the group's taxonomy, however work on the anatomy of species occurring in Brazil are scarce. In order to help fill this gap this paper describes the anatomy of the vegetative axis Species Aspleniaceae occurring in Brazil and evaluates the efficiency of anatomical characters of the leaf, root and stem to the taxonomic segregation of genera and species. In fact, the anatomy of the group turned out to be a good source of information for the systematic. Features such as the presence of sclerenchyma cells with thicker internal periclinal walls at the root and the distribution of meristemes stem are important in segregation *Hymenasplenium* genre. The incidence raphids, small crystals, trichomes and the xylem format are diagnostic for some species.

Keywords: anatomy, ferns, Aspleniaceae, *Hymenasplenium*.

INTRODUÇÃO

Aspleniaceae é uma das maiores e mais derivadas famílias de samambaias leptosporangiadas e vem despertando interesse de vários pesquisadores não somente pela sua morfologia, mas também por vários aspectos de sua anatomia (Kramer & Viane 1990, Schneider *et al.* 2004). Filogeneticamente, está posicionada no clado das Eupolipóides II, cuja maioria dos seus representantes possuem dois feixes vasculares na base do pecíolo e soros lineares indusiados (Schneider *et al.* 2004^a, Smith *et al.* 2006, Rothfels *et al.* 2012, Sundue & Rothfels 2014)

A família se caracteriza pela presença de caule com estelo do tipo dictiostelo. A disposição e tamanho dos meristelos no órgão foi utilizada por Hayata (1927) na segregação do gênero *Hymenasplenium*, o que demonstra a grande importância dos caracteres anatômicos para a família. Outras características como tipos de estômatos (Sem & De 1992, Apostolakis & Galatis 1999), tipos de feixe vascular (Iwatsuki & Kato 1975, Umikalsen 1992), falsas venações, formato do xilema na região distal do pecíolo (Ogura 1972) e presença de substâncias ergásticas e compostos fenólicos variam entre as espécies e foram usados com sucesso na taxonomia do grupo. Mais recentemente, alguns trabalhos apontam a utilidade de características anatômicas na compreensão de vários aspectos funcionais (Schneider *et al.* 2004b, Leroux *et al.* 2011b) e ainda há trabalhos que utilizam dados anatômicos na análise filogenética do grupo (Schneider *et al.* 2004b, Hernandez-Hernandez *et al.* 2012).

Apesar da anatomia da família Aspleniaceae já ter despertado o interesse de pesquisadores em todo o mundo, trabalhos com espécies brasileiras são praticamente inexistentes (Sylvestre 2001), e apenas uma dissertação sobre a anatomia da folha foi encontrada (Ferrari 2009). Tal fato surpreende, já que é na região tropical que ocorre a maior diversidade tanto de espécies quanto de habitats e isso provavelmente implica em maior variedade morfológica.

O presente trabalho tem como objetivos descrever a anatomia do eixo vegetativo de espécies de Aspleniaceae ocorrentes no Brasil e avaliar a eficiência dos caracteres anatômicos da folha, da raiz e do caule para a segregação taxonômica dos gêneros e espécies. Além disso verificar se anatomia peculiar da

raiz de Aspleniaceae é realmente a sinapomorfia da família como proposto por Schneider (2004b).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de 20 espécies de Aspleniaceae Newman que abrangem representantes de todos os grupos de afinidade apontados por Tryon & Tryon (1982). Os indivíduos foram imediatamente conservados em álcool 70% (Johansen 1940) e seus respectivos locais de coleta e habitat encontram-se discriminados na tabela 1.

Foram feitos cortes transversais nas regiões proximal, mediana e distal de todas as raízes, que tem entre 4 e 10 cm de comprimento. Os caules foram seccionados transversalmente e longitudinalmente. Como em *Asplenium* os caules eretos são normalmente mais curtos (até cerca de 5 cm) e os reptantes mais longos e ramificados optou-se por cortar ambos na região mediana. Para a análise da folha foram utilizadas frondes adultas e totalmente expandidas. No pecíolo foram feitos cortes nas regiões proximal, mediana e distal, enquanto no terço médio da lâmina foliar, foram feitos cortes transversais na nervura mediana, na região intercostal, e no bordo.

As secções foram feitas à mão livre, com lâmina de barbear e em micrótomo rotativo, quando incluídas em Histoiresina (Leica). Os cortes feitos à mão livre foram colocados no hipoclorito de sódio, água acidulada, lavados em água destilada, corados com safranina-azul de Astra, desidratados em série etílica, a seguir no xilol e montados em bálsamo-do-Canadá (Bukatsh 1972). O material incluído em histoiresina foi corado com azul de toluidina (O'Brien et al. 1965) em tampão fosfato, utilizando-se bálsamo-do-Canadá como meio de montagem.

Para a dissociação da epiderme e preparação de macerados utilizou-se o método de Franklin (1945 *apud* Kraus e Arduin 1997, modificado), com ácido acético e peróxido de hidrogênio corado com safranina 1% em etanol 50 GL (Johansen 1940) e montado em glicerina.

Testes histoquímicos foram feitos em folhas frescas tratadas com os seguintes reagentes: Sudan III, para detectar lipídeos (Jensen 1962); Lugol para grãos de amido (Langeron 1949); cloreto de zinco iodado para celulose (Jensen 1962). A detecção de compostos fenólicos foi feita com sulfato ferroso (Johansen 1940).

As descrições anatômicas foram realizadas usando um microscópio óptico Olympus BX50 acoplado com software de análise de imagens Image-Pro Plus versão3. As imagens foram capturadas com o uso de uma câmera Cool SNAP-Pro acoplada ao microscópio óptico.

Para a identificação dos estômatos optou-se por utilizar a classificação proposta por Sen & De (1992).

Tabela 1. Espécies de Aspleniaceae Newman coletadas com os respectivos locais de coleta e habitat.

Espécies	Número de coleta	Localização	Habitat
<i>Asplenium auriculatum</i> Sw.	Damascen, 396 (RB)	Itatiaia, RJ	rupícola
<i>A. auritum</i> Sw.	Damasceno, 425 (RB)	Itatiaia, RJ	rupícola
<i>A. balansae</i> (Baker) Sylvestre	M. G. Santos, 1080 (RB)	Niterói, RJ	terrícola
<i>A. castaneum</i> Scchltl. & Cham	Condack & Damasceno s.n (RFA)	Caparaó, MG	rupícola
<i>A. douglassi</i> Hook. & Grev.	Bovini 3689 (RB)	Ilhas Cagarras, RJ	terrícola
<i>A. harpeodes</i> Kunze	Damasceno 352 (RB)	Itatiaia, RJ	saxícola
<i>A. inaequilaterale</i> Willd	Sylvestre 2209 (RB)	Cachoeiras de Macacu, RJ	rupícola
<i>A. kunzeanum</i> Klotzsch ex Rosenst.	Damasceno 403 (RB)	Itatiaia, RJ	terrícola
<i>A. martianum</i> C. Chr	Sylvestre 2159 (RB)	Itatiaia, RJ	terrícola
<i>A. monanthes</i> L.	Sylvestre 2189 (RB)	Itamonte, MG	rupícola
<i>A. mourai</i> Hieron.	Damasceno 402 (RB)	Itatiaia, RJ	saxícola
<i>A. oligophyllum</i> Kaulf.	Damasceno 401 (RB)	Itatiaia, RJ	terrícola
<i>A. pseudonitidum</i> Hook.	Sylvestre 2175 (RB)	Teresópolis, RJ	terrícola
<i>A. raddianum</i> Gaudich.	Sylvestre 2179 (RB)	Itatiaia, RJ	epífita
<i>A. regulare</i> Sw.	Jascone s.n	Guapimirim, RJ	Rupícola
<i>A. scandicinum</i> Kaulf.	Damasceno 392 (RB)	Itatiaia, RJ	epífita
<i>A. serra</i> Langsd. et Fisch.	Sylvestre 2164 (RB)	Itatiaia, RJ	terrícola
<i>A. serratum</i> L.	(RFA)	Nova Iguaçu, RJ	rupícola
<i>A. unisseriale</i> Raddi	Sylvestre 2174 (RB)	Teresópolis, RJ	terrícola
<i>Hymenasplenium triquetrum</i> (N. Murak. et R. C. Moran) L. Regalado & Prada	Sylvestre 2208 (RB)	Cachoeiras de Macacu, RJ	Rupícola

RESULTADOS

Descrição anatômica

Raiz (Figuras 1-8)

O sistema radicular é fasciculado com várias raízes adventícias desenvolvendo-se a partir do caule. Na maior parte das espécies analisadas a raiz é delgada e somente em algumas espécies terrícolas foi possível observar raízes um pouco mais espessas

A epiderme das espécies de Aspleniaceae analisadas, no plano transversal, apresenta células comuns com parede periclinal externa convexa (Figura 1). Na região distal é possível observar pêlos radiculares, que são, no entanto, escassos sendo comum a ocorrência de apenas dois ao se observar uma secção transversal.

O córtex externo é composto por parênquima (Figuras 1, 2 e 3) com células poliédricas de parede delgada. Os espaços intercelulares são inconspícuos e de difícil visualização. Micróbios invasores são observados dentro das células parenquimáticas de *Hymenasplenium triquetrum* e *Asplenium unisseriale* (Figura 2), onde foi possível observar hifas de fungos. Outra característica constante nas espécies analisadas é a presença de deposições na parede celular (CWAs), que no córtex externo, podem se apresentar como espessamentos em hélice (HCWTs) (Figura 3).

O córtex interno é marcado pela presença de esclereídes que formam uma banda ao redor da endoderme (banda circuendodérmica) (Figura 4). A mesma ocorre em todas as espécies analisadas, mas existem aspectos que variam. Na região distal é comum observar apenas uma camada (Figura 5), enquanto na proximal é possível observar até 3 camadas (Figuras 6 e 7). Em quase todas as espécies analisadas os esclereídes apresentam parede periclinal interna visivelmente mais espessa que a periclinal externa, mas *H. triquetrum* apresenta duas camadas com células de espessamento simples (Figura 8), e nenhuma camada contendo células de espessamentos desiguais opondo-se a todas as outras espécies de Aspleniaceae descritas até então. A endoderme está presente, mas é de difícil

visualização já que é comum as células se romperem durante o processo de coloração do corte.

O cilindro vascular apresenta mais comumente disposição diarca (Figuras 5 e 7), mas em *H. triquetrum* e *A. mourai* é possível também observar disposição triarca (Figuras 6 e 8). Os elementos do xilema estão reunidos no centro pelos elementos do metaxilema e os elementos de protoxilema (2-4 elementos) estão em posição exarca. O floema encontra-se alternado com o xilema.

Caule (Figuras 9-20)

As espécies analisadas apresentam desde caules eretos a curto ou longo reptantes. A epiderme é uniestratificada e com cutícula delgada (Figura 9). A presença de escamas clatradas é comum nas espécies analisadas (Figura 12) e podem ser observadas com maior ou menor frequência. Estômatos não foram observados.

No córtex de *Asplenium uniserialis* é possível observar tecido protetor semelhante a um súber e impregnado de tanino (Figura 11), no qual as células estão em constante divisão com núcleo sempre bem evidente. Em algumas espécies foi constatada a presença de esclerênquima e em *A. mourai* podem ser observadas células com espessamentos desiguais na parede (Figura 10). O parênquima, assim como o da raiz, apresenta espaços intercelulares inconspícuos (Figuras 9 e 10). As células parenquimáticas são grandes e a presença de amido é abundante na maior parte das espécies, especialmente em *A. douglasii*. Já a presença de tanino é restrita a poucas espécies e pode ser observado em algumas células aleatórias do parênquima (Figura 18) ou ainda formando uma camada ao redor da endoderme denominada banda circundodérmica (Figuras 16, 17 e 19). A maior parte das espécies, no entanto, não apresenta tal banda (Figura 15). A endoderme é de fácil reconhecimento em todas as espécies com as estrias de Caspary sempre bem evidentes (Figura 20).

Na maior parte das espécies analisadas é possível observar o típico dictiostelo de Aspleniaceae, com 4 - 6 lacunas dispostas no cilindro central do caule (Figura 13). Enquanto em *H. triquetrum* o dictiostelo é dorsiventral com 2 meristelos dorsais menores e dois ventrais maiores (Figura 14). Cada meristelo

circundado por sua própria endoderme e periciclo. O último é composto de células parenquimáticas regularmente arranjadas em uma camada (podendo eventualmente apresentar 2 ou até 3 camadas descontínuas), enquanto a endoderme é facilmente reconhecida pela presença de estrias de Caspary (Figura 18). Os meristelos são hadrocêntricos com estrutura binária (vasos de metaxilema no centro, e elementos de protoxilema em contato com o periciclo). A medula ocupa a área central do rizoma. Os meristelos podem ser circundados por células taníferas (*H. triquetrum*) ou células esclerenquimáticas. O floema é constituído de células crivadas e o xilema (Figura 15 e 16) será detalhado no Capítulo 2.

Pecíolo (Figuras 21-41)

A epiderme é uniestratificada com células de paredes delgadas (Figuras 21 e 22), com exceção de *Asplenium unisseriale* que apresenta células de paredes espessas, o que confere o aspecto lustroso ao pecíolo de tais plantas e pode facilmente identificado sem auxílio de lupa.

No córtex externo, a maior parte das espécies apresenta algumas camadas de esclerênquima (Figuras 21 e 22); em *A. serratum* essas células apresentam espessamentos desiguais (Figura 23). *A. auriculatum* e *A. auritum* apresentam estruturas denominadas linhas laterais. Tratam-se de duas linhas que percorrem as laterais do pecíolo desde a região proximal até a distal. Em seção transversal podem ser facilmente localizadas no córtex pela presença de grandes espaços intercelulares (Figuras 31 e 32) e estômatos (Figura 24). As camadas de esclerênquima que ocorrem abaixo da epiderme de algumas espécies são interrompidas na região das linhas laterais em *A. auritum* (Figura 32). Na região das alas laterais em *A. mourai* (Figura 34) o esclerênquima também é interrompido. O parênquima apresenta espaços intercelulares inconspícuos e células sem conteúdo (Figura 25), mas em algumas espécies como *A. auritum*, é possível observar espaços maiores na região das linhas laterais (Figura 26). Em *A. serratum* o córtex apresenta em algumas regiões grandes espaços onde as células ao redor contém paredes bem espessadas (Figura 27) que posteriormente se lignificam (Figura 28).

No córtex interno, a maior parte das espécies analisadas, apresenta banda circundodérmica (Figuras 29, 30, 32, 34, 35, 36, 38 e 39), com exceção de *A. auriculatum* (Figura 31), *A. Kuzeanum* (Figura 33) e *A. oligophyllum*. A bainha circundodérmica pode ocorrer tanto na região proximal quanto na distal do pecíolo ou em somente uma dessas regiões como apresentado em *A. serratum* e *A. unisseriale*, nas quais é possível observar somente algumas células com tanino na região proximal (Figura 30). Em *A. auritum* a banda é formada por agrupamentos de esclerênquima (Figuras 36 e 38), e nas demais por células com conteúdo tanífero. A endoderme está sempre presente com estria de Caspary bem nítida.

O feixe vascular é sempre anficrival (Figuras 37-41). Na região proximal do pecíolo é possível observar dois meristelos que normalmente se unem na região distal, mas em algumas espécies como *A. auritum* é observado somente um feixe. Nos meristelos da região proximal o xilema tem forma de arco e não forma gancho nas extremidades (Figura 30), mas em *A. oligophyllum* e *A. pseudonitidum* (Figura 29) são formados ganchos nas extremidades caracterizando o xilema em forma de cavalo-marinho (tipo Hipocampus). Já na região distal, a configuração do xilema pode ser em V como em *A. auriculatum* (Figura 37), U como em *A. auritum* (Figura 38) e *A. serra* (Figura 41), X bem evidente como observado em *A. serratum* (Figura 40) e ainda um X mais discreto como na maioria das espécies (Figuras 33, 34, 35 e 39).

Lâmina foliar (Figuras 42-72)

As frondes apresentam forma e tamanho variado e podem ser simples e inteiras como ocorre em *Asplenium serratum*, *A. douglasii* e *A. balansae*, ou compostas como as demais. A lâmina foliar, em vista frontal, apresenta as faces adaxial e abaxial da epiderme com células ordinárias de paredes anticlinais sinuosas na maioria das espécies (Figura 46), e levemente sinuosas em *A. raddianum*, *Hymenasplenium triquetrum* e *A. scandicinium* (Figuras 42, 43 e 47). A presença de cloroplastos nas células ordinárias de ambas as faces da epiderme é observada na maioria das espécies, sendo que em *A. inaequilaterale* o número de cloroplastos é visivelmente maior. Em *A. serratum* e *A. monanthes* não são observados cloroplastos. Todavia, em *A. monanthes* e *A. douglasii* o núcleo é bem

visível em todas as células (Figuras 44 e 53). Em *A. scandicinium* e *Hymenasplenium triquetrum* foram observadas ráfides (Figura 47) em todas as células da epiderme, enquanto em *A. serratum* e *A. unisseriale* foi observado aglomerado de pequenos cristais (Figura 52). As folhas são hipostomáticas e em *A. monanthes* os estômatos se distribuem em faixas (Figura 48). Na região das nervuras é possível observar células mais alongadas na região das nervuras em algumas espécies como *A. auritum* (Figura 50). Em *A. monanthes* é possível ainda observar tricomas tectores unisseriados (Figura 49). Os estômatos são do tipo polocítico (Figura 52), copolocítico e anomocítico (Figura 51), estando o primeiro tipo presente em todas as espécies.

No corte transversal é possível observar epiderme simples e uniestratificada, com células maiores na base do indúcio (Figura 57). Em *A. monanthes* as células epidérmicas da face adaxial tem formato de H (figura 58).

Na região intercostal o parênquima clorofiliano lacunoso que pode ter de 4 camadas como em *A. serra* (Figura 59) até cerca de 7 camadas como em *A. auritum* (Figura 60). Não foram observadas falsas venações e o bordo foliar é arredondado (Figura 61). Em *A. monanthes* o bordo é soldado ao indúcio protegendo os leptosporângios (Figura 62).

A região da nervura mediana, vista transversalmente, na altura do terço médio pode apresentar contorno plano como ocorre em *A. auriculatum*, convexo-convexo, em *A. kuzeanum* (Figura 64) e *A. oligophyllum* (Figura 66) ou plano-convexo, em *A. radiannum* (Figura 67) e *A. pseudonitidum* (Figura 68). O parênquima pode ser mais compactamente arranjado como ocorre em *A. kuzeanum* (Figura 64), *A. oligophyllum* (figura 66) e *A. radiannum* ou conter espaços intercelulares conspícuos como ocorre em *A. auriculatum* (Figura 61) e *A. raddianum* (Figura 68). Somente em *A. mourai* (Figura 63) foi observada uma banda circundodérmica, que é do tipo descontínua e caracterizada por células taníferas. Em todas as espécies é possível observar endoderme com estria de Caspary. Em *A. serratum* algumas células apresentam parede com espessamentos que formam sinuosidades (Figura 69)

O feixe vascular é sempre anficrival (Figura 70-71). Em *A. serratum* é possível observar células mucilaginosas no parênquima junto ao xilema (Figura 72). No estado inicial do desenvolvimento as células secretoras são iguais em

tamanho às células parenquimáticas vizinhas, mas depois de totalmente diferenciadas tornam-se muito maiores. Posteriormente, estas do parênquima se desintegram para dar lugar às cavidades.

Os quadros 1, 2 e 3 resumem as características anatômicas observadas na raiz, no caule e na folha.

Quadro 1. Caracteres de utilidade taxonômica da raiz e do caule de espécies de Aspleniaceae

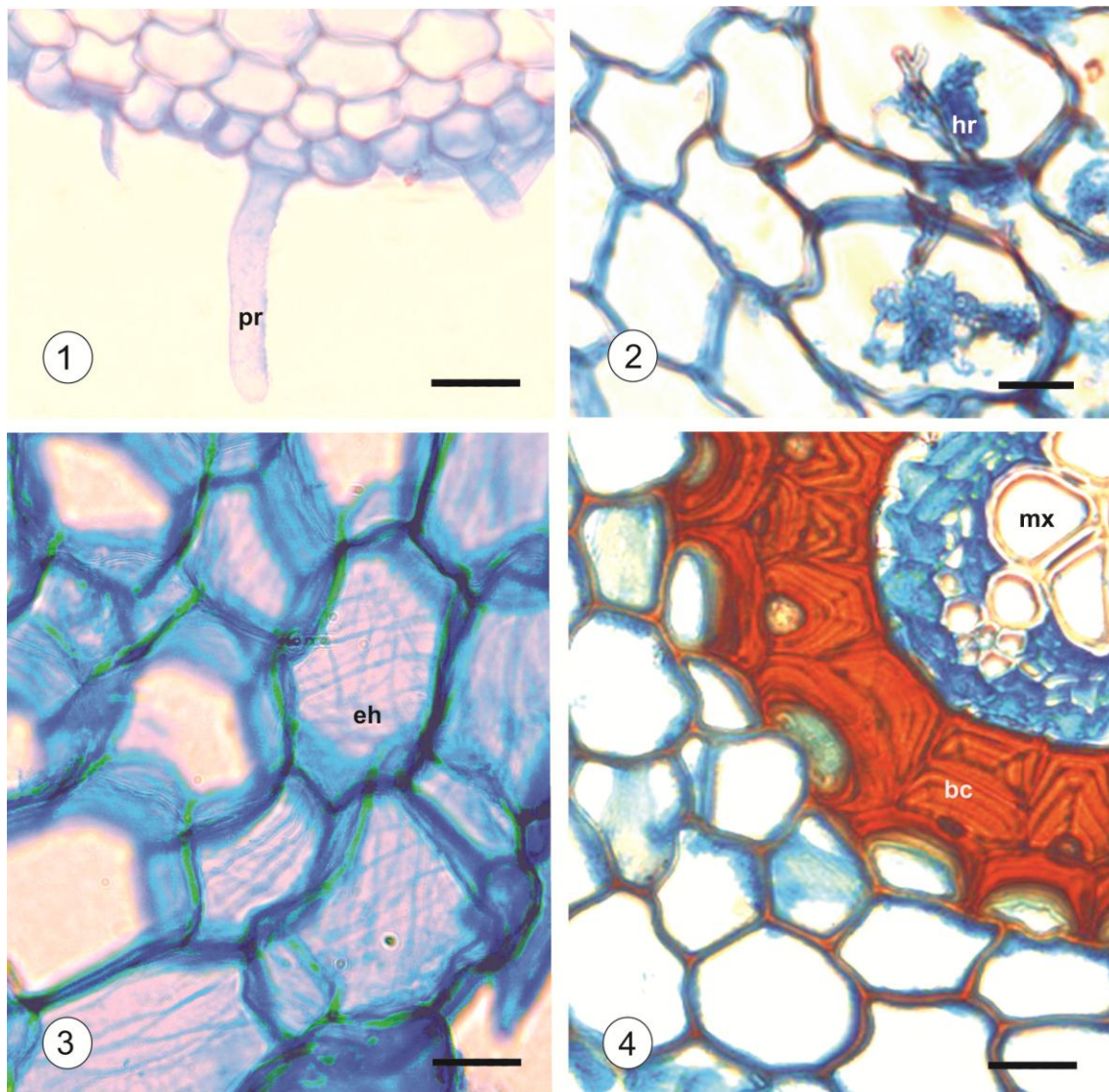
Taxon	Caracteres		
	Raiz		Caule
	Esclereídes da bainha circundodérmica com espessamentos uniformes	Cilindro vascular com xilema em disposição triarca	Bainha circundodérmica
<i>Asplenium auriculatum</i>			
<i>A. castaneum</i>			
<i>A. douglasii</i>			X
<i>A. monanthes</i>			
<i>A. mourai</i>		X	
<i>A. oligophyllum</i>			
<i>A. pseudonitidum</i>			X
<i>A. regulare</i>			
<i>A. serra</i>			
<i>A. serratum</i>			
<i>A. unisseriale</i>			
<i>Hymenasplenium triquetrum</i>	X	X	

Quadro 2. Caracteres de utilidade taxonômica do pecíolo de espécies de Asplenaceae

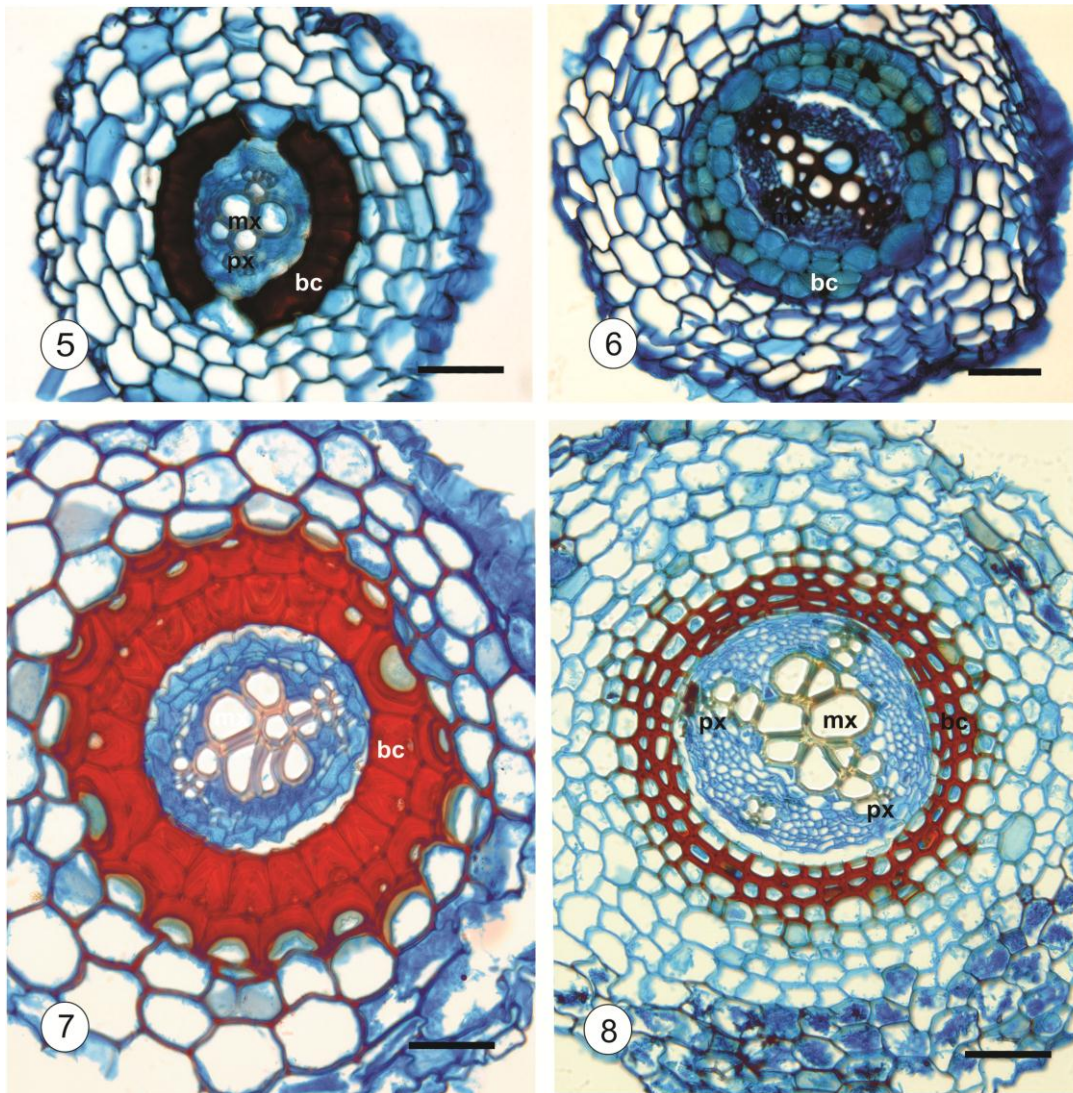
Táxon	Caracteres										
	Pecíolo										
	Epiderme com células espessadas	Linhas laterais	Esclerênquima abaixo da epiderme	Xilema em forma de V	Xilema em forma de X	Xilema em forma de U	Bainha circundodérmica				
<i>Asplenium auriculatum</i>		X		X							X
<i>A. auritum</i>		X	X						X		X
<i>A. balansae</i>					X						X
<i>A. castaneum</i>					X						X
<i>A. douglasii</i>					X						X
<i>A. harpeodes</i>					X						X
<i>A. inaequilaterale</i>					X						X
<i>A. kunzeanum</i>					X						
<i>A. martianum</i>					X						X
<i>A. monanthes</i>					X						X
<i>A. mourai</i>					X						X
<i>A. oligophyllum</i>					X						
<i>A. pseudonitidum</i>					X						X
<i>A. raddianum</i>					X						X
<i>A. regulare</i>			X								X
<i>A. scandicinium</i>					X						X
<i>A. serra</i>					X						X
<i>A. serratum</i>					X						X
<i>A. unisseriale</i>					X						X
<i>Hymenasplenium triquetrum</i>	X										X

Quadro 3. . Caracteres de utilidade taxonômica da lâmina foliar de espécies de Aspleniaceae Newman.

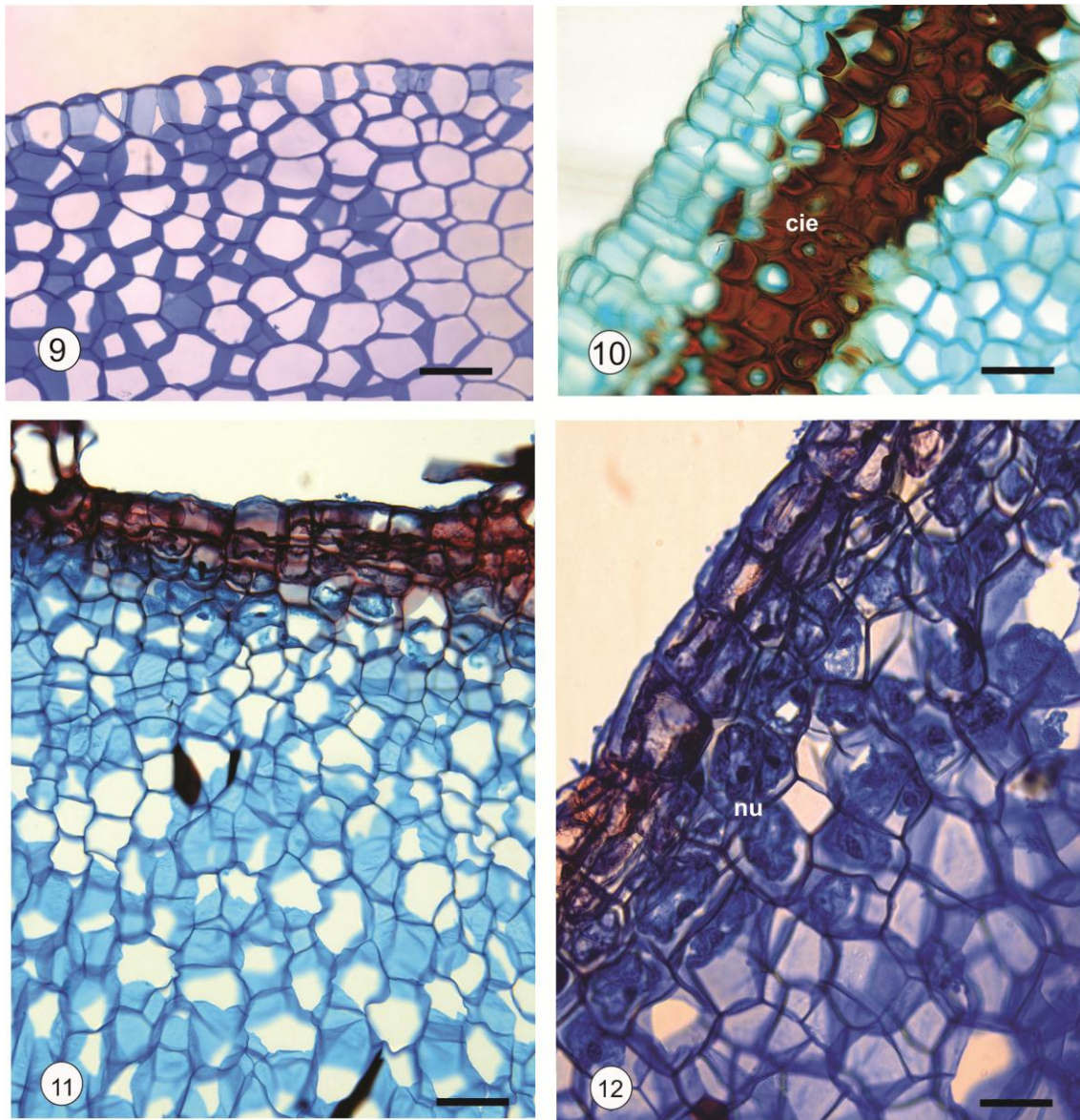
Táxon	Caracteres									
	Lâmina foliar									
	Células mais alongadas na região dos feixes	Cloroplastos nas células da epiderme	Ráfides nas células da epiderme	Pequenos cristais nas células da epiderme	Tricomas	Bainha circundodérmica	Estômato polocítico	Estômato anomocítico	Estômato copolocítico	
<i>Asplenium auriculatum</i>		X					X	X		
<i>A. auritum</i>	X						X			
<i>A. balansae</i>		X					X		X	
<i>A. castaneum</i>		X					X			
<i>A. douglasii</i>		X					X		X	
<i>A. harpeodes</i>		X					X		X	
<i>A. inaequilaterale</i>		X					X			
<i>A. kunzeanum</i>		X					X			
<i>A. martianum</i>		X					X			
<i>A. monanthes</i>		X					X			
<i>A. mourai</i>		X			X		X			
<i>A. oligophyllum</i>		X					X		X	
<i>A. pseudonitidum</i>	X	X					X		X	
<i>A. raddianum</i>							X			
<i>A. regulare</i>		X					X			
<i>A. scandicinium</i>		X	X				X			
<i>A. serra</i>		X					X			
<i>A. serratum</i>	X			X			X			
<i>A. unisseriale</i>		X		X			X			
<i>Hymenasplenium triquetrum</i>	X	X					X			



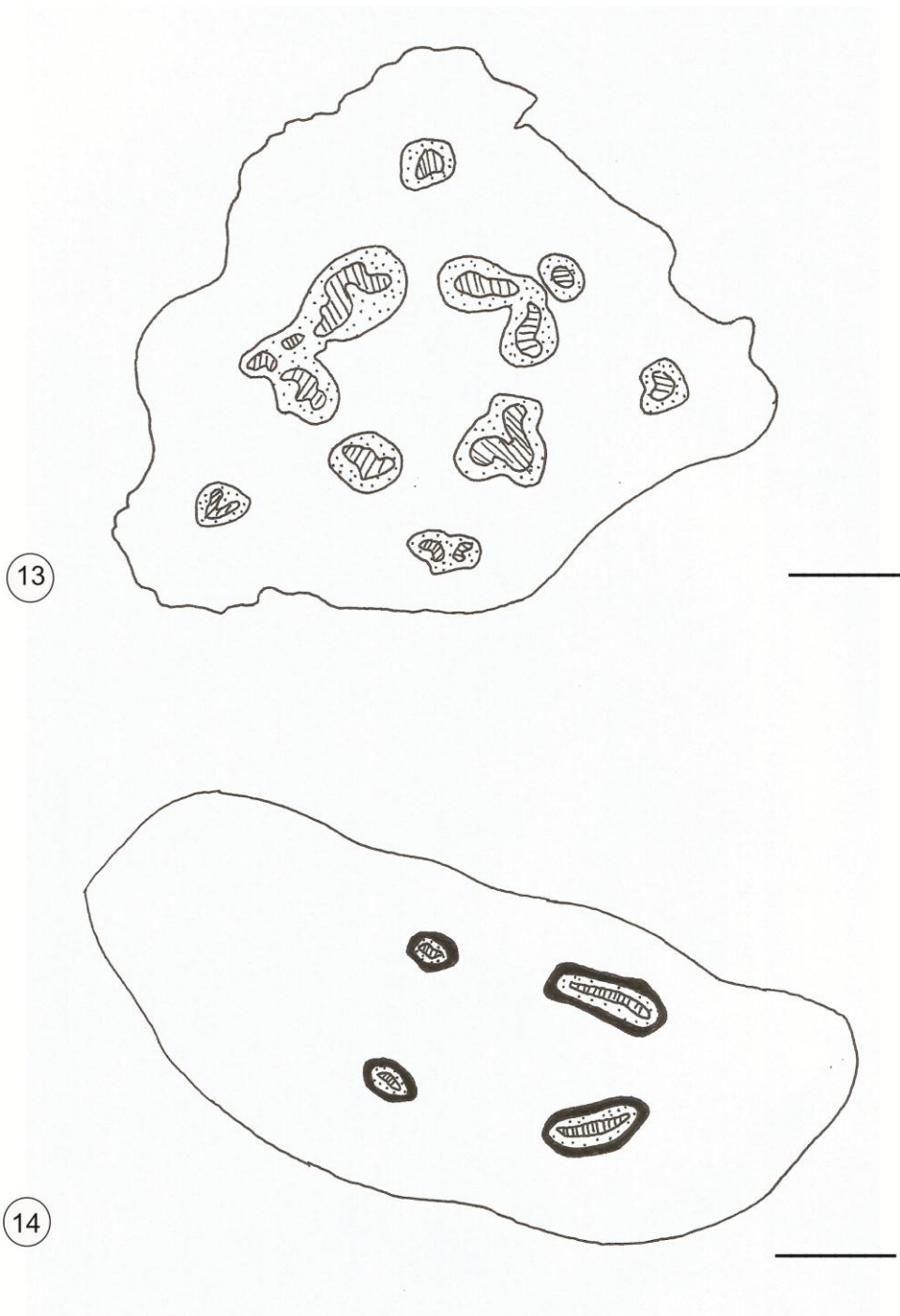
Figuras 1-4. Corte transversal da raiz de espécies de Aspleniaceae 1. *Asplenium radianum*, evidenciando pêlo radicular, 2. *Hymenasplenium triquetrum*, com infecção de fungos no detalhe, 3. *A. serratum*, indicando células do parênquima com espessamento em hélice, 4. Porção proximal da raiz de *A. unisseriale*, e células de esclerênquima com espessamento nas paredes periclinais internas Barra = 100 μm (1), 50 μm (2, 4 e 5). Legendas: pr pêlo radicular; eh espessamentos em hélice; hr hifas de fungos; mx metaxilema; bc bandacircuendodérmica.



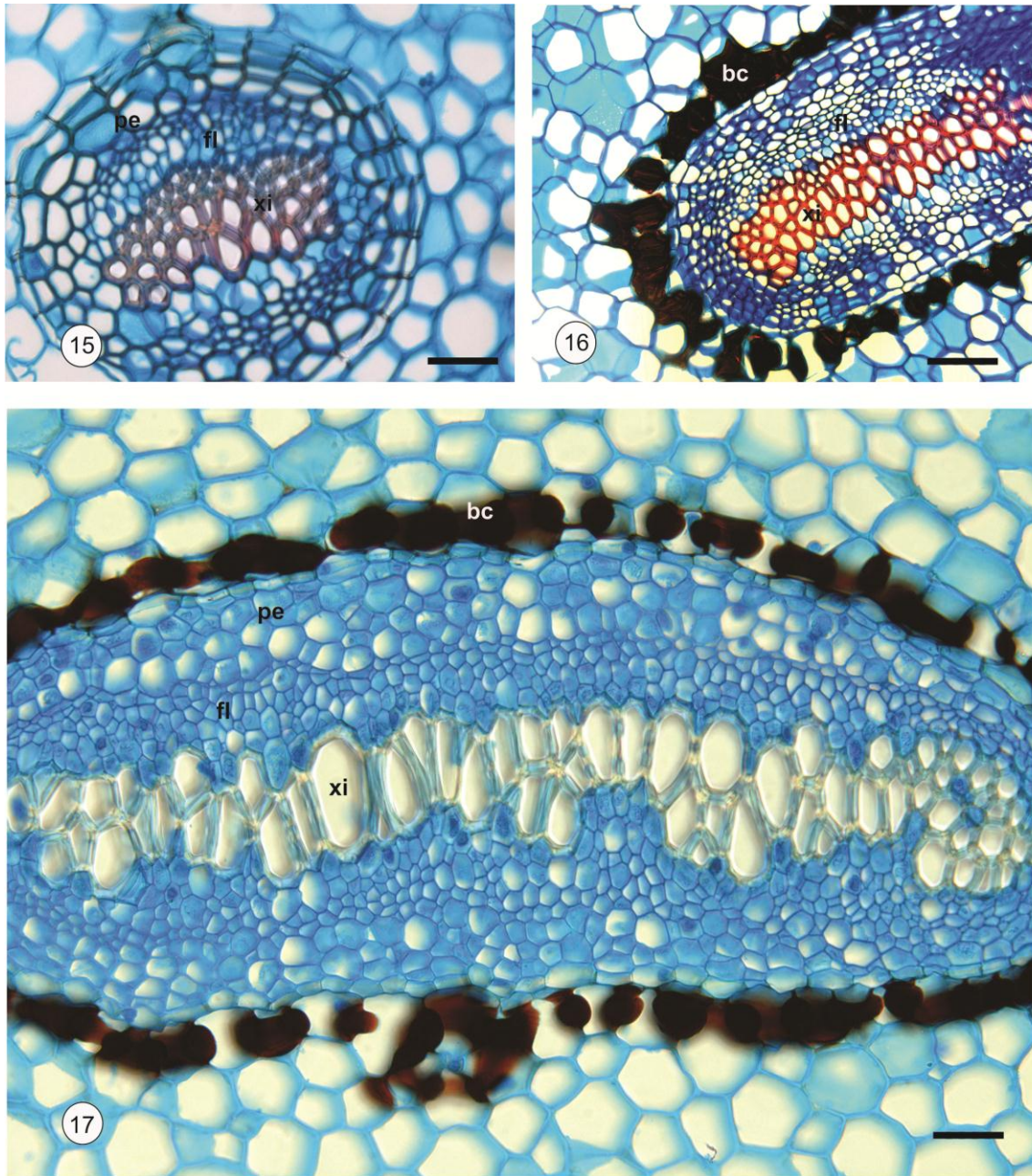
Figuras 5-8. Corte transversal da raiz de espécies de Aspleniaceae: 5. *Asplenium unisseriale*, e as células do esclerênquima com paredes periclinais internas mais espessas e duas células de passagem (região distal da raiz). 6. Porção distal da raiz de *A. mourai*, 7. *A. unisseriale* na região proximal, 8. Porção proximal da raiz de *Hymenasplenium triquetrum*, evidenciando células do esclerênquima com espessamento simples. Barra = 100 μm (5, 6 e 7), 50 μm (8). Legendas: px protoxilema; mx metaxilema; bc banda circundodérmica.



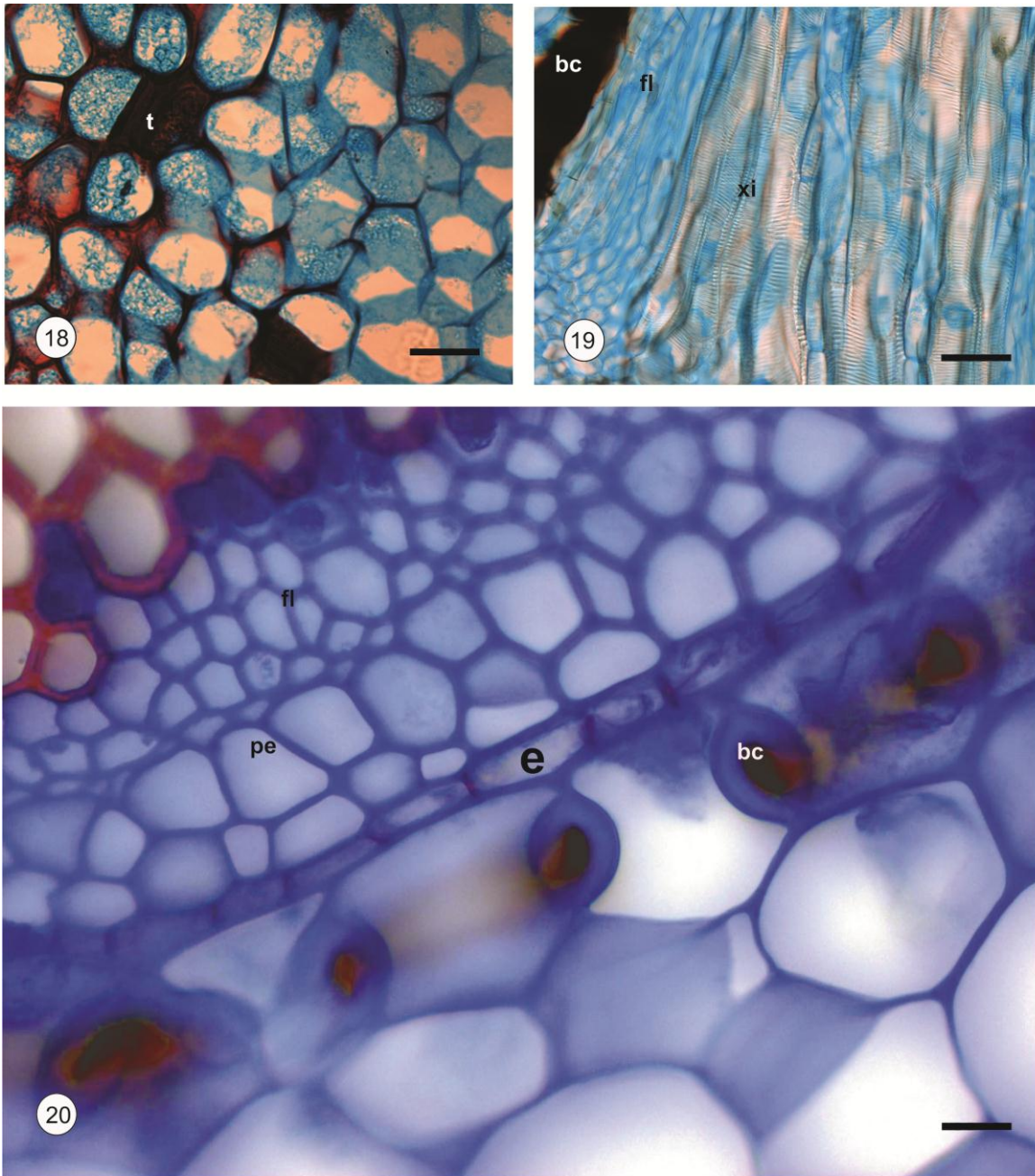
Figuras 9-12 Corte transversal do caule de espécies de Aspleniaceae 9. *Asplenium pseudonitidum*, evidenciando as células da epiderme sem espessamento 10. *A. mourai* e o detalhe das células com espessamento nas paredes periclinais internas em células do córtex externo, 11. *A. uniseriale* com células em divisão no tecido de proteção, 12. Detalhe do tecido de proteção de *A. uniseriale*. Barras = 50 μ m (12) 100 μ m (9, 10 e 11). Legendas: cie células irregularmente espessadas; nu núcleo.



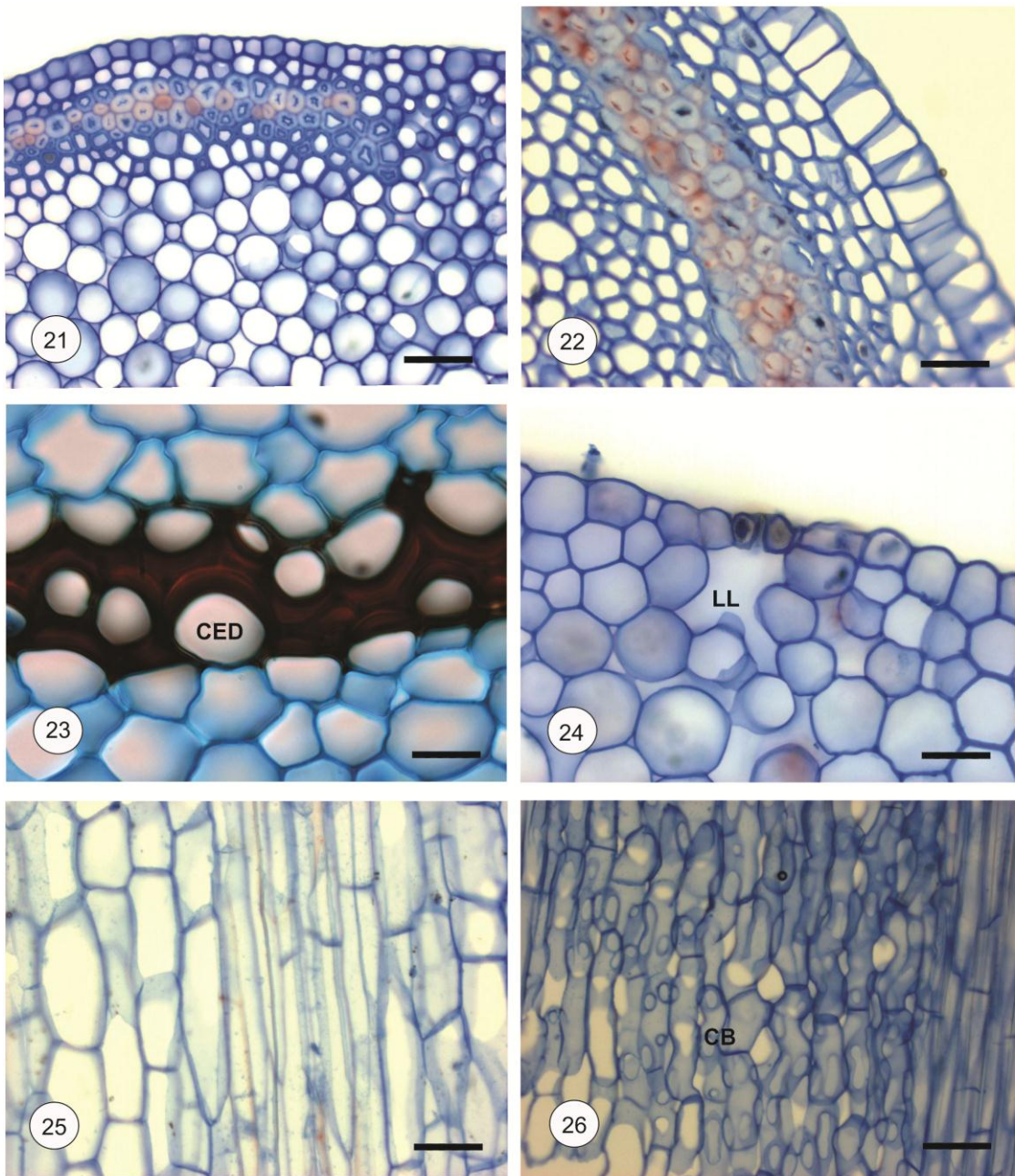
Figuras 13-14. Esquemas do caule em corte transversal. 13. *Asplenium monanthes* evidenciando dictiostelo com traços foliares radialmente dispostos no cilindro central do caule e 14. *Hymenasplenium triquetrum*, dictiostelo dorsiventral com 2 meristelos dorsais menores e dois ventrais maiores. Barra= 1mm.



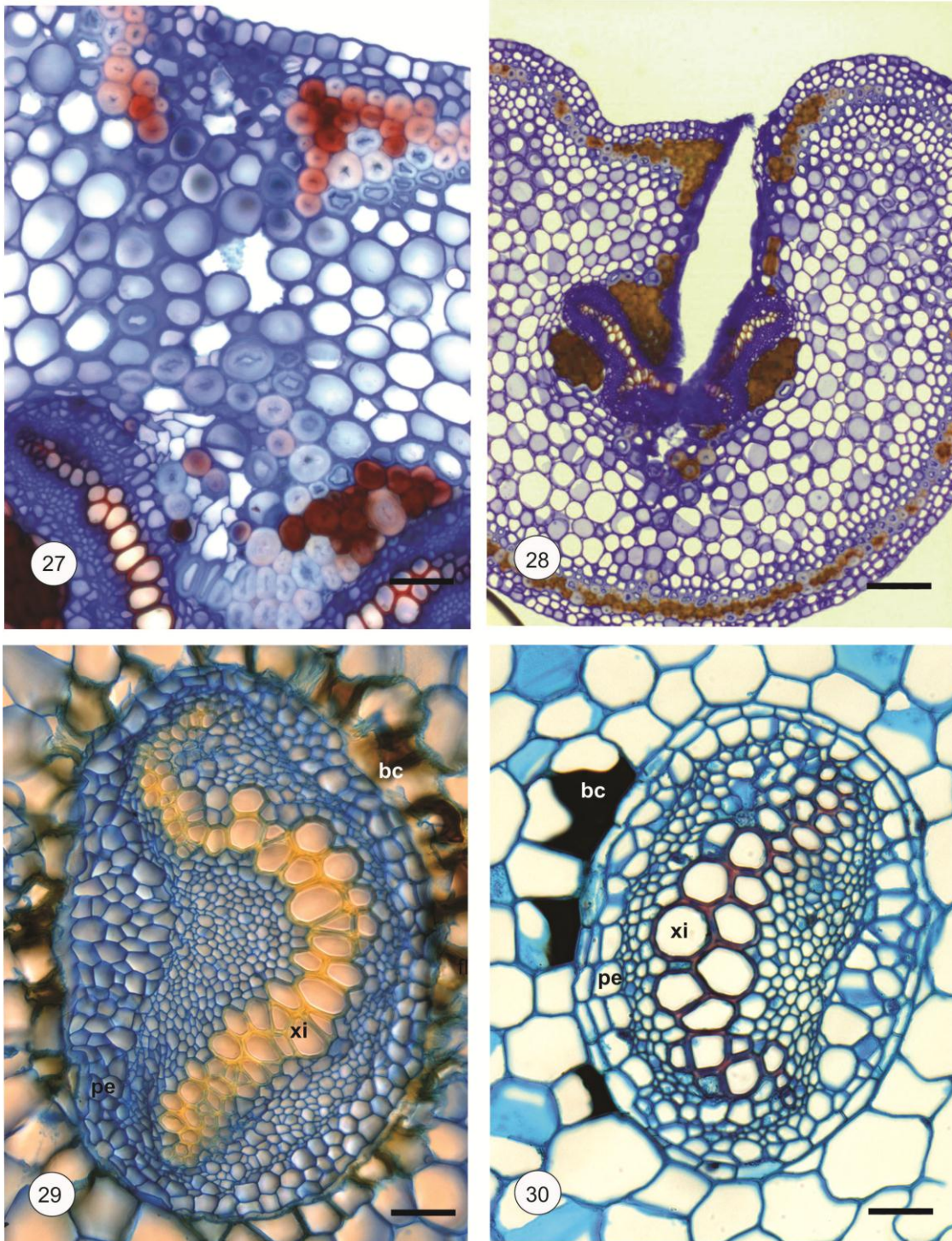
Figuras 15-17 Caule de espécies de Aspleniaceae. 15. Meristelo de *Asplenium monanthes* em corte transversal, 16. Meristelo de *A. pseudonitidum* evidenciando banda circundodérmica. 17. Meristelo de *Hymenasplenium triquetrum* em corte transversal. Barras= 50 μm (15 e 16) 100 μm (17). Legendas xi xilema; fl floema; pe periciclo; bc banda circundodérmica.



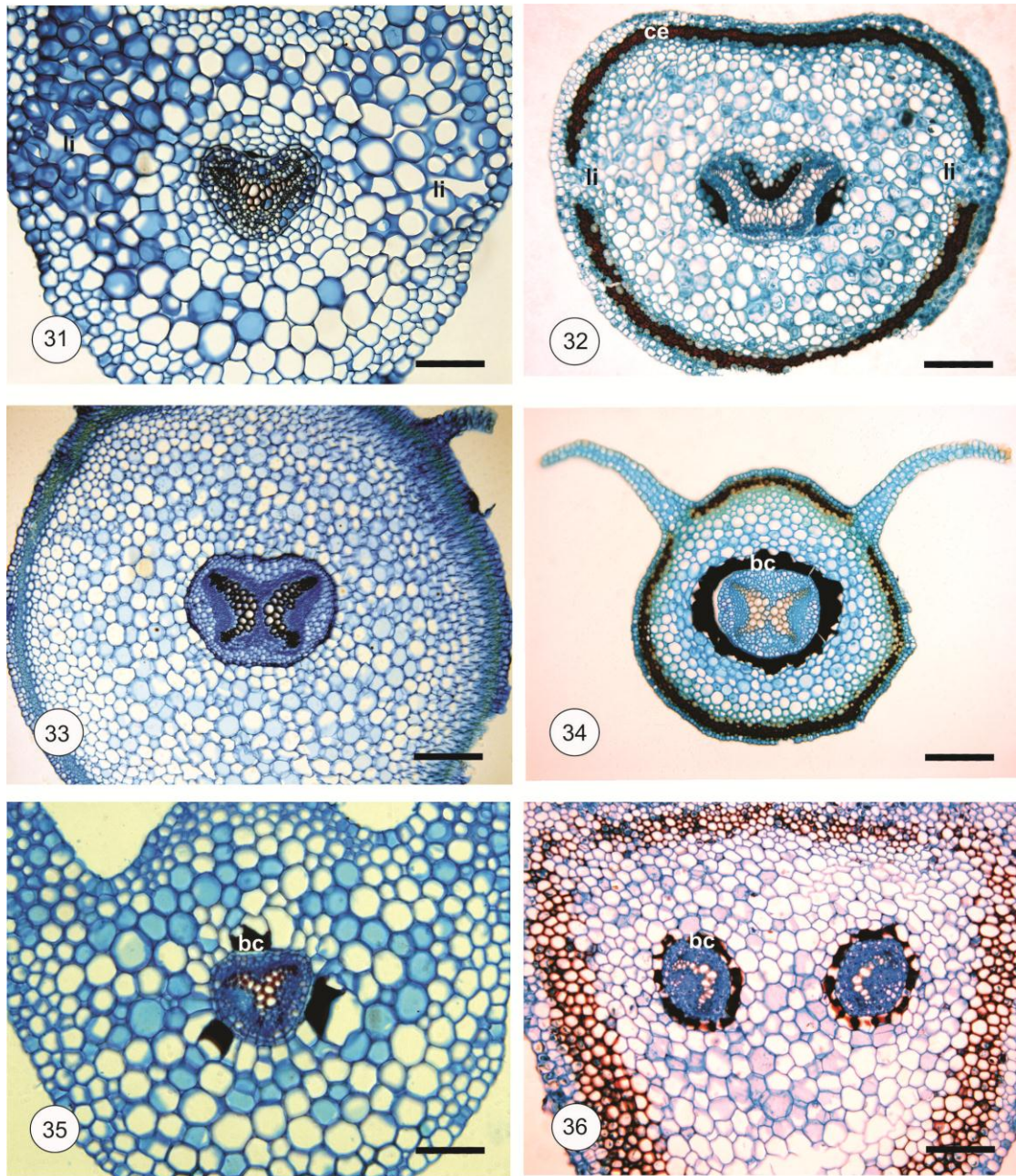
Figuras 18-20 Caule de espécies de Aspleniaceae. 18. Córtex de *Asplenium unisseriale* em corte transversal, 19. Meristelo de *Hymenasplenium triquetrum* em corte longitudinal evidenciando banda circundodérmica. 20. Detalhe do meristelo de *H. triquetrum* em corte transversal. Barras= 50 μm (19 e 20) 100 μm (18). Legendas xi xilema; fl floema; pe periciclo; bc banda circundodérmica; t tanino; e endoderme.



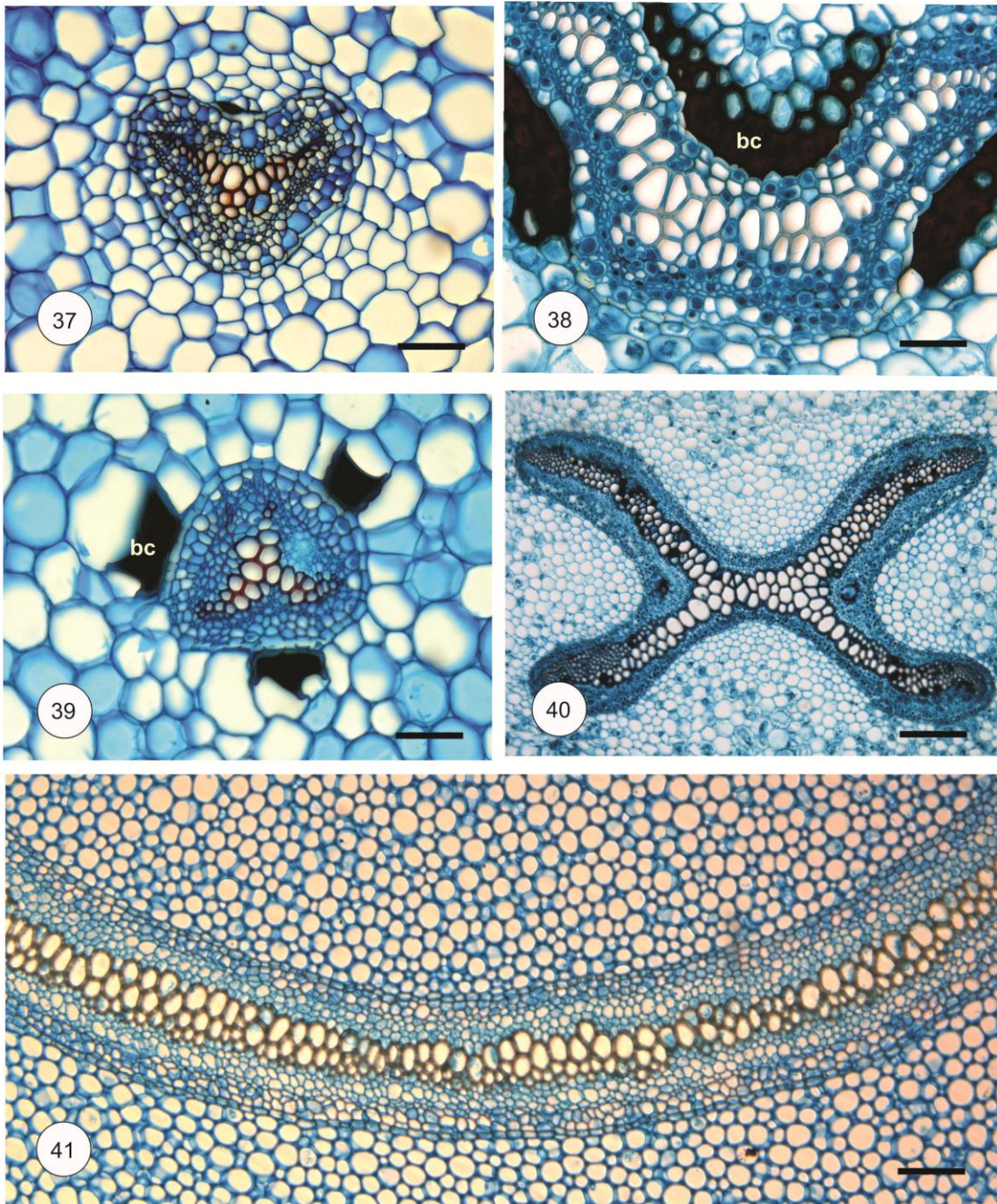
Figuras 21-26 Corte transversal do pecíolo de espécies de Aspleniaceae: 21. *Asplenium auritum*, evidenciando células com espessamentos, 22. *A. auriculatum*, 23. *A. serratum*, com células de espessamento desigual, 24. *A. auriculatum*, evidenciando linha lateral com estômato. Figuras 25 e 26. Corte longitudinal do pecíolo de *A. auriculatum* e *A.auritum* respectivamente, com células braciformes na última espécie . Barra=200 μm . Legendas: CED células de espessamento desigual; LL linha lateral..



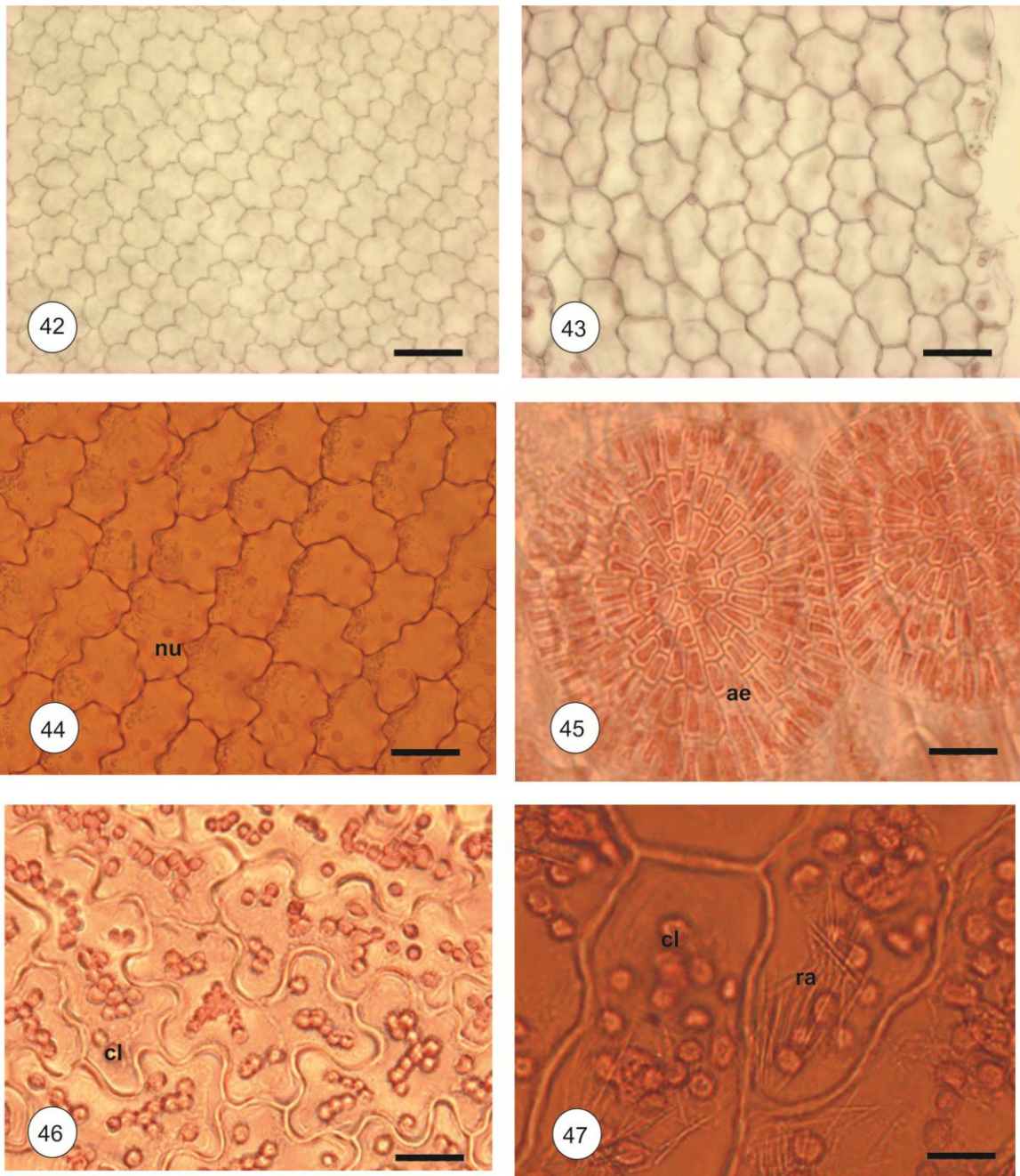
Figuras 27-30 Corte transversal do pecíolo de espécies de Aspleniaceae: 27. Grandes espaços intercelulares com células espessadas ao redor em *Asplenium auritum*, 28. Células já lignificadas em *A. auritum*, 29. Feixe vascular de *A. pseudonitidum* na região proximal do pecíolo, evidenciando o xilema em forma de cavalo-marinho, 30. Feixe vascular de *A. unisseriale* na região proximal do pecíolo. Figuras 27 Barra= 100 μm , Figura 28 Barra=200 μm e Figuras 29 e 30 Barra= 50 μm . Legendas: xi xilema; bc banda circundodérmica; pe periciclo.



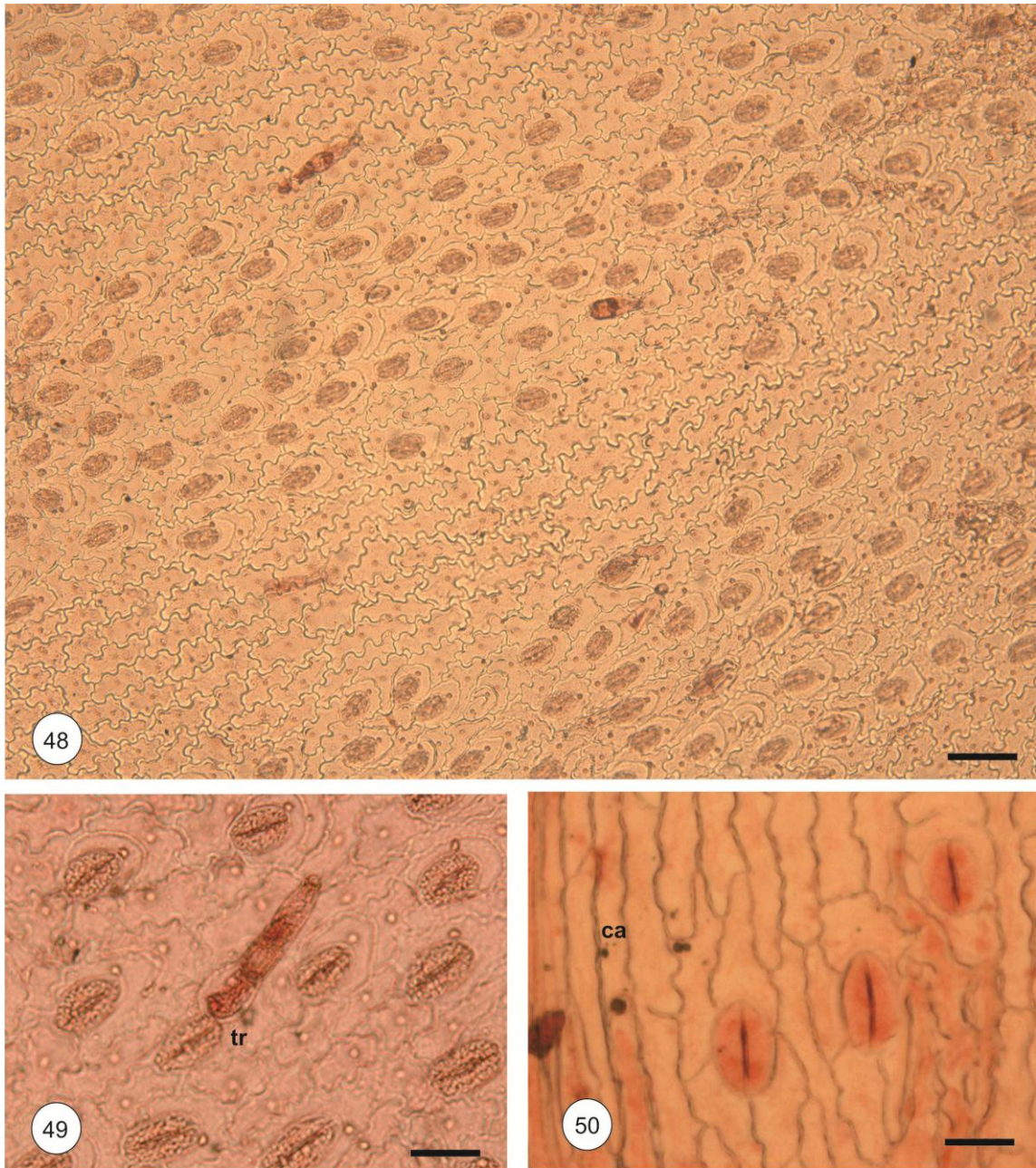
Figuras 31-36 Corte transversal na região distal do pecíolo de espécies de Aspleniaceae: 31. *Asplenium auriculatum*, evidenciando linhas laterais, 32. *A. auritum*, 33. *A. kuzeanum*, 34. *A. mourai*, 35. *A. raddianum*, 36. *Hymenasplenium triquetrum*. Barra= 100 μm (31, 33 e 34) e 200 μm (32, 35 e 36). Legendas bc banda circundodérmica; li linhas laterais; células espessadas.



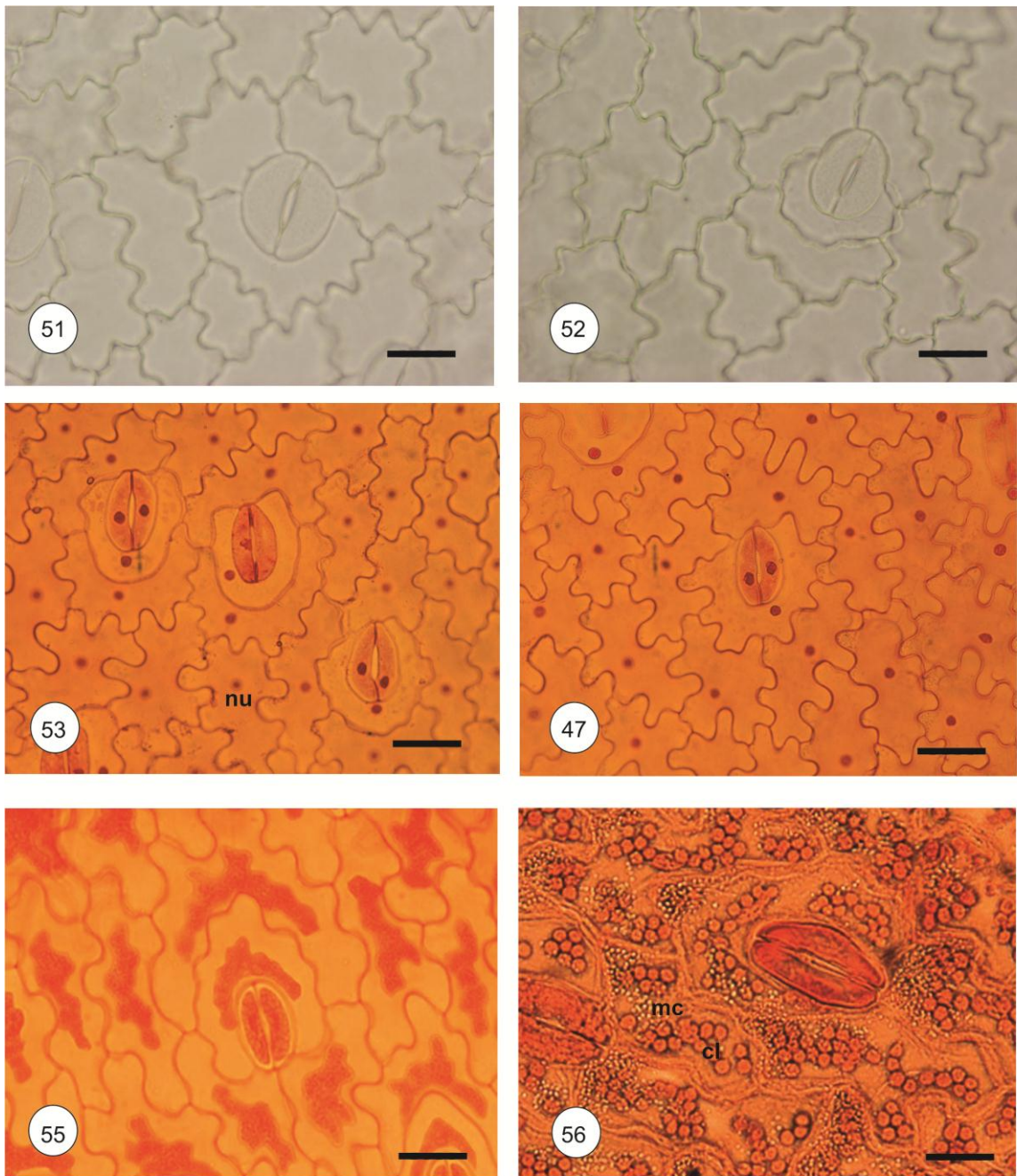
Figuras 37-41. Corte transversal do pecíolo de espécies de Aspleniaceae, evidenciando os feixes vasculares na região distal do pecíolo: 37. *Asplenium auriculatum*, evidenciando xilema em forma de V, 38. *A. auritum*, com banda circundodérmica e xilema em forma de U, 39. *A. raddianum*, evidenciando células com conteúdo e xilema em forma de X, 40. *A. serratum*, com xilema em forma de X, 41. *A. serra*, evidenciando feixe em formato de U, Barras = 100 μm (37) e 50 μm (38, 39, 40 e 41). Legenda: bc banda circundodérmica.



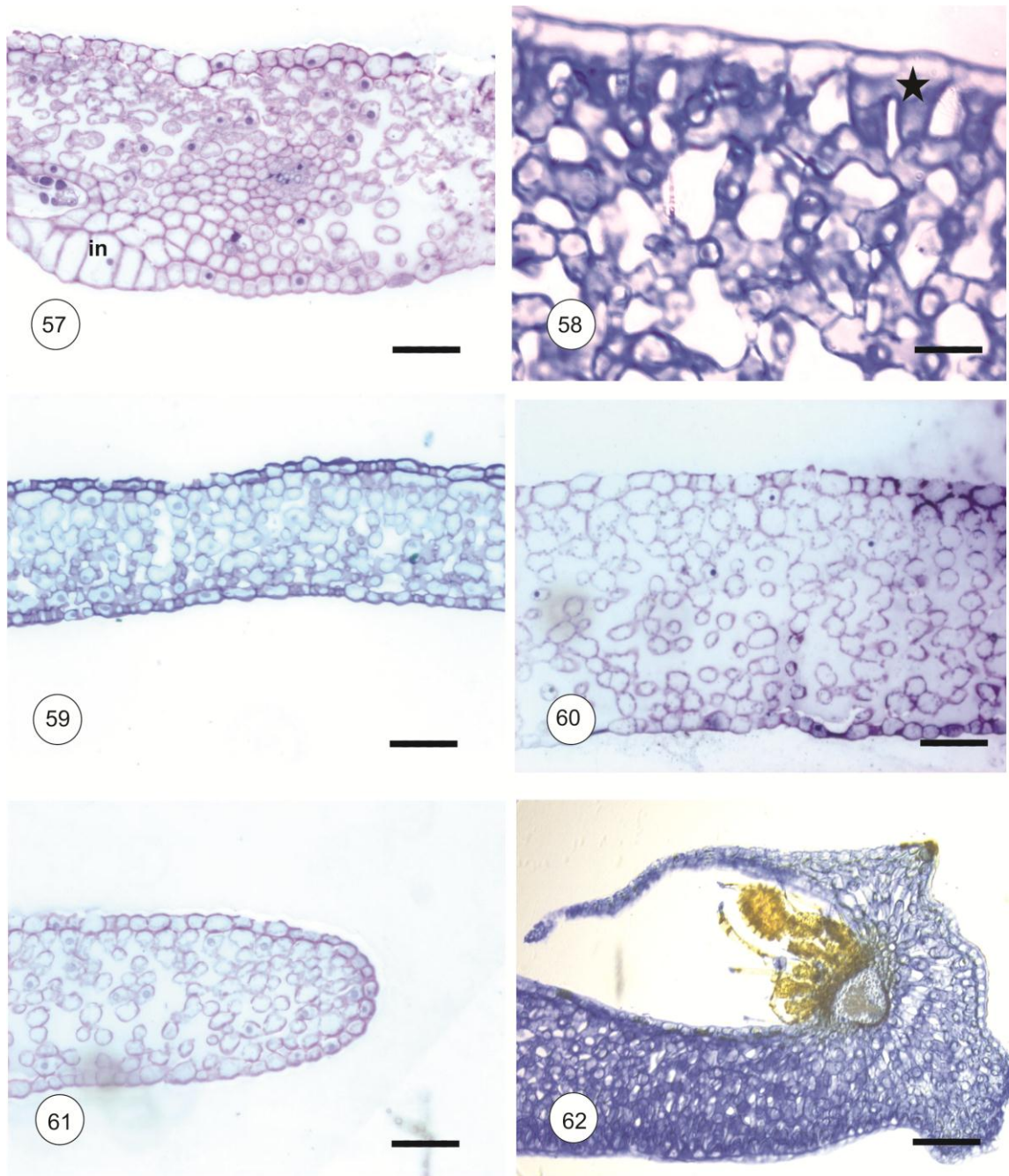
Figuras 42-47 Face adaxial da epiderme foliar em vista frontal: 42 e 43. *Asplenium raddianum* e *Hymenasplenium triquetrum* respectivamente, com células epidérmicas sem cloroplastos ou núcleo evidente, 44. *Asplenium douglasii*, com núcleo evidente e massa de cristais, 45. *A. serratum*, evidenciando a alga epífita do gênero *Coleochaete*, 46. *A. pseudonitidum*, com cloroplastos bem evidentes, e 47. *A. scandicinum*, evidenciando cloroplastos e ráfides. Figuras 42-45 Barra = 100 μ m, Figuras 46 e 47 Barra= 50 μ m. Legendas nu núcleo; ae alga epífita; cl cloroplastos; ra ráfides.



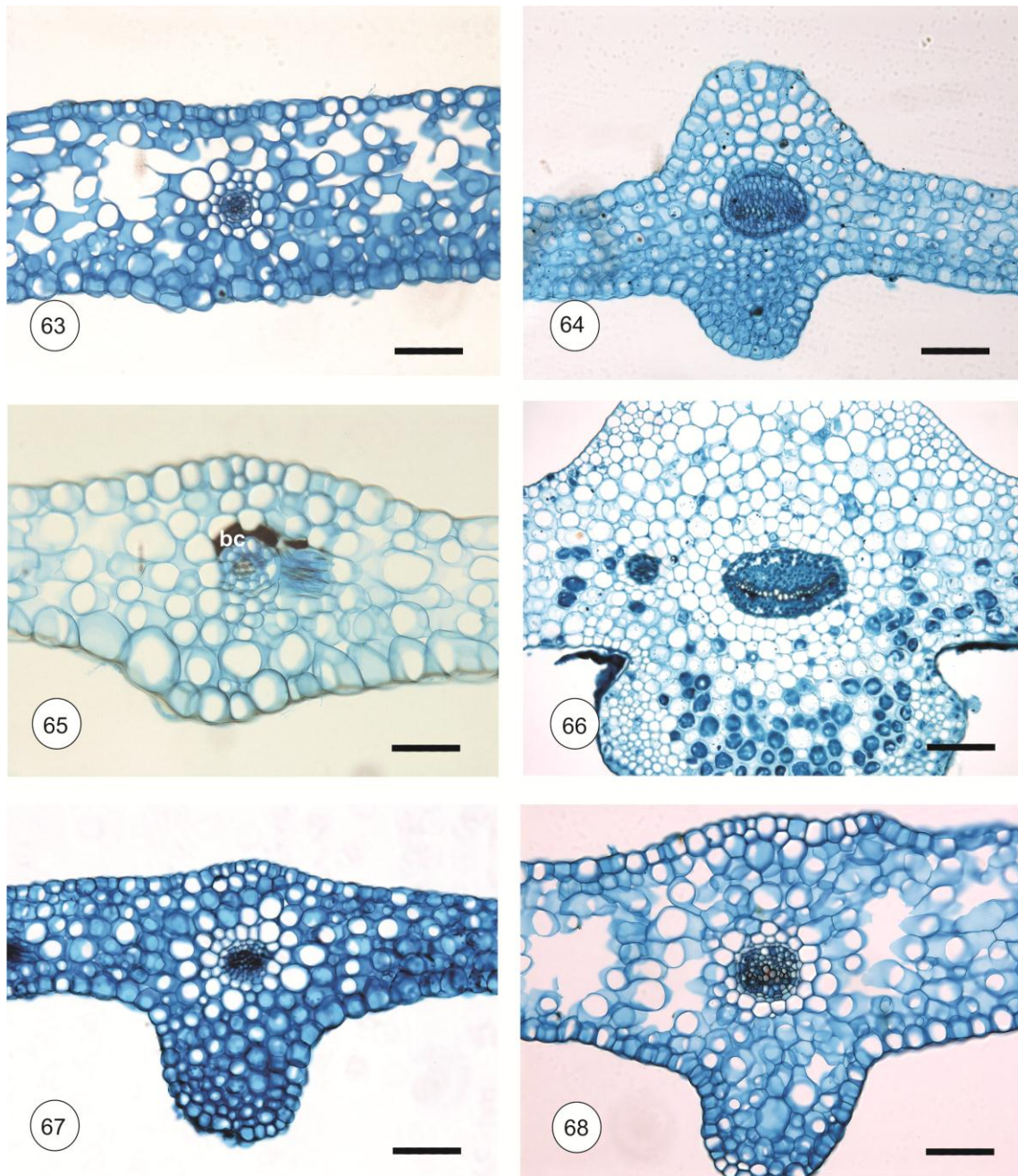
Figuras 48-50. Face abaxial da epiderme foliar em vista frontal: 48 e 49. *Asplenium monanthes*, 48. Evidenciando faixas de estômatos, 49. Evidenciando tricoma, 50. *A. auritum*, com células mais alongadas a região dos feixes. Figuras 49 e 50 Barra = 100 μ m, Figura 48 Barra= 50 μ m. Legendas: tr tricoma e ca células alongadas



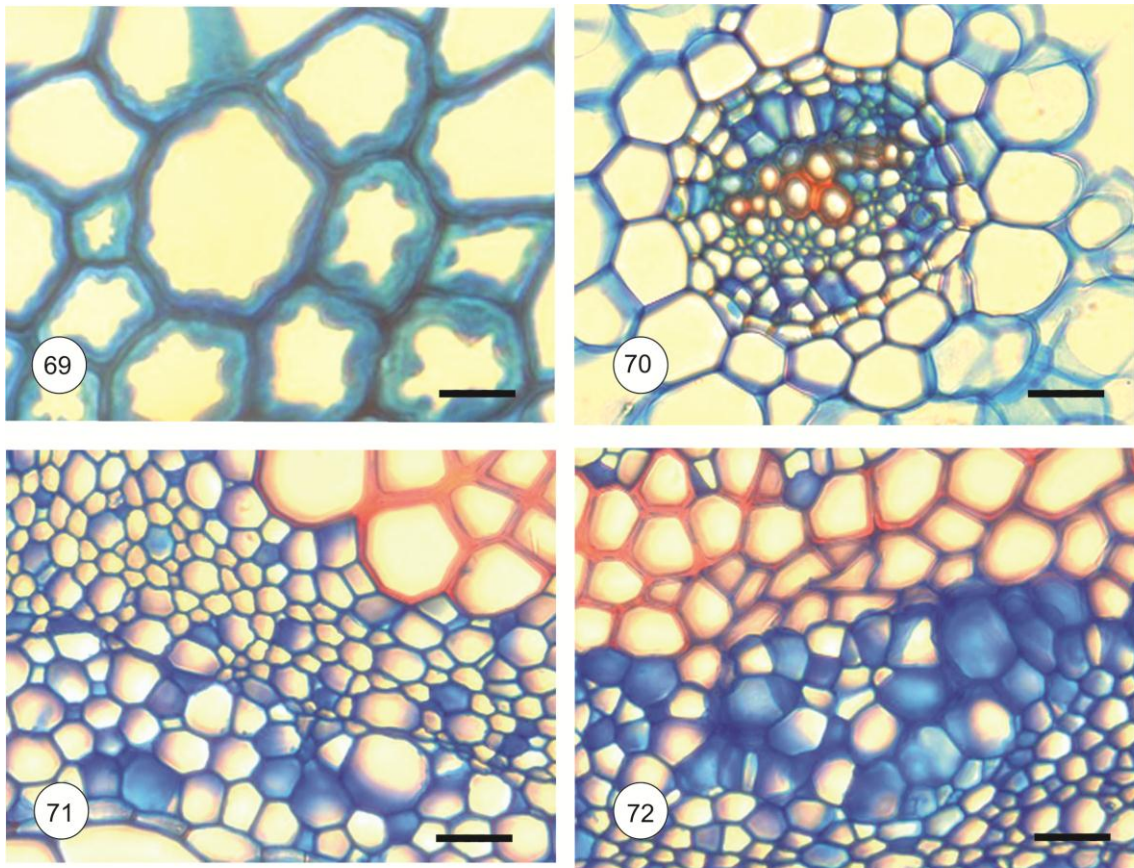
Figuras 51-56 Face abaxial da epiderme em vista frontal: 51 e 52. *Asplenium auriculatum*, evidenciando estômato anomocítico, e polocítico, respectivamente, 53 e 54. *A. douglasii*, com núcleos bem evidentes, 55. *A. harpeodes*, com estômato polocítico em evidência, 56. *A. unisseriale*, com cloroplastos e massa de cristais, Barra = 100 μ m. Legendas nu núcleo; cl cloroplastos; mc massa de cristais.



Figuras 57-62. Cortes transversais de lâminas foliares de espécies de Aspleniaceae: 57. *Asplenium auritum*, evidenciando indúcio, 58. *A. monanthes* evidenciando células da epiderme em H, 59. *A. serra* e 60. *A. auritum*, na região entre as nervuras, 61. Bordo foliar de *A. auritum* e 62. Bordo foliar de *A. monanthes* fértil Barra = 100 μ m. Legenda: in indúcio.



Figuras 63-68 Corte transversal da lâmina foliar de espécies de Aspleniaceae, evidenciando a região da nervura principal. 63. *Asplenium auriculatum*, 64. *A. kuzeanum*, 65. *A. mourai*, 66. *A. oligophyllum*, 67. *A. radiannum* , 68. *A. pseudonitidum*. Barra = 100 μ m. Legenda: bc banda circundodérmica.



Figuras 69-72 Corte transversal da lâmina foliar de espécies de Aspleniaceae. 69. Células do mesofilo de *Asplenium serratum*, 70. Feixe vascular de *A. pseudonitidum*, 71. Feixe vascular de *A. serratum*, 72. Células mucilaginosas em *A. serratum*. Barra = 100 μ m.

DISCUSSÃO

Os dados obtidos no presente trabalho confirmaram a importância da anatomia vegetal como fonte de dados para a taxonomia de Aspleniaceae. A análise do caule e da raiz trouxe informações importantes para confirmar a segregação dos dois gêneros da família (*Asplenium* e *Hymenasplenium*). Já a análise da folha revelou características que podem ser consideradas diagnósticas para algumas espécies.

A raiz peculiar de Aspleniaceae

Vários autores tem se preocupado em analisar a anatomia da raiz de Aspleniaceae (Leroux *et al.* 2011, Schneider *et al.*, 2004, Ogura 1972) que apresenta várias características bem peculiares.

Um dos aspectos marcantes da raiz foi apresentando por Leroux *et al.* (2011 b). A ausência de espaços intercelulares nos tecidos da raiz foi apontada pelo autor que considera notável tal característica já que da maior parte das espécies de angiospermas e samambaias os espaços são bem visíveis e frequentes. Nas espécies analisadas nesse trabalho também foi possível notar que os espaços são de difícil visualização, mas por ser possível observar os meatos acreditamos que se trate na verdade de espaços inconspícuos e não ausência de espaço.

Outra característica constante nas espécies de Aspleniaceae analisadas foi a presença de deposições na parede celular (CWAs). De acordo com Lucas (2002) a ausência da cutícula e a abrasão das camadas celulares externas durante o crescimento podem expor as raízes a uma variedade de patógenos em potencial. Dessa forma, elas desenvolveram muitos tipos de defesas química e físicas incluindo a deposição de material na parede celular (CWAs), fortificação da parede celular com compostos fenólicos e a produção de produtos antimicrobianos. Micróbios invasores foram observados no córtex de *Hymenasplenium triquetrum* e *A. unisseriale* apresentou hifas de fungos na epiderme. Leroux (2011 b) observou ocorrência similar estudando Aspleniaceae e concluiu que devido a ausência de algumas estruturas de micorrizas e a similaridade entre o CWAs causados por muitos ascomicetos, é provável que esses sejam os responsáveis pelos espessamentos encontrados nas células de Aspleniaceae.

Um tipo de deposição de parede já bem observado em Aspleniaceae são os espessamentos em hélice (HCWTs) nas células do córtex (Schneider 1997, Leroux *et al.* 2011). O autor analisou 43 espécies da família e concluiu que a ocorrência dos espessamentos não tinha relação com o habitat das plantas. A mesma observação foi feita por Hernandez *et al.* (2013) que estudando Polypodiaceae verificou que os espessamentos são basicamente formados por celulose, sem deposição de lignina. É consenso entre os pesquisadores que a ocorrência de tais espessamentos tem relação com a proteção mecânica das pequenas raízes que ocorrem em algumas famílias de samambaias. Essas células cheias de espessamentos podem atuar como um esqueleto prevenindo o colapso da raiz durante os períodos de seca em plantas terrícolas, rupícolas e epífitas.

Outro tipo de espessamento bem peculiar ocorre nos esclereídeos que circundam a endoderme. Essas células são típicas de raízes de Aspleniaceae como demonstrado por Schneider (1996). Algumas espécies mostram somente uma camada de esclereídes enquanto outras apresentam duas camadas. Em *A. serra* as duas camadas são diferentes, a mais interna contém células maiores. *H. triquetrum*, entretanto, é diferente de todas as demais espécies já descritas, pois apresenta duas camadas com células de espessamento simples, o que nunca tinha sido observado em nenhuma espécie de Aspleniaceae. Essa diferença tão marcante observada em *H. triquetrum* suporta a posição de Hayata (1929) que descreveu o gênero *Hymenasplenium* baseando-se na disposição do estelo no rizoma das espécies que analisou. Em 2004 Schneider também apontou em sua filogenia a posição do gênero como clado irmão de *Asplenium*. É importante ressaltar que a presença de células com paredes periclinais internas espessas foi apontada por Schneider (2004) como uma sinapomorfia da família Aspleniaceae, no entanto, como demonstrado nesse trabalho tal característica não é observada em *Hymenasplenium*, somente em *Asplenium*. Dessa forma, a presença de esclereídeos com espessamento na parede periclinal interna é sim uma sinapomorfia, mas do gênero *Asplenium* e não da família Aspleniaceae. Essa informação torna mais robusta a segregação do gênero *Hymenasplenium*.

O caule de Aspleniaceae.

No caule das espécies analisadas é constante a presença de amiloplastos. Essa característica é bem comum em samambaias, principalmente nas que apresentam rizomas. Os compostos fenólicos também foram evidenciados no córtex ou na epiderme de algumas espécies o que confirma a utilidade taxonômica dessas substâncias. Há muito já se sabe da importância desses compostos para a taxonomia de samambaias (Ogura 1972),

O estelo de Aspleniaceae já foi amplamente explorado por Mitsuta *et al.* (1980), que no entanto não estudou as espécies analisadas nesse trabalho, com exceção de *A. serra*. De acordo com Ogura (1972) existem três tipos de estelo em Aspleniaceae: o dictiostelo típico, o dictiostelo perfurado e o dorsiventral, sendo que o último foi utilizado por Hayata (1929) para descrever o gênero *Hymenasplenium*. Na única espécie do gênero aqui analisada (*H. triquetrum*) o estelo é de fato dorsiventral, o que mais uma vez suporta o gênero *Hymenasplenium* proposto por Hayata.

A folha de Aspleniaceae: uma fonte de dados para a taxonomia.

Pecíolo

É comum em samambaias a ocorrência de células epidérmicas esclerificadas ou espessadas no pecíolo (Ogura 1972, Lin & DeVol 1977). No entanto, as espécies aqui analisadas apresentam células de parede delgada, com exceção de *A. unisseriale*.

De acordo com Lin & DeVol (1977) o esclerênquima é comumente encontrado no córtex do pecíolo de samambaias e pode se distribuir de três formas: 1- no córtex externo, onde pode ocorrer logo abaixo da epiderme ou separado dela por algumas camadas de células parenquimáticas; 2- Arranjados em pequenos grupos no meio do córtex e 3- Circundando o feixe vascular como uma bainha. Das espécies analisadas no presente trabalho, somente *A. auriculatum* e *A. radianum* não apresentam esclerênquima no córtex, e em todas as demais o tecido está presente confirmando o observado pelos autores.

Na maior parte das espécies é possível observar esclerênquima no córtex externo. Em *A. unisseriale* e *A. mourai* o tecido é observado logo abaixo da epiderme. Mas na maioria (*A. auritum*, *A. kuzeanum*, *A. oligophyllum*, *A. serra*, *A. serratum* e *H.triquetrum*) algumas camadas de células parenquimáticas ocorrem entre a epiderme e o esclerênquima.

Apesar das consideráveis similaridades anatômicas entre as samambaias, algumas famílias são caracterizadas pela presença de uma bainha circundodérmica (BC), uma segunda camada mais interna do tecido fundamental adjacente a endoderme, e composta de paredes espessas e células ricas em tanino (Hernandez- Hernandez *et al.* 2012). Tal camada é também conhecida como bainha de proteção porque os taninos protegem o protoplasma da dessecação e destruição por microorganismos (Esaú 1976). A maior parte das espécies analisadas apresentam CB. Algumas como *A. auritum* apresentam células com paredes espessadas e outras, como *A. mourai*, *A. raddianum* e *A. serratum* apresentam células ricas em taninos fortemente marcadas de castanho. De acordo com Hernandez-Hernandez *et al.* (2012) a função da banda circundodérmica ainda não é clara. Os autores propuseram duas possibilidades: 1- uma função de proteção similar a da endoderme e 2- uma função biomecânica. As células que compõem a BC não contém suberina ou lignina, e dessa forma não servem como barreira para água e nutrientes. Entretanto, a presença de taninos, pode servir como uma barreira adicional contra patógenos.

Os feixes vasculares das samambaias são de grande importância para a taxonomia do grupo como já demonstrado por vários autores (Ogura 1972 Graçano 1992). Lin & De Vol (1977a e 1977b) conseguiram até mesmo confeccionar uma chave dicotômica para as espécies ocorrentes em Taiwan baseando-se somente em características dos feixes. De acordo com os autores o número, forma e arranjo dos feixes e a configuração do xilema são diagnósticos para algumas famílias e espécies. No presente trabalho a configuração do xilema na porção distal do pecíolo é diagnóstica para *A. auriculatum* (xilema em forma de V) e *A. auritum* (xilema em forma de U). Já na porção proximal, os meristelos apresentam xilema formando um pequeno arco com gancho nas terminações em *A. pseudonitidum* e *A. oligophyllum*. Esse dado contraria o observado por Ogura (1972) e Lin & De Vol (1977b) que descreveram o xilema dos meristelos como um

arco sem a presença de ganchos. Ainda sobre a região proximal os autores relataram a ocorrência de dois meristelos ou mais raramente um meristelo em espécies de pequeno porte. Nas espécies analisadas a maioria apresenta, de fato, dois meristelos e poucas espécies como *A. auritum* apresentam somente um meristelo.

Lâmina

Ao estudar a anatomia foliar de seis espécies de *Asplenium*, Ferrari (2009) relatou não ter observado grandes diferenças nas lâminas foliares e concluiu que tal homogeneidade pudesse ser creditada ao fato das amostras pertencerem ao mesmo gênero, aliada as estratégias das espécies ao ambiente de pouca luz. No entanto, no presente trabalho, observou-se justamente o oposto já que variações significativas foram observadas entre as espécies (ex: presença de massa de cristais, presença de ráfides, presença de cloroplastos, tricomas, núcleo evidente e desenho das paredes anticlinais).

Cristais de sílica (fitólitos) nas células da epiderme já foram registrados para várias famílias de samambaias e tem importância taxonômica reconhecida (Sundui 2009). Já cristais de oxalato de cálcio são de rara ocorrência no grupo e foram observados em poucas espécies como *A. nidus*, que contém 1 ou dois pequenos cristais romboédricos em cada célula da epiderme (Ogura 1972). No presente trabalho somente três espécies apresentam tal característica. A ocorrência de ráfides nas células comuns da epiderme é diagnóstica para *A. scandicinum* e a de pequenos cristais para *A. serratum* e *A. unisseriale*.

A presença de cloroplastos nas células comuns da epiderme é uma característica marcante da anatomia das samambaias (Ogura 1972). No presente trabalho, apenas três espécies não apresentam. É importante destacar que algumas espécies como *A. douglasii* e *A. inaequilaterale* apresentam uma quantidade notavelmente grande de cloroplastos, diferentemente do relatado por outros pesquisadores que sempre observaram uma pequena quantidade.

As células mucilaginosas encontradas em *A. serratum* já foram observadas também em *Diplazium* (Athyriaceae). Nas duas famílias as células ou cavidades mucilaginosas se localizam no parênquima associado ao xilema. A utilização desse

dado para filogenia, no entanto, deve ser criteriosa porque de acordo com Fahn (1988) a evolução dos tecidos secretores de mucilagem é polifilética.

Foram observados estômatos polocíticos, copolocíticos e anomocíticos. O primeiro tipo é o único presente em todas as espécies, o que corrobora as observações de Sen & De (1992) que o considerou a forma básica da qual praticamente todos os outros tipos de estômatos derivaram-se ontogeneticamente através de alguma elaboração ou modificação. Ainda de acordo com os autores as divisões celulares adicionais, reorientação das células subsidiárias e outras células, taxa de crescimento desarmonioso durante a expansão da célula subsidiária e da gema, e uma reorientação da metáfase no desenvolvimento do estômato polocítico resultaram nessas formas mais derivadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APOSTOLAKOS, P. & GALATIS, B. 1999. Microtubule and actin filament organization during stomatal morphogenesis in the fern *Asplenium nidus*. II. Guard cells. *New Phytol.* 141: 209-223.
- BUKATSH A. 1972. Bemerkungen zur Doppel farbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61:255
- ESAU, K. 1976. Anatomia das plantas com sementes. Edgard Blücher, São Paulo,
- FAHN, A. 1988. Secretory tissues and factors influencing their development. *Phyton.* 28:13-26.
- FERRARI, F. B. 2009. Anatomia de espécies de Aspleniaceae Newman ocorrentes no Brasil: contribuições à taxonomia. Dissertação de mestrado, UFV.
- FRANKLIN, G.L. 1945. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resins composites, and a new macerating method for wood. *Nature*, 155: 51.
- HAYATA, B., 1927. On the systematic importance of the stelar system in the Filicales I. *Bot. Mag., Tokyo*, 41: 697-174
- HERNANDES- HERNANDEZ, V., TERRAZAS, T., MEHLTRETER K. & ANGELES G. 2012. Studies of petiolar anatomy in ferns: structural diversity and systematic significance of the circuendodermal band. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169, 596-610.
- IWATSUKI, K. & KATO, M. 1976. Evolution of fern leaves through fusion. *Phytomorp.* 26: 234-239.
- JENSEN 1962. *Botanical histochemistry: principles and practice*. W. H. Freeman, San Francisco
- JOHANSEN, D. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York-London, 52 p.
- KRAMER, K. U., & R. L. L. VIANE. 1990. Aspleniaceae. In K. U. Kramer and P. S. Green [eds.], *Pteridophytes and gymnosperms*, 52–56. Springer- Verlag, Berlin, Germany
- KRAUS J. E.; ARDUIN, M. 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro: EDUR. 25p.
- LANGERON, M. 1949. *Précis de microscopie*. Masson, Paris.

- LEROUX, A. BAGNIEWSKA-ZADWORNA, S. K. RAMBE, J. P. KNOX, S. E. MARCUS, E. BELLFROID, D. STUBBE. CHABBERT, A. HHABRANT, M. CLAEYS & R. L. L. VIANE, 2011. Non-lignified helical cell wall thickenings in root cortical cells of Aspleniaceae (Polypodiales): histology and taxonomical significance. *Annals of Botany* 107: 195–207, 2011
- LEROUX, A. BAGNIEWSKA-ZADWORNA, J. P. KNOX, M. CLAEYS AND R. L. L. VIANE, 2011b. Ultrastructure and cell appositions in the roots of *Asplenium* (Polypodiales). *Micron* 42(8): 863-70.
- LIN, B. L. & DE VOL, C. E. 1977a. The use of stipe characters in ferns taxonomy. I. *Taiwania* 22: 91-99.
- LIN, B. L. & DE VOL, C. E. 1977b. The use of stipe characters in ferns taxonomy. I. *Taiwania* 23: 88-95.
- LUCAS, J. A.. 2002. *Plant pathology and plant interactions*. Blackwell Publishing. Oxford UK.
- MITSUTA, S, KATO, M. & IWATSUKI, K. 1980. Stellar structure of Aspleniaceae. *Bot. Mag. Tokyo* 93:275-289.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER N. & MCCULLY, M. E. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.
- OGURA, Y. 1972. *Comparative anatomy of vegetative organs of the pteridophytes*. Gebruder Borntraeger, Berlin.
- ROTHFELS, C. J.; SUNDUE, M. A.; KUO, L. Y.; LAISSON, A.; KATO, M.; SCHUTTPELZ, E. & PRYER, K. M. 2012. A revised family level classification for Eupolypods II ferns (Polypodiidae: Polypodiales). *Taxon* 61: 515-533.
- SCHNEIDER, H. (1996): *The root anatomy of ferns: a comparative study. Pteridology in perspective*. -Royal Botanical Garden, Kew, pp. 271-283.
- SCHNEIDER, H.; SCHUETTPELZ, E; PRYER, K. M.; CRANFILL, R.; MAGALLON, S. & LUPIA, R. 2004a. Ferns diversified in the shadow of angiosperms. *Nature* 428: 553-557.
- SCHNEIDER, H., RUSSEL, S. J., COX, C. J., BAKKER, F., HENDERSON, S., RUMSEY, F., BARRET, J., GIBY, M. E VOGEL, J. C. 2004 b. Chloroplast phylogeny Asplenoid ferns based on rbcL and trnL-F spacer sequences (Polypodiidae, Aspleniaceae) and its implications for Biogeography. *Scientific Botany* 29 (2) 260-274.

- SEN, U. & DE, B. 1992. Structure and ontogeny of stomata in ferns. *Blumea* 37: 239-261.
- SMITH, A. R.; PRYER, K. M.; SCHUETTPELZ, E.; KORALL, P.; SCHNEIDER, M. & WOLF, P. G. 2006. A classification of extant ferns. *Taxon* 55: 705-731.
- SUNDUE, M. & ROTHFELS, C. J. 2014. Stasis and convergence characterize morphological evolution in Eupolypod II ferns. *Annals of Botany* 113 (1): 35-54.
- SUNDUE, M. 2009. Silica bodies and their systematic implications in Pteridaceae (Pteridophyta). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2009, 161, 422-435
- SYLVESTRE, L. S. 2001. Revisão taxonômica das espécies da família Aspleniaceae A. B. Frank ocorrentes no Brasil. São Paulo: USP. 571p. Tese de doutorado.
- TRYON, R. M. & TRYON, A. F. 1982. Ferns and allied plants with special reference to Tropical America. Springer-Verlag.
- UMIKALSON, Y. 1992. Anatomical studies of the Malasyan Aspleniaceae and Athyriaceae. *Bot. J. of the Linn. Soc.* 110: 111-119.

Capítulo 2

Elementos traqueais de espécies de Aspleniaceae Newman ocorrentes no Brasil

M.L.R. WETZEL

Museu Nacional, São Cristóvão, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

L. DA S. SYLVESTRE

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Bloco A, Brasil

R. C. VIEIRA

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Bloco A, Brasil

Elementos traqueais de espécies de Aspleniaceae Newman ocorrentes no Brasil.

RESUMO

Os elementos traqueais de samambaias são bem diversos e pode-se encontrar traqueídes, elementos de vaso e células condutoras com características intermediárias entre os dois tipos. Apenas uma espécie de Aspleniaceae já teve suas células condutoras analisadas no MEV e por isso a família foi praticamente inexplorada. No presente trabalho os elementos traqueais do caule de nove espécies de Aspleniaceae foram investigados no microscópio eletrônico de varredura. A maior parte das espécies apresenta traqueídes agrupados com várias faces repletas de pontoações escalariformes. No entanto, em duas espécies, *Hymenasplenium triquetrum* e *Asplenium monanthes*, a membrana de pontoação sofreu intensa lise, o que pode ter ocorrido por influência do ambiente.

Palavras-chave: samambaias, membrana de pontoação, xilema.

ABSTRACT

Tracheal elements of ferns are very diverse and can be found tracheids, vessel elements and conducting cells with intermediate characteristics between the two types. Only one species of Aspleniaceae already had his conducting cells analyzed in SEM and so the family was virtually unexplored. In this study the tracheal elements of the stem of nine species of Aspleniaceae were investigated in the scanning electron microscope. Most species have grouped tracheids with many faces full of pits scalariform. However, in the two species, *Hymenasplenium triquetrum* e *Asplenium monanthes*, pits suffered severe membrane lysis, which may be due to environmental influence.

Key-words; tracheal elements, ferns, pit membrane.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de traqueídes em samambaias sempre foi bem documentada (Ogura 1972). No entanto, poucos pesquisadores apontaram a ocorrência de elementos de vaso no grupo. A primeira observação foi feita em *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Russow 1873) e, posteriormente White (1962) apontou a possível ocorrência de vasos em *Woodsia*, *Astrolepsis*, *Phlebodium* e *Polystichum*. Mas foi só com o advento do microscópio eletrônico de varredura que a ocorrência de vasos em samambaias pode ser confirmada, pois foi possível demonstrar com confiabilidade a ausência de membrana de pontoação na parede terminal das células caracterizando as placas de perfuração e conseqüentemente os elementos de vaso.

Carlquist e Schneider utilizaram intensamente o MEV e publicaram uma série de artigos durante as duas últimas décadas investigando os elementos traqueais em diferentes famílias e gêneros de samambaias: *Woodsia* (1998), Osmudaceae e Schizaeaceae (1998b), *Microgramma* (1998c), Dicranopteris (1998d) Marattiaceae (1999), *Ophioglossum* (1999b), *Nephrolepsis* (1999c), Aspleniaceae, Elaphoglossaceae e Vittariaceae (1999d), *Ceratopteris* (2000a), Blechnaceae, Cyatheaceae e Dicksoniaceae (2000b), Pteridaceae (2000c), Hymenophyllaceae (2000d). Após esse longo estudo os autores concluíram que existe uma grande diversidade de elementos traqueais em samambaias e elementos de vaso são muito mais comuns do que se imaginava inicialmente.

Em samambaias é possível encontrar desde traqueídes até elementos de vaso muito parecidos com os observados em angiospermas. No entanto, existem elementos que apresentam características intermediárias que dificultam a classificação do elemento traqueal. Além disso, as células condutoras do xilema de samambaias podem apresentar

- 1- Os vasos de samambaias podem ser parecidos com os de angiospermas e apresentarem duas placas de perfuração nítidas e distintas das paredes laterais (*Woodsia* e *Pteridium*) ou apresentarem placas de perfuração muito semelhantes à paredes laterais (onde são observadas membranas de pontoação),
- 2- Muitas samambaias apresentam paredes terminais múltiplas com várias faces que se convertem em placas de perfuração pela lise das

membranas; 3- Algumas apresentam pontoações dismórficas; 4- As membranas de pontoação são bem diversificadas e podem ser inteiras ou apresentar desde poros muito pequenos até maiores que ocupam quase todo o espaço da pontoação; 5- Alguns vasos podem apresentar placas de perfuração incipientes, que apresentam remanescentes de membrana de pontoação (Carlquist & Schneider 2001).

O presente trabalho tem como objetivos descrever os elementos traqueais de espécies de *Aspleniaceae* ocorrentes no Brasil. Além disso, relacionar as características observadas com o hábitat e gerar dados para o entendimento da evolução dessas células no grupo .

MATERIAIS E MÉTODOS

Os caules aéreos e rizomas coletados para o estudo foram cortados na região nodal e internodal e preservados em álcool 70%. Treze espécies de diferentes habitats e ocorrentes em diferentes ambientes foram selecionadas (Tabela 1). A maior parte das espécies ocorre em ambiente úmido e a amostra coletada de *Hymenasplenium triquetrum* (Figura 1) ocorre ao lado de uma queda de água (Figura 2). Já a amostra de *Asplenium douglasii* ocorre em um afloramento rochoso.

Carlquist e Schneider (2007) utilizaram três métodos distintos para processar suas amostras: secagem de secções com ponto crítico, maceração e secções feitas à mão com secagem em placa aquecedora. O último método, de acordo com os autores, apresentou melhores resultados com uma quantidade bem inferior de artefato e por isso foi o método escolhido para esse estudo.

Secções longitudinais com cerca de 1mm de espessura foram feitas à mão com o auxílio de lâminas de barbear. Essas secções passaram por três mudanças de água destilada para remover substâncias solúveis em água, grãos de amido e contaminantes de superfície. As secções foram então colocadas entre pares de lâminas limpas com uma leve pressão feita por cliques e posteriormente secas em uma placa aquecedora a 60° C (Carlquist & Schneider 2007). Em seguida, os fragmentos foram afixados com fita adesiva de carbono em suportes próprios e cobertos com uma fina camada de ouro de 20 nm (Bal-Tec Sputer Coater SCD 050). As amostras foram então observadas e eletromicrografadas ao microscópio eletrônico de varredura JEOL 5310 e JEOL JSM 639 OLV a uma voltagem aceleradora de 25KV.

Tabela 1. Espécies de Aspeniaceae Newman., com respectivos números de registro, localização, habitat e ambiente.

Espécies	Número de coleta	Localização	Habitat	Ambiente
<i>A. auritum</i> Sw.	Damasceno 425 (RB)	Itatiaia, RJ	rupícola	Ambiente úmido
<i>A. douglassi</i> Hook. & Grev.	Bovini 3689 (RB)	Ilhas Cagarras, RJ	terrícola	Área propensa a restrição hídrica
<i>A. harpeodes</i> Kunze	Damasceno 352 (RB)	Itatiaia, RJ	saxícola	Ambiente úmido
<i>A. inaequilaterale</i> Willd	Sylvestre 2209 (RB)	Cachoeiras de Macacu, RJ	rupícola	Ambiente úmido
<i>A. monanthes</i> L.	Sylvestre 2189 (RB)	Itamonte, MG	rupícola	Ambiente bem úmido
<i>A. mourai</i> Hieron.	Damasceno 402 (RB)	Itatiaia, RJ	saxícola	Ambiente úmido
<i>A. pseudonitidum</i> Hook.	Sylvestre 2175 (RB)	Teresópolis, RJ	terrícola	Ambiente úmido
<i>A. raddianum</i> Gaudich.	Sylvestre 2179 (RB)	Itatiaia, RJ	epífita	Ambiente úmido
<i>A. regulare</i> Sw.	(RFA)	Guapimirim, RJ	Rupícola	Ambiente úmido
<i>A. scandicinum</i> Kaulf.	Damasceno 392 (RB)	Itatiaia, RJ	epífita	Ambiente úmido
<i>A. serratum</i> L.	(RFA)	Nova Iguaçu, RJ	rupícola	Ambiente úmido
<i>A. unisseriale</i> Raddi	Sylvestre 21 74 (RB)	Teresópolis, RJ	terrícola	Ambiente úmido
<i>Hymenasplenium triquetrum</i> (N. Murak. et R. C. Moran) L. Regalado & Prada	Sylvestre 2208 (RB)	Cachoeiras de Macacu, RJ	Rupícola	Bem exposta à umidade, ocorre na beirada da cachoeira



Figura 1. Amostra coletada de *Hymenasplenium triquetrum* evidenciando o habitat rupícola e extremamente úmido. Figura 2. Local de coleta: Cachoeira Véu da noiva em Itatiaia, RJ. O espécime foi coletado às margens da cachoeira.

RESULTADOS

De forma geral, as espécies de *Asplenium* analisadas contém células condutoras alongadas com cerca de três paredes terminais oblíquas, o número de paredes laterais, no entanto, pode variar de 3 a 5. São observados espessamentos escalariformes em todas as faces da célula. A presença de membrana de pontoação, no entanto, variam bastante entre as espécies.

Na maior parte das espécies os elementos traqueais observados no metaxilema do rizoma apresentam membrana de pontoação inteira, em todas as faces da célula. Em *A. auritum* (Figura 1), *A. harpeodes* (Figuras 2 e 3), *A. inaequilaterale* (Figuras 4 e 5), *A. mourai* (Figuras 6 e 7) e *A. douglasii* (Figuras 8 e 9) foi possível visualizar membrana de pontoação nas paredes terminais das células., caracterizando os traqueídes.

Em *A. pseudonitidum* (Figuras 10 e 11) e *A. regulare* (Figuras 12 e 13) a membrana encontrava-se mais porosa em algumas partes. No entanto, isso provavelmente ocorreu devido ao método já que tais poros são observados em poucas ocasiões e na maior parte da amostra a membrana não apresenta porosidade.

Asplenium scandicinium (Figura14) apresenta elementos traqueais do rizoma com paredes laterais contendo membrana de pontoação porosa com poros de tamanhos variados. Em alguns momentos existe muito pouco da membrana e as perfurações incipientes ficam evidentes. Em *A. radiannum* (Figuras 15 e 16) e *A. unisseriale* (Figuras 17 e 18) foram observadas pontoações com e sem membrana se alternando na mesma face da parede.

Asplenium monanthes (Figuras 19 e 20) apresenta elementos traqueais muito semelhantes aos observados em *Hymenasplenium triquetrum* (Figuras 21, 22 e 23) com porção terminal de três faces oblíquas, nos quais as membranas se não estão totalmente ausentes, parecem ter sofrido intenso processo de lise. Nas paredes laterais das células das espécies também não foram observadas as membranas de pontoação caracterizando as placas de perfuração laterais e conseqüentemente elementos de vaso.

Em *Asplenium serratum* (Figuras 24, 25 e 26) as paredes terminais das células condutoras também carecem de membrana e em raras ocasiões pode ser observado um resto da membrana nas paredes laterais. Nessa espécie o número de faces laterais da parede parece ser maior e a própria célula tem um diâmetro maior.

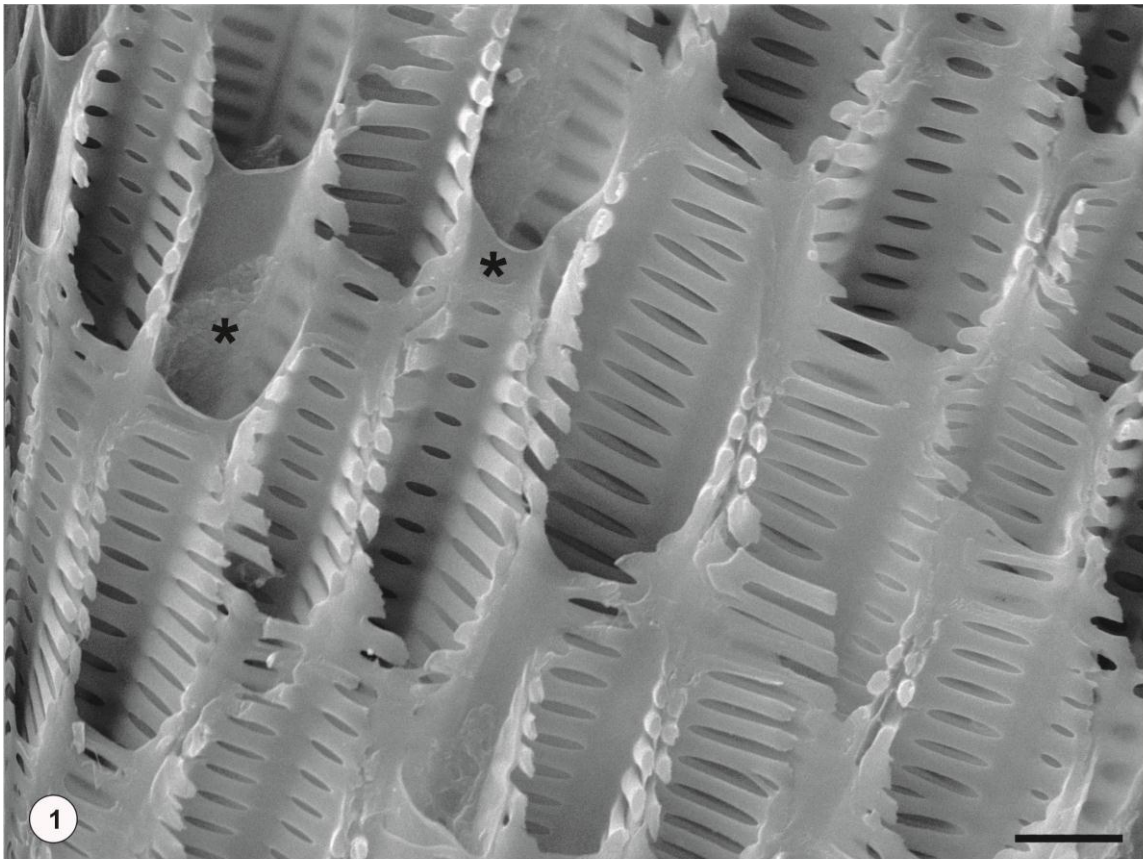
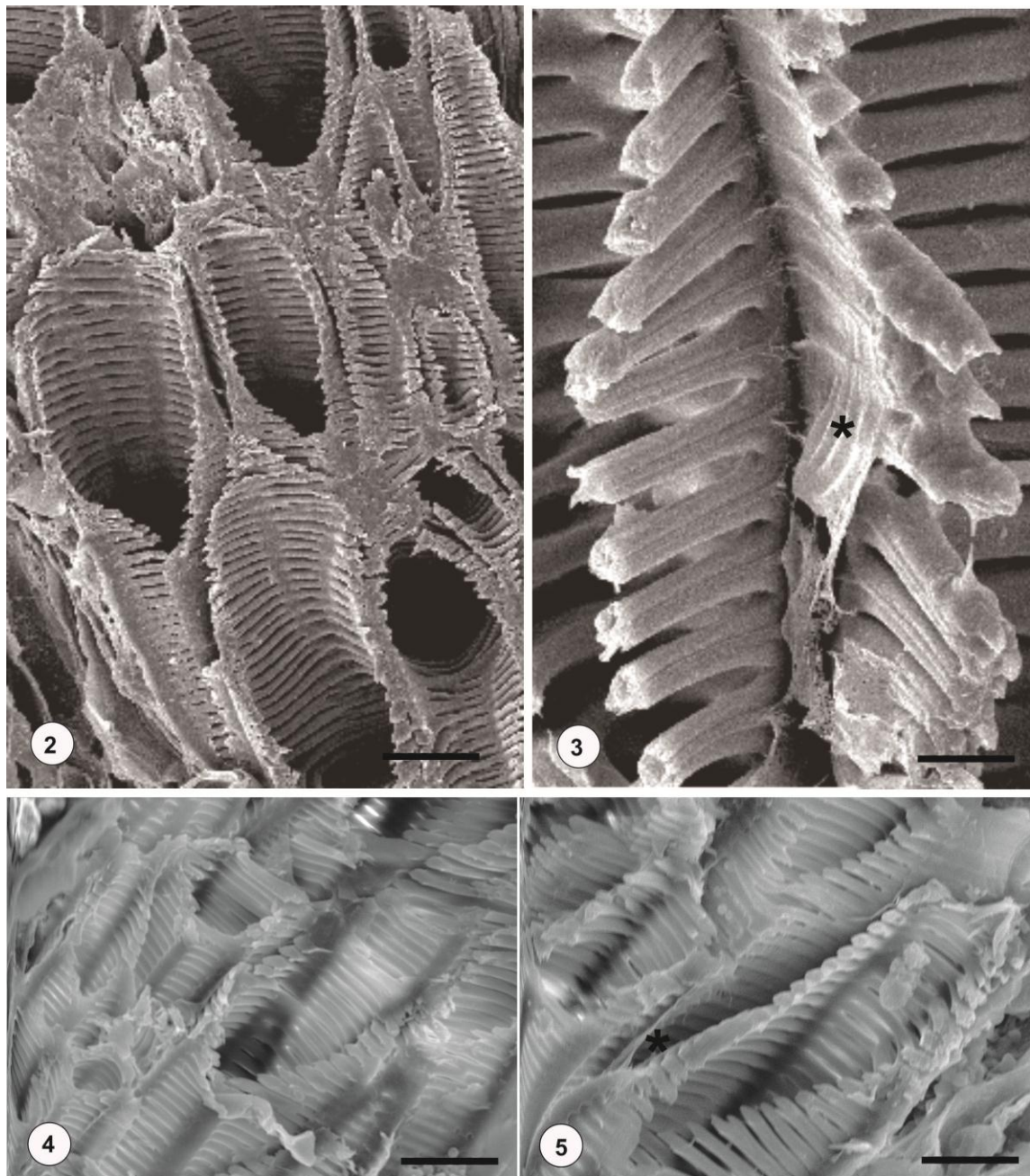
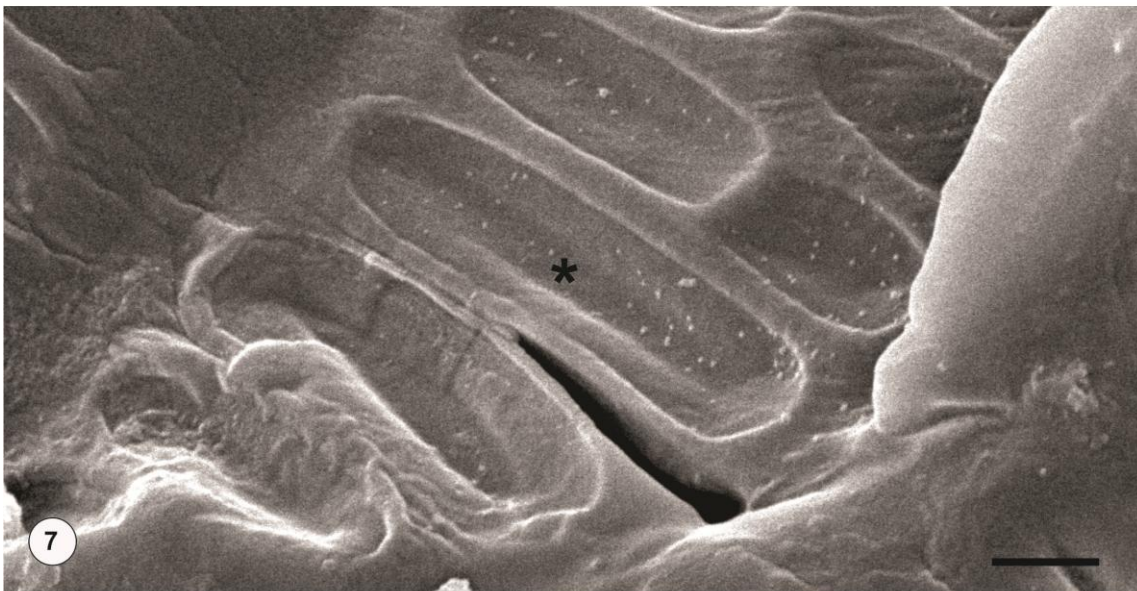
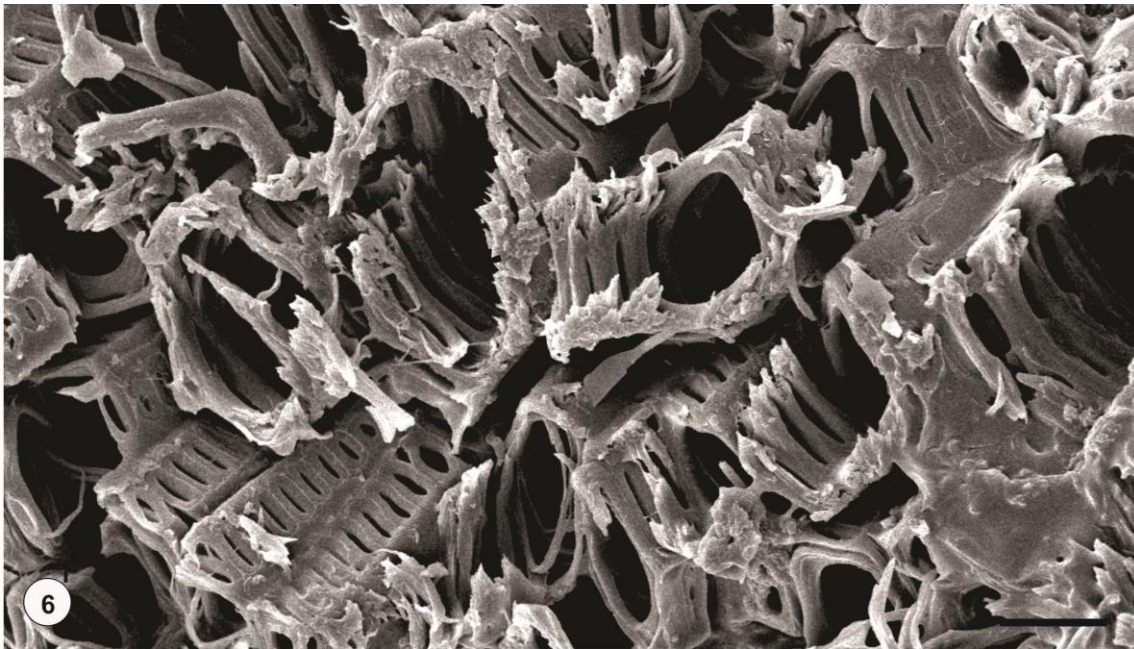


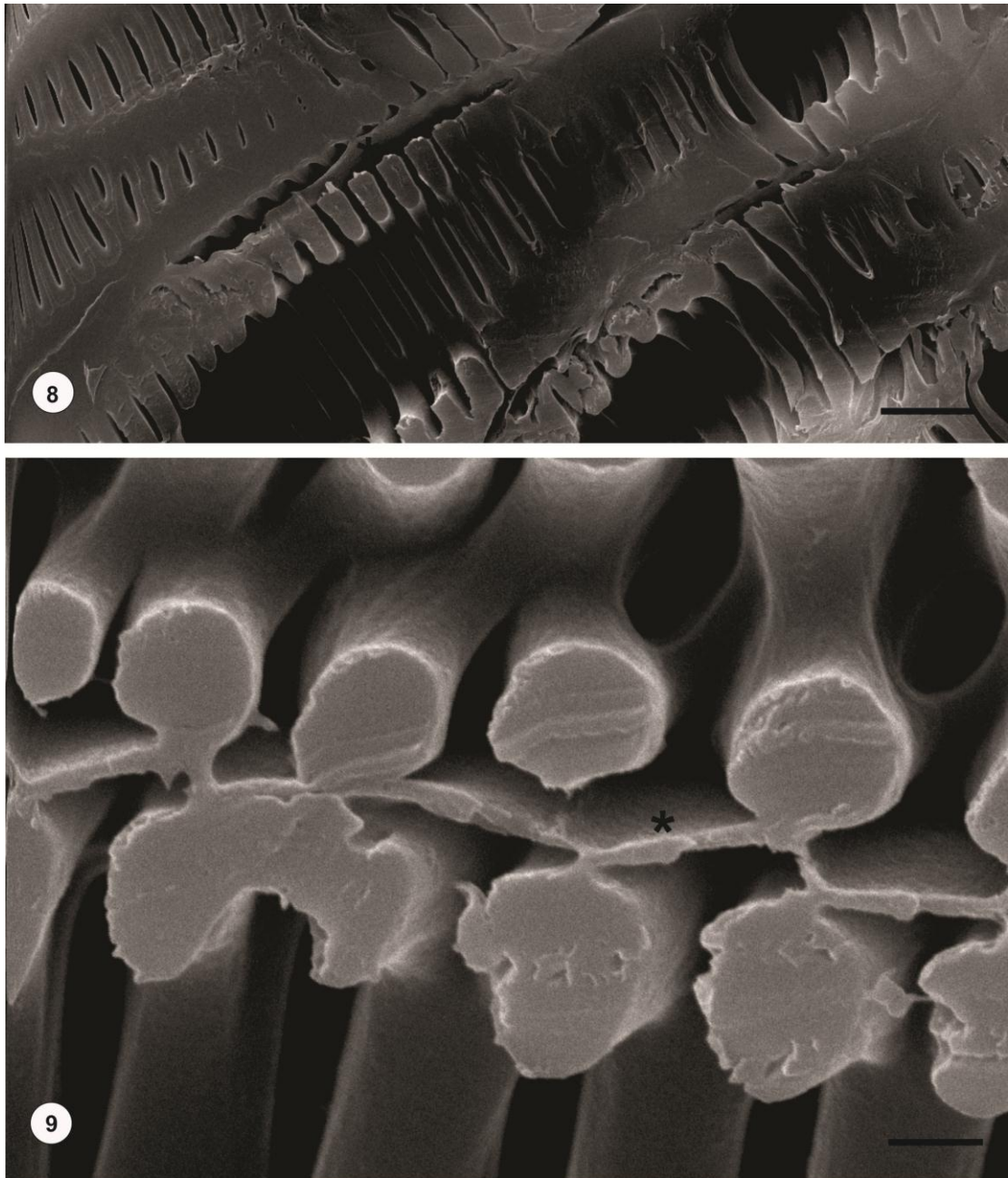
Figura 1. Traqueídeos de *Asplenium auritum*, os asteriscos estão evidenciando as regiões com membrana de pontoação inteira entre as paredes laterais e também nas paredes terminais. É possível ainda observar os espessamentos escalariformes. Barra= 10 μ m.



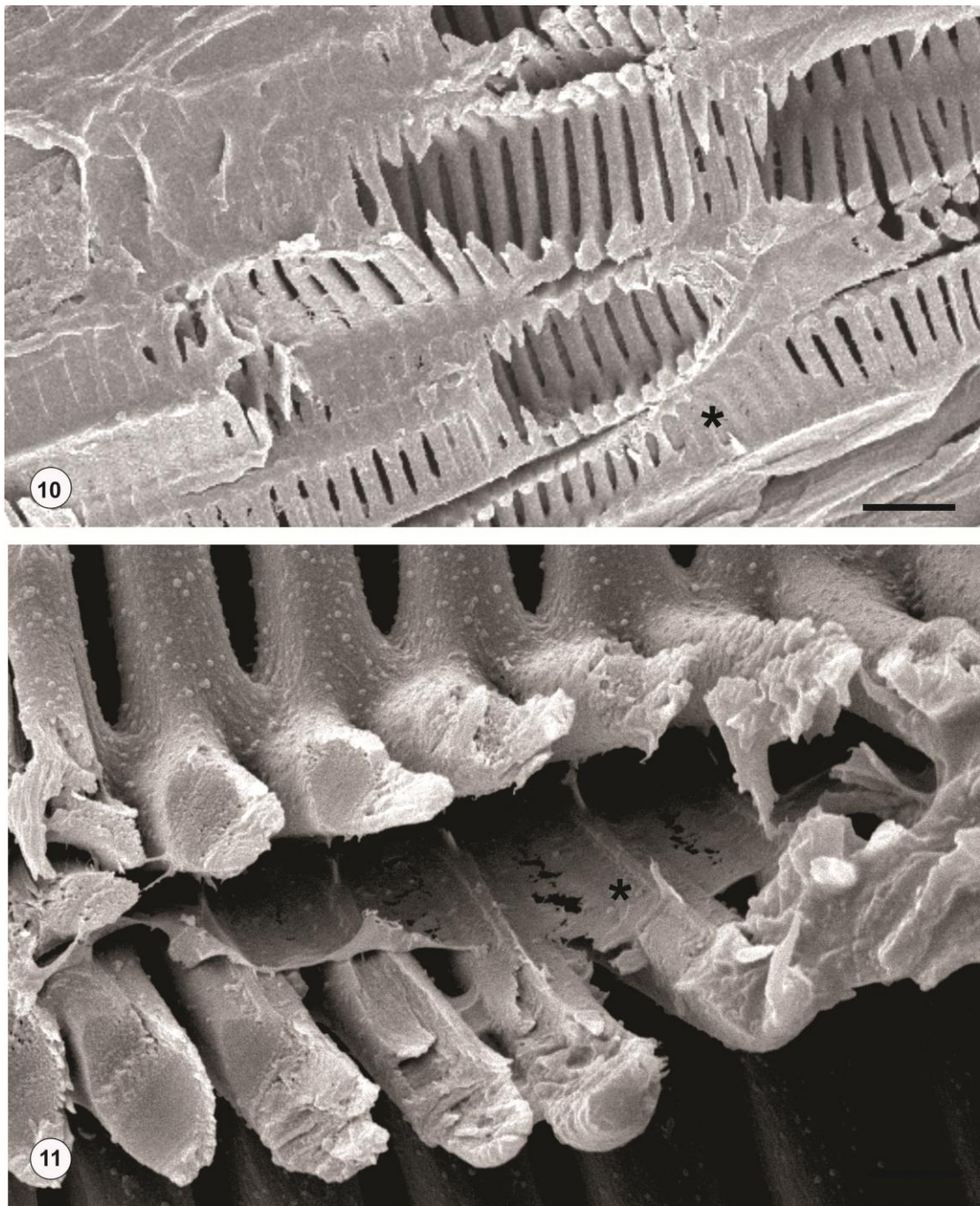
Figuras 2 e 3. *Asplenium harpeodes*. Figuras 4 e 5. *A. inaequilaterale*. Nas figuras 2, 4 e 5 é possível observar como os traqueídeos ocorrem agregados. Os asteriscos estão evidenciando as regiões com membrana de pontuação inteira entre as paredes terminais. Figuras 2, 4 e 5 Barra= 10µm. Figura 3, Barra= 2 µm.



Figuras 6 e 7. Elementos traqueais de *Asplenium mourai*. Na figura 7 é possível observar uma membrana inteira e bem preservada na parede terminal da célula. Figura 6 Barra= 10 μ m. Figura 7, Barra= 2 μ m.



Figuras 8 e 9. Secção longitudinal do caule de *Asplenium douglasii* . A figura 8 deixa evidente a presença de membrana de pontoação nas paredes terminais caracterizando o traqueídeo. Na figura 9 é possível observar uma espessa membrana de pontoação indicada pelo asterisco. Figura 8 Barra= 10 μ m. Figura 9, Barra= 2 μ m.



Figuras 10. Traqueídeos agregados de *Asplenium pseudonitidum*. O asterisco destaca região bem conservada da membrana de pontuação. Na figura 11 pode-se observar membrana de pontuação inteira com região danificada pelo processamento da amostra. Figura 10 Barra= 10 μ m. Figura 11 Barra= 2 μ m.

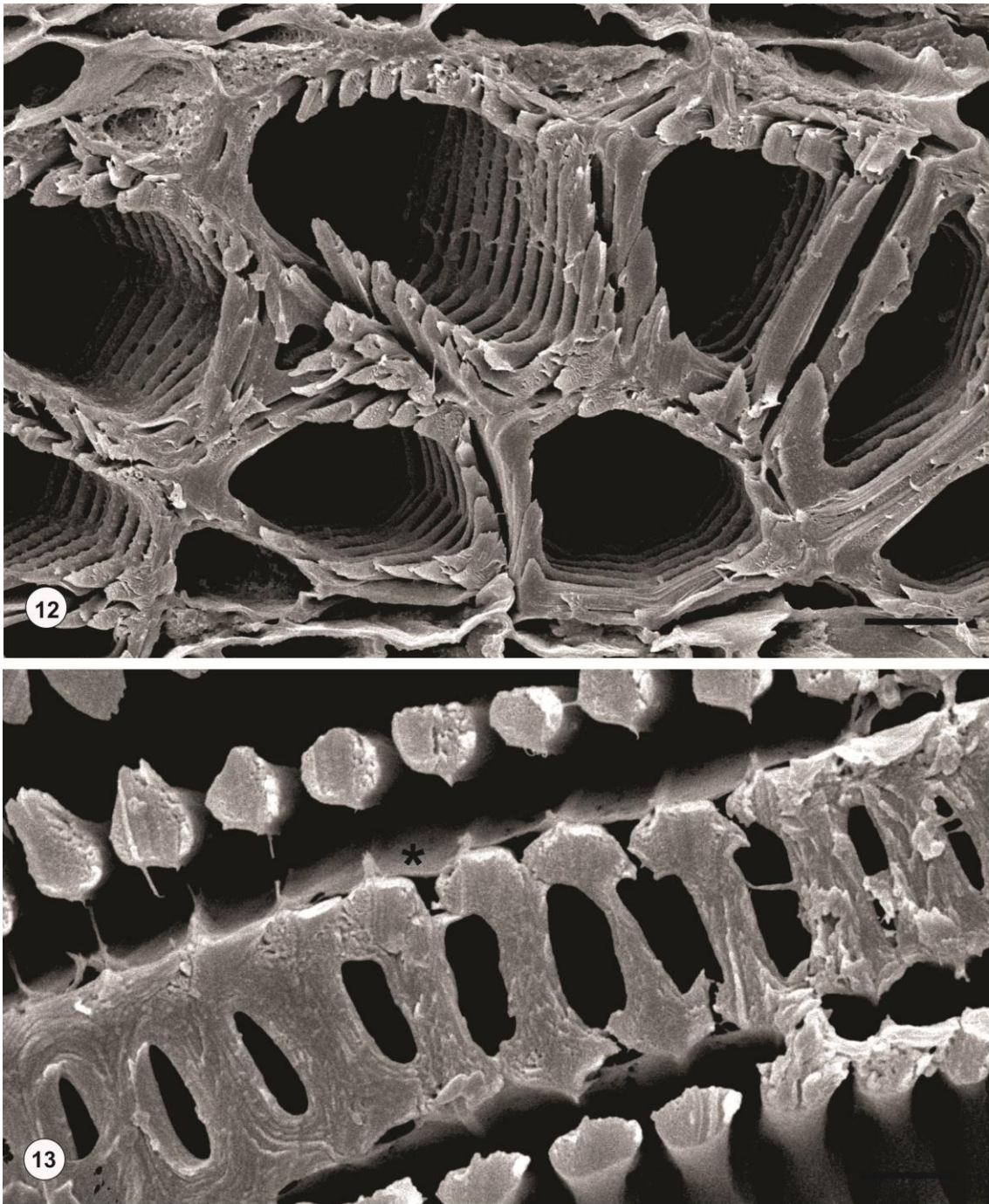


Figura 12 Secção transversal de *Asplenium regulare*. Figura 13. Secção longitudinal com asteriscos destacando as regiões com membrana de pontoação inteir a. É possível ainda observar os espessamentos escalariformes. Figura 12 Barra= 10 μ m. Figura 13 Barra= 2 μ m.

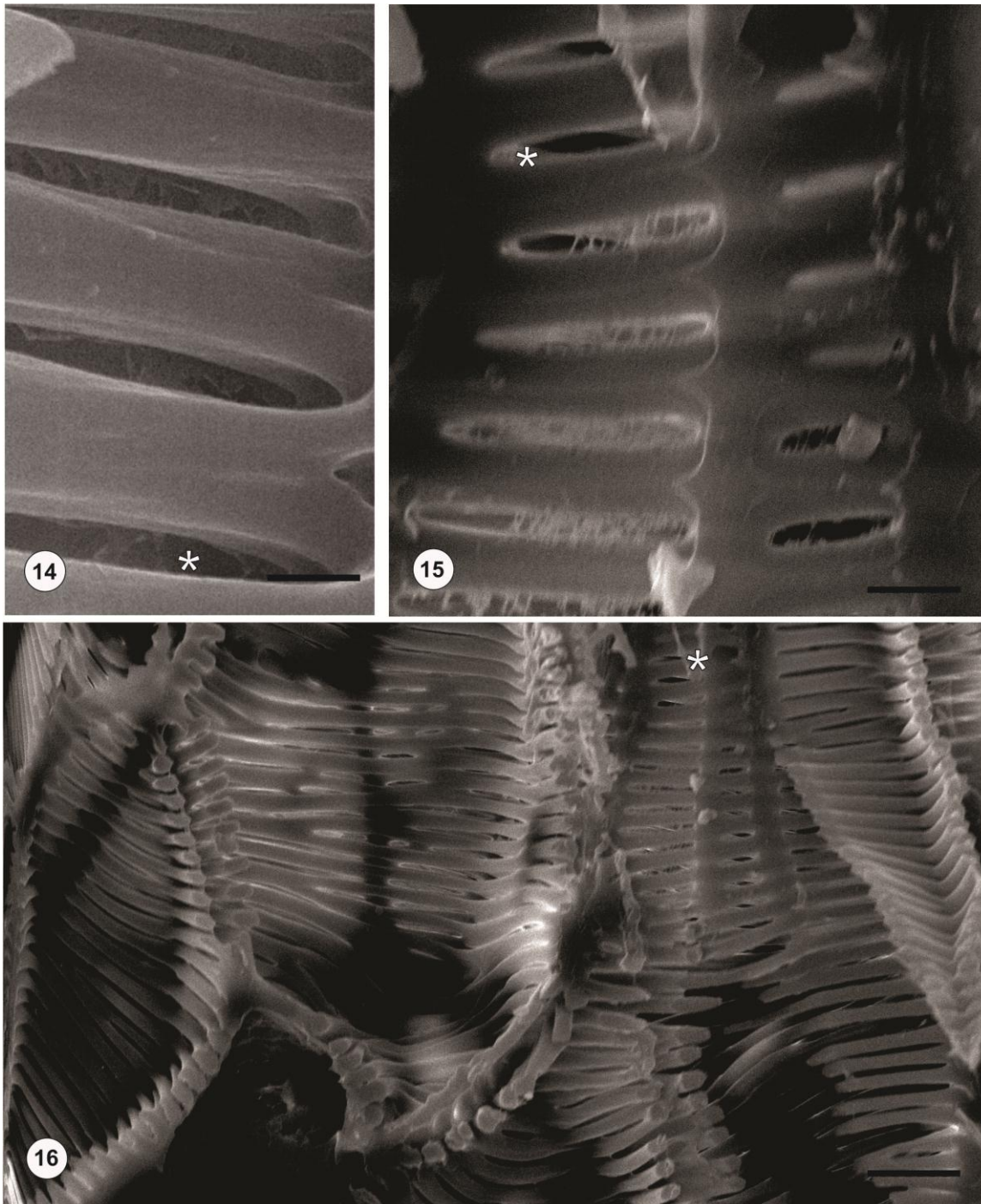
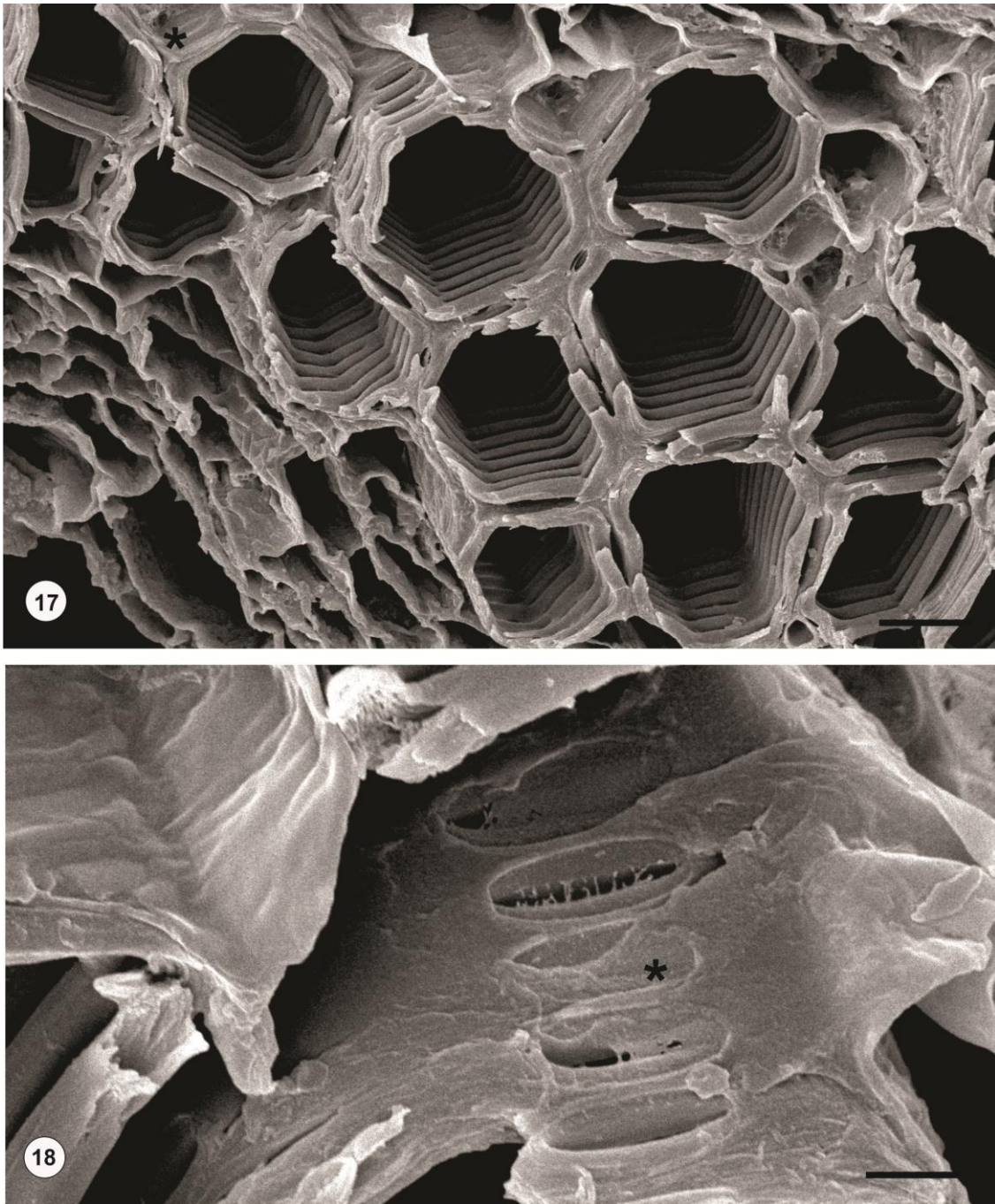
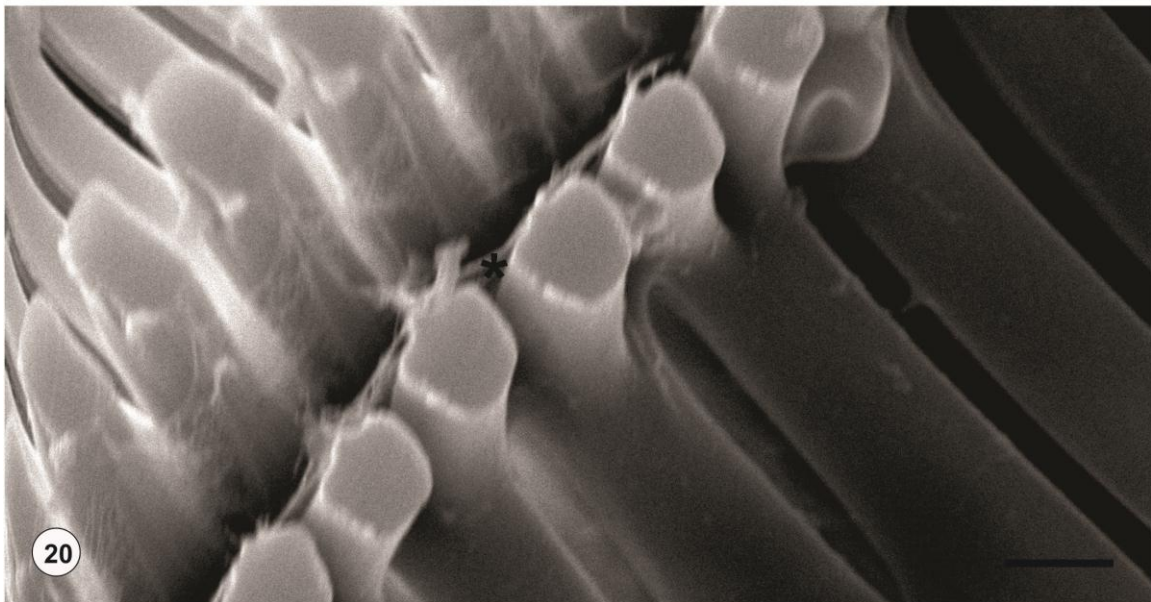
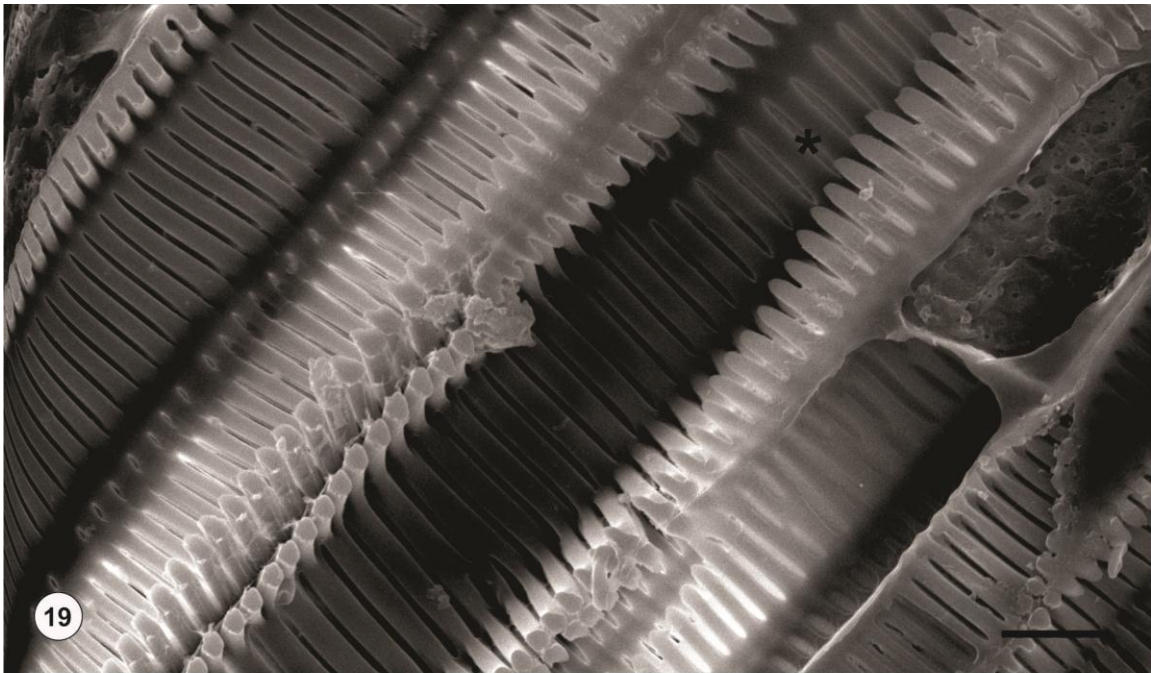


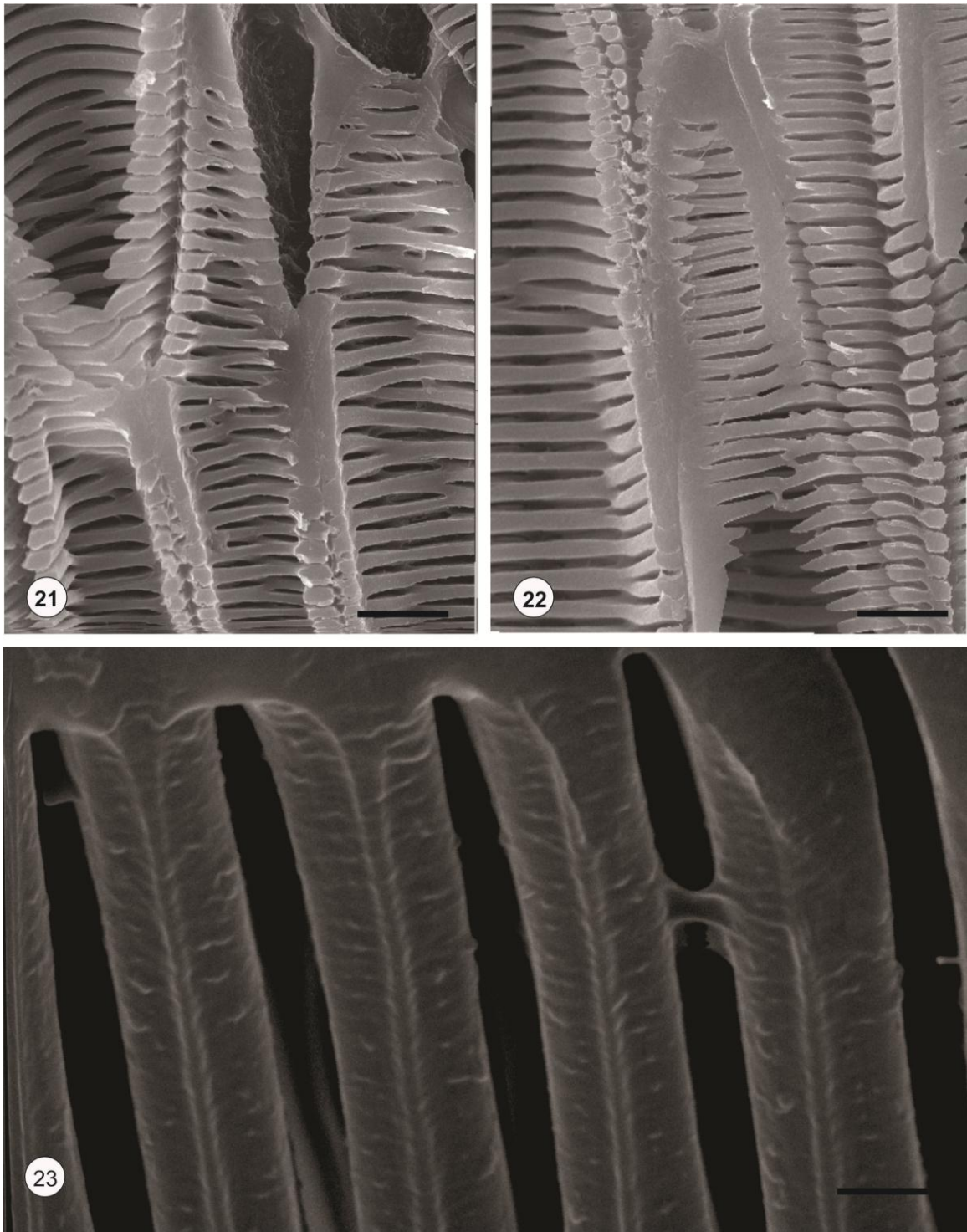
Figura 14. Elementos traqueais de *Asplenium scandicinum*. Figuras 15 e 16. Elementos traqueais de *Asplenium radianum*. Os asteriscos estão evidenciando as regiões da membrana com grandes poros ou perfurações. É possível ainda observar os espessamentos escalariformes. Figuras 16 Barra= 10 μ m. Figuras 14 e 15 Barra= 2 μ m.



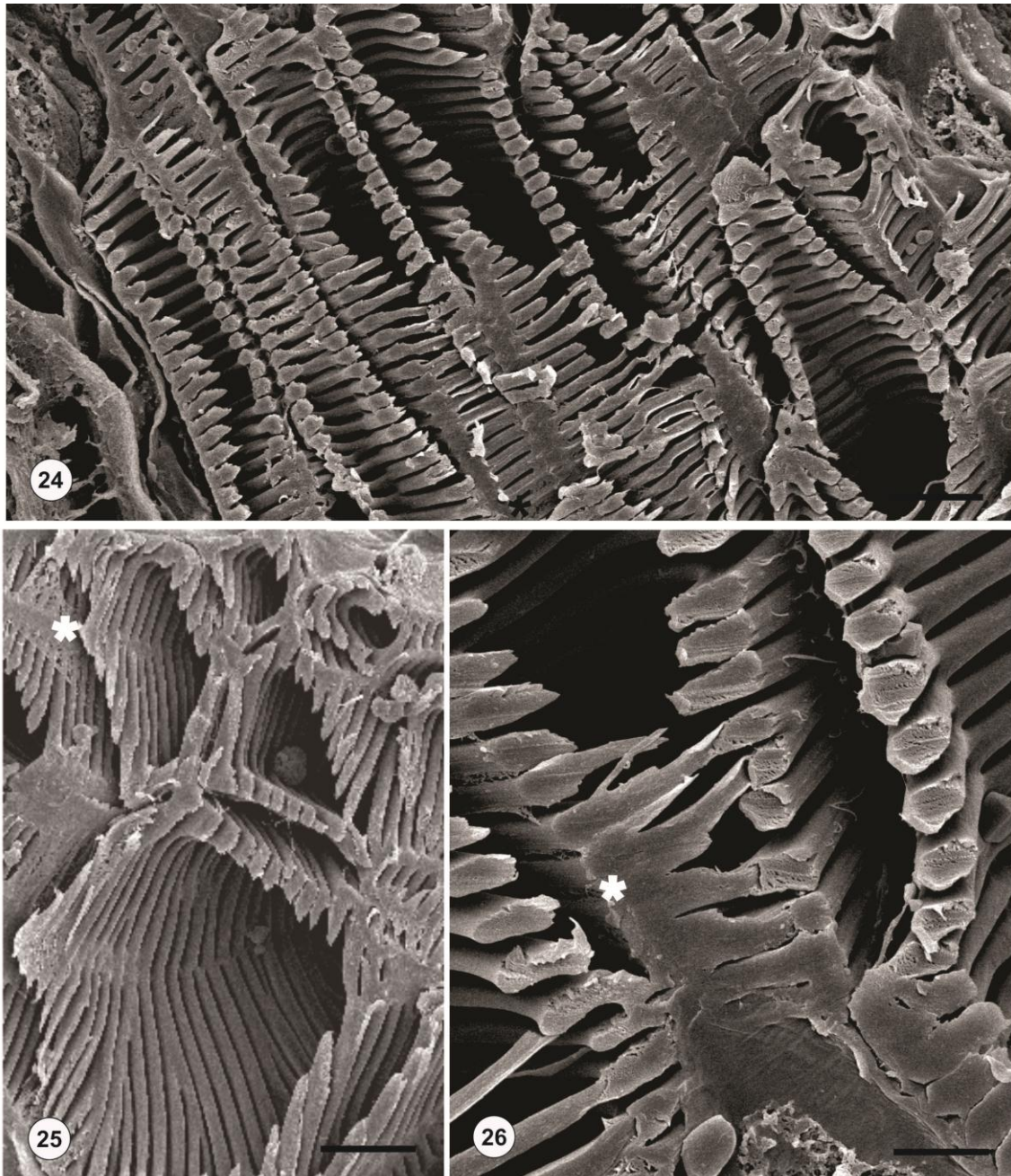
Figuras 17 e 18. Elementos traqueais de *Asplenium unisseriale*. Na primeira figura é possível observar os traqueídeos agregados e na segunda uma membrana de pontoação inteira (asterisco) com outra danificada acima . Figura 17 Barra= 10 μ m. Figura 18 Barra= 2 μ m.



Figuras 19 e 20. Xilema de *Asplenium monanthes* em plano longitudinal. Os asteriscos estão evidenciando as regiões onde a membrana sofreu lise intensa. É possível ainda observar os espessamentos escalariformes. Figura 19 Barra= 10 μ m. Figura 20 Barra= 2 μ m.



Figuras 21, 22 e 23 Elementos traqueais de *Hymenasplenium triquetrum*. Nas Figuras 21 e 22 é possível observar as paredes terminais das células e completa ausência de membrana entre as mesmas. Na figura 23 o detalhe das pontoações novamente sem membrana. . Figuras 21 e 22 Barra= 10 μ m. Figura 23 Barra= 2 μ m.



Figuras 24, 25 e 26 *Asplenium serratum*. Figura 21 em secção longitudinal, 22 em secção transversal e 26 com o detalhe dos resquícios da membrana de pontoação . Figuras 24 e 25 Barra= 10µm. Figura 26 Barra= 2 µm.

DISSCUSSÃO

Ao se descrever os elementos traqueais de samambaias vários questionamentos surgem. Nem sempre é fácil denominar as células de condução, no grupo, pois em muitos casos não é possível classificá-las como traqueídeos ou elementos de vaso. Por outro lado, essa definição é importante porque o tipo celular influencia nos aspectos fisiológicos (Carlquist e Schneider 2001), e uma correta classificação possibilitará uma melhor compreensão de como ocorre a condução de água nessas plantas

No entanto, para se descrever os elementos traqueais e discutir sua correta denominação com tranquilidade é fundamental levantar algumas questões sobre a metodologia, já que a mesma influenciará diretamente na análise e vem sendo amplamente discutida e revisada na última década.

Podemos confiar na metodologia?

Examinar a fina estrutura da membrana de pontoação é desafiador devido a sua natureza delicada. Já foi demonstrado através do microscópio eletrônico de transmissão (MET) e microscópio eletrônico de varredura (MEV) que as membranas em angiospermas consistem de várias camadas de microfibrilas de celulose (Choat et al. 2007), mas só a microscopia de força atômica (MFA), cryo MEV e MEV ambiental permitiram a observação de membranas hidratadas. Pesacreta *et al.* (2005) utilizaram MFA para comparar as estruturas seca e hidratada da membrana de *Sapium sebiferum*. De acordo com os autores, a membrana seca tinha uma aparência mais compactada. Já Shane *et al.* (2000) optaram pelo cryo MEV e demonstraram que mesmo uma secagem parcial das membranas de pontoação pode causar dano, mas enfatizaram que o mesmo não ocorria em todas as espécies, já que muitos estudos demonstraram membranas de pontoação secas e intactas (Sano 2004, Sano 2005).

Em 2009 Jansen *et al.* decidiram fazer um estudo extenso sobre a variação das membranas de pontoação em angiospermas utilizando MEV e MET. Algumas imagens revelaram que camadas da membrana de pontoação podem ser facilmente removidas durante a preparação, aumentando substancialmente a aparência de porosidade. Os pesquisadores concluíram que muitos dos grandes

poros observados com o MEV são resultado de camadas sendo removidas das membranas. Entretanto, em muitos casos poros puderam ser observados em membranas aparentemente intactas, e em alguns casos, grandes poros foram observados em membranas de pontoação vistas através da abertura interna do canal de pontoação de uma parede secundária não danificada. Essas observações indicam que poros de grande diâmetro nem sempre foram causados pela remoção de material da parede.

Carlquist e Schneider (2007) reconheceram que o processo de maceração para MEV, utilizado em vários de seus trabalhos, pode ter contribuído para retirar a membrana de pontoação ou levar a formação de artefatos. Por isso os autores decidiram investigar novamente algumas espécies utilizando o método da secagem em placa aquecedora (mais confiável), que já tinha sido utilizado com sucesso por Meylan e Butterfield (1978) e Sano (2005). Depois desse estudo os autores concluíram que a ocorrência de elementos de vaso é restrita a *Astrolepis*, *Marsilea*, *Pteridium* e *Vandenboschia* e a presença de placas de perfuração laterais e perfurações intermitentes em traqueídes foi considerada errônea para algumas espécies.

Para Choat *et al.* (2007), que fizeram uma extensa revisão sobre pontoações, é possível dizer que a microscopia eletrônica certamente leva a formação de artefatos na estrutura da membrana de pontoação, mas a extensão desses e suas implicações para a interpretação do funcionamento da membrana ainda devem ser esclarecidos.

No presente trabalho, todas as espécies foram tratadas com um método menos agressivo que é considerado pela maioria dos pesquisadores como um dos mais confiáveis. De fato a maior parte das espécies apresentou membrana bem nítida e conservada, mas foi possível observar a membrana claramente danificada em *Asplenium pseudonitidum* e *A. harpeodes*. Em outras a membrana apresentava grandes poros que deixaram margem para dúvida. No entanto, em *A. monanthes* e *Hymenasplenium triquetrum* não foi possível observar a membrana, mesmo depois de se escolher novas amostras e repetir todo o processo. Nessas duas espécies fica claro que ocorreu uma lise intensa da membrana de pontoação.

Como denominar os diferentes elementos traqueais?

De acordo com Carlquist e Schneider (2002a) os elementos de vaso, em dicotiledôneas sempre foram reconhecidos pela presença de 4 características: (1) a existência de uma ou mais perfurações (livres de membrana de pontoação) nas paredes terminais; (2) a arquitetura da parede terminal (perfurações) é diferente das pontoações das paredes laterais; (3) os elementos de vaso são mais largos que os elementos traqueais imperfurados que os acompanham; (4) os elementos de vaso são mais curtos que os elementos traqueais imperfurados que os acompanham. Entretanto, para samambaias e monocotiledôneas apenas os dois primeiros critérios podem ser aplicados.

Definir o que são elementos de vaso, no entanto, tornou-se uma tarefa bem mais difícil depois que as técnicas de ultraestrutura revelaram que o primeiro critério para se reconhecer um elemento de vaso (perfurações livres de membrana de pontoação) nem sempre é de visualização tão evidente. Em uma das espécies (*Asplenium scandicinum*) analisadas no presente trabalho, por exemplo, a porção lateral da parede apresenta membrana de pontoação contendo grandes poros em alguns pontos.

O mesmo foi observado em *Woodsia obtusa* (Carlquist e Schneider 2001) onde áreas de membranas contendo grandes poros se alternam com placas de perfuração incipientes (com remanescentes de membrana). Esse tipo celular levou os pesquisadores a questionar a terminologia em relação aos elementos de vaso. Carlquist e Schneider (2001) se perguntaram quando as membranas de pontoação têm poros de tal tamanho e abundância que possam ser chamadas de elementos de vaso. O critério quantitativo poderia talvez ser usado, como a habilidade de transmitir microesferas de diâmetro desconhecido de um elemento traqueal a outro. Mesmo essa definição poderia ser arbitrária. Ao se notar a capacidade dos poros do margo nos traqueídes das coníferas de permitir a passagem de partículas relativamente grandes em comparação as porosidades nas membranas de pontoação de elementos traqueais de outras plantas é indubitável que tal informação não levaria os anatomistas a questionar a presença de traqueídes nas coníferas. Para “fins práticos”, temos a tendência de reconhecer a presença de porosidades totalizando 50% da área de membrana de pontoação constituindo uma perfuração. Entretanto, um critério como a passagem de ar de tamanho

mínimo ou outro critério fisiológico é necessário: a terminologia dos elementos traqueais deve refletir suas distinções funcionais se possível.

Ainda de acordo com Carlquist e Schneider (2007) usando o termo placa de perfuração incipiente, é reconhecida uma transição, mesmo que não seja observada uma distinção entre traqueídes e elementos de vaso nessas instâncias transicionais. No presente trabalho foi possível notar a presença de espécies que sofreram intensa lise na membrana das paredes terminais e por isso apresentam placas de perfuração incipientes.

Os elementos traqueais funcionam agregados

O elementos traqueais ocorrem agregados formando fascículos nos estelos das samambaias, Existem numerosos pontos de contato entre as paredes laterais nos quais podem se desenvolver placas de perfuração. No entanto, em alguns grupos esses fascículos são menores e contém algumas células de parênquima entre os elementos traqueais. Nos dois casos a ocorrência de placas de perfuração, tanto nas terminações quanto nas laterais das células, tem o efeito de converter o fascículo em um tipo de vaso agregado e, dessa forma, nenhum elemento do fascículo fica isolado do outro em termos de condução (Carlquist & Schneider 2001).

Mesmo em espécies de outros grupos de plantas onde as paredes laterais apresentam somente pontoações, os elementos traqueais podem se apresentar agregados. Vilata (2012), estudando espécies de angiospermas, observou que os elementos condutores agregados requerem uma quantidade menor de células e um lúmen de menor diâmetro que espécies com distribuição uniforme de elementos traqueais. Ainda de acordo com o autor a agregação leva a uma rede mais eficiente de xilema, com maior capacidade de transporte de água.

Em *Pteridium* o parênquima invade o xilema e subdivide esse em segmentos de poucos vasos cada. Essa situação remete o xilema primário em angiospermas, no qual fileiras de vasos são separados dos outros e dessa forma os contatos laterais entre os vasos são relativamente poucos (Carlquist & Schneider 2007). Já nas espécies analisadas no presente trabalho é possível observar com clareza os elementos traqueais formando fascículos onde existe muito contanto entre as

faces laterais da parede celular. Esse contato é estabelecido por grandes pontoações elípticas e os espessamentos escalariformes provavelmente tem a função de manter a estabilidade do elemento traqueal.

Os elementos traqueais e a influência do ambiente

Muitos pesquisadores têm demonstrado que os elementos traqueais sofrem intensa influência do ambiente (Zimmerman 1983, Woodcock *et al.* 2000, Sperry e Robson, 2001) e, sem dúvida, a disponibilidade de água é a variável mais determinante. Isso é uma resposta ao conflito existente entre a necessidade estrutural do elemento de vaso para minimizar a cavitação por um lado e a eficiência de transporte por outro (Hacke e Sperry 2001)

Características relativas à membrana de pontoação são especialmente afetadas pela disponibilidade de água (Zwieniecki *et al.* 2001). De fato, no presente trabalho a única característica que variou entre as espécies foi a ocorrência de membranas de pontoação nas paredes terminais.

De acordo com Zimmerman (1983) A água passa entre os conduítes através de conexões de pontoações que consistem de uma membrana de pontoação (derivada da parede primária e lamela média de conduítes adjacentes) sustentada em uma câmara de pontoação formada pelo arqueamento da parede secundária. São as pontoações que permitem que a água passe entre conduítes funcionais, e ainda previnem o ar de vazar dentro do sistema de conduítes em um evento de dano. Poros grandes na membrana de pontoação irão facilitar o fluxo mas podem também comprometer a contenção de cavitação.

Até o presente trabalho, *Asplenium nidus* (epífita) era a única espécie analisada no que se refere aos elementos traqueais em Aspleniaceae. De acordo com Carlquist & Schneider (1999) o rizoma de *A. nidus* contém uma variedade de elementos traqueais no que diz respeito à diâmetro e morfologia da placa de perfuração. Algumas paredes terminais dos elementos traqueais apresentam membranas de pontoação com porosidade discreta; muitas das membranas mais porosas nessa preparação arrebatam. Algumas áreas talvez representem poros incipientes e talvez sejam o começo da formação de placas de perfuração distintos no rizoma de *A. nidus*

Inquestionavelmente, o habitat para plantas vasculares epífitas flutua consideravelmente em disponibilidade de água. A ocorrência de adaptações especiais em epífitas (pseudobulbos em Orquidaceae, reservatório de água em Bromeliaceae, velamen nas raízes de Orquidaceae) indica a severidade da flutuação de disponibilidade de água.

No presente trabalho não ficou evidente nenhuma relação entre habitat e presença de membrana de pontoação. Talvez as placas de perfuração observadas por Carlquis & Schneider (1999) em *Asplenium nidus* possam ser artefatos gerados pela metodologia que na ocasião do trabalho envolvia maceração e ponto crítico.

Hymenasplenium triquetrum, e *A. monanthes* apresentam elementos de vaso, já que não a membrana de pontoação não foi observada nas paredes terminais da célula. Apesar de a primeira espécie ser rupícola, dificilmente sofre com a disponibilidade de água já que a amostra coletada ocorre ao lado de uma grande cachoeira chegando mesmo a ficar com a superfície bem úmida. Em uma situação como essa, na qual a cavitação não chega a ser um problema, membranas delgadas ou inexistentes ajudam a aumentar a velocidade do fluxo de água.

Os dados apresentados no presente trabalho, no entanto, devem ser apenas o início dessa investigação e sugere-se que no futuro sejam escolhidas espécies capazes de sobreviver em variados ambientes, com o intuito de avaliar se, a espessura e ocorrência de membrana pode variar dentro de uma mesma espécie.

Além disso, sugere-se também que no futuro os elementos traqueais ocorrentes em Aspleniaceae possam ser avaliados em MFA para minimizar eventuais dúvidas referentes a artefatos gerados pelo método utilizado para MEV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARLQUIST, S. 1975. Ecological strategies of xylem evolution. University of California Press, Berkeley, California, USA.
- CARLQUIST, S. 1992. Pit membrane remnants in perforation plates of primitive dicotyledons and their significance. *Am. J. of Bot.* 79: 666-672.
- CARLQUIST, S. & SCHEIDER, E. L. 1997a. SEM studies on vessel in ferns. 2. *Pteridium*. *Am. J. of Bot.* 84: 581-587.
- CARLQUIST, S. & SCHEIDER, E. L. 1997b. SEM studies on vessel in ferns. 4. *Astrolepis*. *Am. fern J.* 87: 43-50.
- CARLQUIST, S. & SCHEIDER, E. L. & YATSEVICH, G. 1997. SEM studies on vessels in ferns. 1. *Woodsia obtusa*. *Am. Fern J.* 87:1-8.
- CARLQUIST, S. & SCHEIDER, E. L. 1998a. Origin and nature of vessels in monocotyledons. 5. Araceae family Colocasioidae. *Bot. J. Linne. Soc.* 128: 71-86.
- CARLQUIST, S. & SCHEIDER, E. L. 1998b. SEM studies on vessel in ferns. 6. *Woodsia ilvensis*, with comments on vessel origin in ferns *Flora* 193: 179-185.
- CARLQUIST, S. & SCHEIDER, E. L. 1998c. SEM studies on vessel in ferns. 10. Selected Osmudaceae and Schizaeaceae. *Int. J. of Plant Sci.* 159:788-797.
- CARLQUIST, S. & SCHEIDER, E. L. 1999a. Marattiaceae, with comments on vessel patterns in eusporangiate ferns. *Am. J. of Bot.* 86:457-464.
- CARLQUIST, S. & SCHEIDER, E. L. & KENEALY, K.F. 1999b. SEM studies on vessels in ferns. 8. *Platyzoma*. *Aust. J. of Bot.* 47:277-282.
- CARLQUIST, S. & SCHEIDER, E. L. 2000a. SEM studies of vessel in ferns. 14. *Ceratopteris*. *Aquatic Bot.* 66:1-8.
- CARLQUIST, S. & SCHEIDER, E. L. 2000b. SEM studies on Vessels in Ferns. 16. Pacific Tree Ferns (Blechnaceae, Cyatheaceae, Dicksoniaceae). *Pacific Sci.* 54: 75-86.
- CARLQUIST, S. & SCHEIDER, E. L. 2000c. SEM Studies on Vessels in Ferns. 18. Montane Cheilantheid Ferns (Pteridaceae) of North America. *Aliso* 19: 31-39.
- CARLQUIST, S. & SCHEIDER, E. L. & LAMOUREX, C. 2000d. SEM Studies on Vessels in Ferns. 20. Hawaiian Hymenophyllaceae. *Pacific Science* 54: 365-375.

- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 2001. Vessels in ferns: structural, ecological, and evolutionary significance. *Am. J. of Bot.* 8: 1-13.
- CHOAT, B; COBB, A. R. & JANSEN, S. 2007. Structure and function of bordered pits: new discoveries and implications on whole-plant hydraulic function. *Tansley review. New phytologist* 177: 608-626.
- HACKE, U. G & SPERRY, J. S. 2001. Functional and ecological xylem anatomy. *perspectives in plant ecology, evolution and systematics.* vol 4:87-115
- MEYLAN, B. A., & BUTTERFIELD, B. G. 1978. The structure of New Zealand woods. DSIR. Bulletin 222. New Zealand Department of Scientific and Industrial Research, Wellington, New Zealand.
- OGURA, Y. 1972. Comparative anatomy of vegetative organs of the pteridophytes. Gebruder Borntraeger, Berlin.
- PESACRETA, T. C., L. H. GROOM, & T. G. RIALS. 2005. Atomic force microscopy of the intervessel pit membrane in the stem of *Sapium sebiferum* (Euphorbiaceae). *International Association of Wood Anatomists Journal* 26 : 397 – 426 .
- SHANE, M. W., M., MC CULLY & M. J. CANNY 2000. Architecture of branch-root junctions in maize: structure of the connecting xylem and the porosity of pit membranes. *Annals of botany* 85: 613-624.
- SCHNEIDER, S.M 1993. "Plasticity as a selectable trait: reply to via, *American naturalist* 142: 371-373.
- SCHNEIDER, H. (1996): The root anatomy of ferns: a comparative study. *Pteridology in perspective.* -Royal Botanical Garden, Kew, pp. 271-283.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1997. SEM studies on vessels in ferns. 3. *Phlebodium* and *Polystichum*. *Int. J. of Plant Sci.* 1158: 343-349.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1998a. Origin and nature of vessels in monocotyledons. 4. Araceae subfamily Philodendroidae. *Journal of the Torrey Bot. Soc.* 125: 253-260.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1998b. SEM studies on vessels in ferns. 5. *Woodsia scopulina*. *Am. Fern J.* 88:17-23.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1998c. Sem studies on vessels in ferns. 7. *Microgramma nitida*. *Ann. del Inst. Biol. de la Uni. Auton. de Méx.* 69:1-7.

- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1998d. SEM studies on vessels in ferns. 9. *Dicranopteris* (Gleicheniaceae) and vessels patterns in leptosporangiate ferns. Am. J. of Bot. 85: 1028-1032.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1999a. SEM studies on vessels in ferns. 11. *Ophioglossum*. Bot. J. of the Linn. Soc. 129:105-114.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1999b. SEM studies on vessels in ferns. 13. *Nephrolepis* Am. Fern J. 89: 171-177.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1999c. SEM studies on vessels in ferns.. 15. Selected rosette epiphytes Aspleniaceae, Elaphoglossaceae, Vittariaceae). Int. J. of Plant Sci. 160: 1013-1020.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 2000. SEM Studies on Vessels in Ferns. 17. Psilotaceae. Am. J. of Bot. 87:176-181.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 2000. SEM Studies on Vessels in Ferns. 19. Marsilea. Am. Fern J. 90: 32-41.
- SCHULZE, G., J. TREUTLEIN, and M. WENK. 2001. Phylogenetic relationship between *Asplenium bourgaei* (Boiss.) Milde and *A. jahandiezii* (Litard) Bory inferred for morphological characters and rbcL sequences. Plant Biology 3: 364–371.
- SCHUTPELLZ, E. & PRYER, K. M. 2008. Fern phylogeny. In: HAUKER, T. A. & HAUFLE, C. M. (eds.). The biology and evolution of ferns and Lycophytes. Cambridge Univ. Press Pp.395-416.
- VILALTA, J. M., MENCUCCINI, M., ALVAREZ, X, CAMACHO, J. LOEPPE, L PINOL, J. 2012. Spatial distribution and packing of xylem conduits. American Journal of Botany 99 (7): 1189-1196.
- WOODCOCK, D. W, DOS SANTOS, G & REYNEL, C. 2000. Wood characteristics of Amazon forest types. International association of Wood anatomists journal 21 277-292.
- ZIMMERMANN, M. H. 1983. Xylem structure and the ascent of sap. Springer, Berlin.
- ZWIENIECK, M. A, MELCHER, P. J & HOLBROOK, N. M. 2001. hydrogel control of xylem hydraulic resistance in plants. Science 291: 1059-1062.

Capítulo 3

Evolução de caracteres anatômicos em Aspleniaceae Newman.

M.L.R WETZEL

Museu Nacional, São Cristóvão, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

L. DA S. SYLVESTRE

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Bloco A, Brasil

V. L. de LIMA

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Bloco A, Brasil

R. C. VIEIRA

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Bloco A, Brasil

Evolução de caracteres anatômicos em Aspleniaceae Newman.

RESUMO

Apesar de a família Aspleniaceae ser monofilética e bem delimitada as relações dentro do grupo ainda são obscuras. Características anatômicas foram incluídas em uma árvore baseada em dados moleculares com o objetivo de verificar se esses caracteres são informativos e discutir eventuais implicações evolutivas destes. Foram obtidos índice de consistência (IC) de 0,512 e de retenção (IR) 0,417. Dezoito características mostraram-se informativas. O tipo de esclereides ao redor da endoderme da raiz, por exemplo, separou o grupo externo e os gêneros *Hymenasplenium* e *Asplenium*. A presença de linhas laterais é uma sinapomorfia do clado que agrega *A. auritum* e *A. auriculatum*, um já sabido grupo de afinidade morfológica e molecular. Já outras características parecem ter surgido independentemente enquanto outras regrediram em alguns clados.

Palavras-chave: *Hymenasplenium*, *Asplenium*, filogenia.

ABSTRACT

Although the family Aspleniaceae be monophyletic and well-defined relations within the group are still unclear. Anatomical characteristics were included in a tree based on molecular data in order to verify that these characters are informative and discuss possible evolutionary implications of these. Were obtained consistency index (CI) of 0.512 and retention (RI) 0,417. Eighteen characteristic proved informative. The type of sclereids around the root endodermis, for example, separated and external group *Hymenasplenium* *asplenium* and genres. The presence of wings is a synapomorphy of the clade that adds *A. auritum* and *A.auriculatum*, an already known group of morphological affinity. Have other features seem to have arisen independentemente while others regressed in some clades.

Key-words: Aspleniaceae, characters evolution, filogeny

INTRODUÇÃO

A filogenia de samambaias tem sido foco de vários estudos que procuram entender a evolução desse grupo tão diverso. Atualmente, são reconhecidos cinco grandes clados de samambaias leptosporangiadas, sendo o clado Polypodiaceae o mais derivado. Este clado foi relacionado a ordem Polypodiales, tendo como principal sinapomorfia a presença de um ânulo longitudinal interrompido pelo pedicelo no esporângio. São ainda reconhecidas dois grandes grupos naturais no clado Polypode – as Eupolipoides I e as Eupolipoides II (Schuettpelz & Pryer 2007).

Dentre as famílias de Eupolypods II, Aspleniaceae vem recebendo forte suporte em análises moleculares (Shuettpelz & Pryer 2007, Sundue & Rothfels 2013). Apesar de a família ser reconhecida como monofilética e sua relação com outros grupos já ter sido bem delimitada, a resolução interna ainda não foi bem estabelecida. São atualmente reconhecidos dois gêneros: *Asplenium*, que engloba a grande maioria das espécies e *Hymenasplenium* (Schneider *et al.* 2004, Smith *et al.* 2006).

Estudos morfológicos sempre apontaram a ocorrência de grupos de afinidade em *Asplenium* (Tryon & Tryon 1992, Sylvestre 2001). Nos últimos anos, dados da sequência do nucleotídeo *rbcL* e métodos filogenéticos foram introduzidos para inferir as relações no grupo. (Murakami *et al.* 1998, 1999 Vogel *et al.* 1996, Schneider *et al.* 2004, Smith *et al.* 2006, Shulze *et al.* 2001, Van Den Heede 2003).

Schneider *et al.* (2009) discutiram o uso de dados morfológicos na análise filogenética de samambaias e demonstraram que caracteres de morfologia potencialmente informativos podem gerar resultados filogenéticos bem suportados. Os autores apontam ainda que: 1) muitos estudos empíricos e teóricos demonstram que toda informação acessível deve ser usada para obter uma hipótese filogeneticamente mais robusta e 2) os dados morfológicos são os únicos observáveis tanto em taxa viventes quanto em fósseis.

Apesar da importância dos dados morfológicos já ter sido demonstrada, poucos trabalhos utilizaram anatomia em suas análises filogenéticas (Cattai, 2007, Noguera-Savelli & Jáuregui 2011, Saraiva, 2013). Mais raros ainda são os que

fazem tal tipo de trabalho com samambaias, como Hernandez-Hernandez (2009) e Schneider *et al.* (2002). Talvez por trabalhos sobre a anatomia de espécies de Aspleniaceae serem escassos essas informações raramente são incluídas nas análises. Por esse motivo, pouco se sabe sobre a evolução dos caracteres anatômicos na família.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é avaliar a ocorrência de caracteres anatômicos filogeneticamente informativos e discutir eventuais implicações evolutivas destes.

MATERIAIS E MÉTODOS

A seleção dos terminais foi feita com o propósito de englobar os diferentes grupos de afinidade da família. As espécies incluídas na análise estão listadas na Tabela 1, com seus respectivos números de registro e separadas por cores que representam, os diferentes grupos de afinidade morfológica segundo Tryon & Tryon (1982) e Sylvestre (2001). Para a polarização da árvore foram escolhidas duas espécies para o grupo externo (*Diplazium cristatum* e *Diplazium plantaginifolium*), Athyriaceae.

Características anatômicas da raiz, do caule e da folha foram então selecionadas e seus estados de caráter (binário e alguns multiestado) estão listados na Tabela 2. De 40 características, 20 mostram-se informativas.

Os mesmos espécimes constantes da Tabela 1. foram submetidas à extração do DNA total pelo método do CTAB a 2 (Doyle & Doyle 1987) feitos a partir de fragmentos de folha armazenados em sílica gel e posteriormente macerados em nitrogênio líquidos. Após extração, as amostras foram amplificadas com os marcadores de cloroplasto *rbcl* e *trnL-F* através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). As amostras foram então sequenciadas e posteriormente foi feita a sequência de consenso (F e R) para cada marcador através do programa Bioedit (Hale 1999). As sequências foram então alinhadas e foi gerada uma árvore de máxima verossimilhança (ML) concatenada dos dois marcadores usando o software PhyML com bootstrap (100 réplicas), através do programa de alinhamento Seaview 4.2 (Guidon *et al.* 2010).

A reconstrução dos caracteres anatômicos foi feita com base na árvore de consenso obtida com os dois marcadores moleculares e a matriz morfológica através do programa Mesquite (Madison & Madison 2015).

Com o objetivo de medir a quantidade de homoplasias da árvore foi calculado o índice de consistência (IC) e para calcular a fração de sinapomorfias em relação às autopomorfias o índice de retenção (IR)

Tabela 1. Relação de material examinado por táxon, utilizados na análise morfológica. As diferentes cores representam os diferentes grupos de afinidade morfológica propostos por Tryon & Tryon (1992) e Sylvestre (2001).

Grupo	Espécies	Número de coleta
Externo	<i>Diplazium cristatum</i>	
	<i>Diplazium plantaginifolium</i>	
1	<i>Asplenium auriculatum</i> Sw.	Damasceno 396 (RB)
	<i>A. auritum</i> Sw.	Damasceno 425 (RB)
2	<i>A. balansae</i> (Baker) Sylvestre	M. G. Santos 1080 (RB)
	<i>A. douglassi</i> Hook. & Grev.	Bovini 3689 (RB)
3	<i>A. harpeodes</i> Kunze	Damasceno 352 (RB)
4	<i>A. monanthes</i> L.	Sylvestre 2189 (RB)
	<i>A. castaneum</i> Scldt. & Cham	Condack & Damasceno s.n (RFA)
5	<i>A. pseudonitidum</i> Hook.	Sylvestre 2175 (RB)
	<i>A. scandicinum</i> Kaulf.	Damasceno 392 (RB)
6	<i>A. serra</i> Langsd. et Fisch.	Sylvestre 2164 (RB)
7	<i>A. serratum</i> L.	(RFA)
	<i>A. unisseriale</i> Raddi	Sylvestre 21 74 (RB)
	<i>A. oligophyllum</i> Kaulf.	Damasceno 401 (RB)
8	<i>Hymenasplenium triquetrum</i> (N. Murak. et R. C. Moran) L. Regalado & Prada	Sylvestre 2208 (RB)

Tabela 2. Caracteres e estados de caracter utilizados na análise filogenética de Aspleniaceae Newman

Número	Caracter\estado de caracter
Raiz	
1	Presença de grãos de amido na raiz: presente (0), ausente (1)
2	Espaços intercelulares no córtex da raiz: bem evidentes (0), pouco evidentes (1)
3	Presença de espessamentos em hélice na raiz: ausente (0), presente (1)
4	Esclereídes ao redor da endoderme na raiz: ausente (0), presente com espessamentos na parede periclinal interna (1), presente com espessamentos uniformes (2)
Caule	
5	Compostos fenólicos na epiderme do caule: ausente (0), presente (1)
6	CB no caule: ausente (0), presente (1)
Pecíolo	
7	Epiderme: simples (0), com células espessadas (1)
8	Linhas laterais: ausente (0), presente (1)
9	Camada de esclerênquima no córtex externo: presente (0), ausente (1)
10	Tanino ao redor da endoderme: (0) presente, (1) ausente
11	Esclerênquima aoredor da endoderme: (0) ausente, (1) presente
Lâmina foliar	
12	Células mais alongadas na região dos feixes: (0) ausente, (1) presente
13	Cloroplastos nas células da epiderme: (0) presente, (1) ausente
14	Ráfides nas células da epiderme: (0) ausente, (1) presente
15	Pequenos cristais nas células da epiderme: (0) ausente, (1) presente
16	Tricomas: (0) ausente, (1) presente
17	Banda circuendodérmica: presente (0), ausente (1)
18	Membrana de pontoação bem evidente na porção terminal do elemento traqueal: (0) presente, (1) ausente
19	Nervura : (0) livre, (1) areolada
20	Divisão da lâmina: (0) pinada, (1) inteira

Tabela 2. Matriz de caracteres anatômicos utilizada na análise de reconstrução de caráter ancestral em Aspleniaceae, com 17 terminais e 20 caracteres. O grupo externo é formado pelas duas espécies de *Diplazium* (Athyraceae). Legenda: ? caracteres não codificados.

Taxon	Caracteres																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>Diplazium cristatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Diplazium plantaainifolium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Asplenium auriculatum</i>	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>A. auritum</i>	?	?	?	?	?	?	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>A. balansae</i>	?	?	?	?	?	?	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>A. castaneum</i>	1	1	1	1	0	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>A. douglasii</i>	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>A. harpeodes</i>	?	?	?	1	0	?	0	0	?	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>A. monanthes</i>	?	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>A. oliaphyllum</i>	?	?	?	1	0	?	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>A. pseudonitidum</i>	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>A. scandicinium</i>	?	?	?	1	0	?	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0
<i>A. serra</i>	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>A. serratum</i>	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>A. unisseriale</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	?	0	0	1	0	0	0	2	0
<i>Hymenasplenium triquetrum</i>	1	1	1	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0

RESULTADOS

Para a reconstrução dos estados de caráter ancestrais foram utilizadas 18 características anatômicas e duas morfológicas, das quais 20 mostraram-se informativas. Os números de referência para os clados de Aspleniaceae são apresentados na figura 1. Foram obtidos índice de consistência (IC) de 0,512 e de retenção (IR) 0,417.

Raiz

O mapeamento demonstrou que os caracteres 1 e 2 da raiz são restritos ao grupo externo. A presença de grãos de amido e a presença de espaços intercelulares são estados ancestrais que se perderam no clado 3.

A ocorrência de espessamentos em hélice na raiz é observada em *Hymenasplenium*, mas não no clado 8. formado por espécies que eram associadas ao gênero *Antigramma* (Figura 2).

Os esclereides ao redor da endoderme tem espessamento uniformes em *Hymenasplenium*. Em *Asplenium* as paredes periclinais internas das células são mais espessas, enquanto no grupo externo os esclereides não estão presentes. A ausência da característica no grupo externo demonstra que essa é a condição basal (Figura 3).

Caule

O padrão de evolução da presença de tanino é incerta no grupo, sendo igualmente possível o surgimento deste estado no ancestral do clado 6 e subsequente reversão para a ausência dessas substâncias no clado 11 ou o surgimento independente em *A. unisseriale* e *A. douglasii* (Figura 4).

A bainha circunduodérmica com conteúdo taníferos surgiu independentemente em *Hymenasplenium* e no clado 7. Por não estar presente em *Diplazium*, podemos considerar ausência como condição ancestral (Figura 5).

Pecíolo

A presença de linhas laterais é uma possível sinapomorfia do clado 21 que inclui *A. auritum* e *A. auriculatum*. Já a presença de camadas de esclerênquima abaixo da epiderme surgiu de forma independente na última espécie (Figura 6).

A presença de esclerênquima no córtex externo é constante nas espécies analisadas e só não foi observado em *A. auriculatum* onde houve uma regressão (Figura 7).

A presença de tanino ao redor da endoderme está restrita ao clado 5 e houve duas regressões (*A. pseudonitidum* e *A. serratum*), sendo que a ausência do metabólito é a condição ancestral (Figura 8).

O esclerênquima ao redor da endoderme está presente em quase todas as espécies. Em *A. auritum* e no clado 8 as células são perdidas de forma independente (Figura 9).

Lâmina foliar

Na lâmina foliar, as células mais alongadas na região dos feixes está presente em *Hymenasplenium* e outros três terminais caracterizando o surgimento independente da característica. A ausência dessa característica foi observada o grupo externo (Figura 10) e por isso essa condição é ancestral.

A ocorrência de cloroplastos nas células da epiderme é constante nas espécies analisadas e a ausência é observada duas vezes no clado 17 (Figura 11).

Os pequenos cristais nas células da epiderme são observados duas vezes em *A.unisseriale* e *A. serratum*. A ausência é a condição ancestral (Figura 12).

Caracteres morfológicos e membranas de pontoação

A lise da membrana nas paredes terminais ocorreu independentemente em *H. triquetrum* e *A. monanthes* (Figura 13). A presença de membranas de pontoação nas paredes terminais é a condição ancestral (Figura 15).

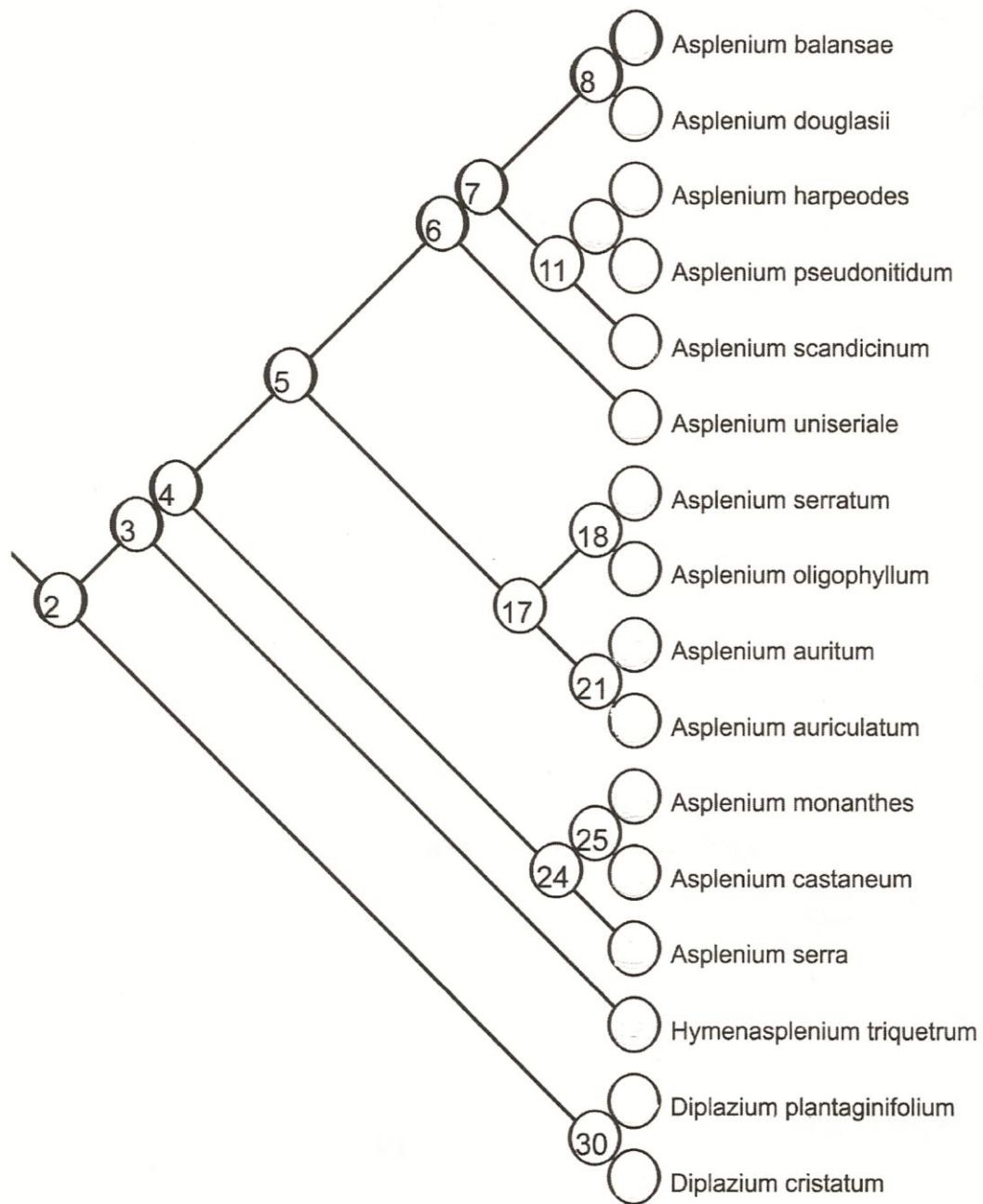


Figura 1. Árvore mais parcimoniosa com números de referência para cada clado sobre os ramos. e também para os terminais

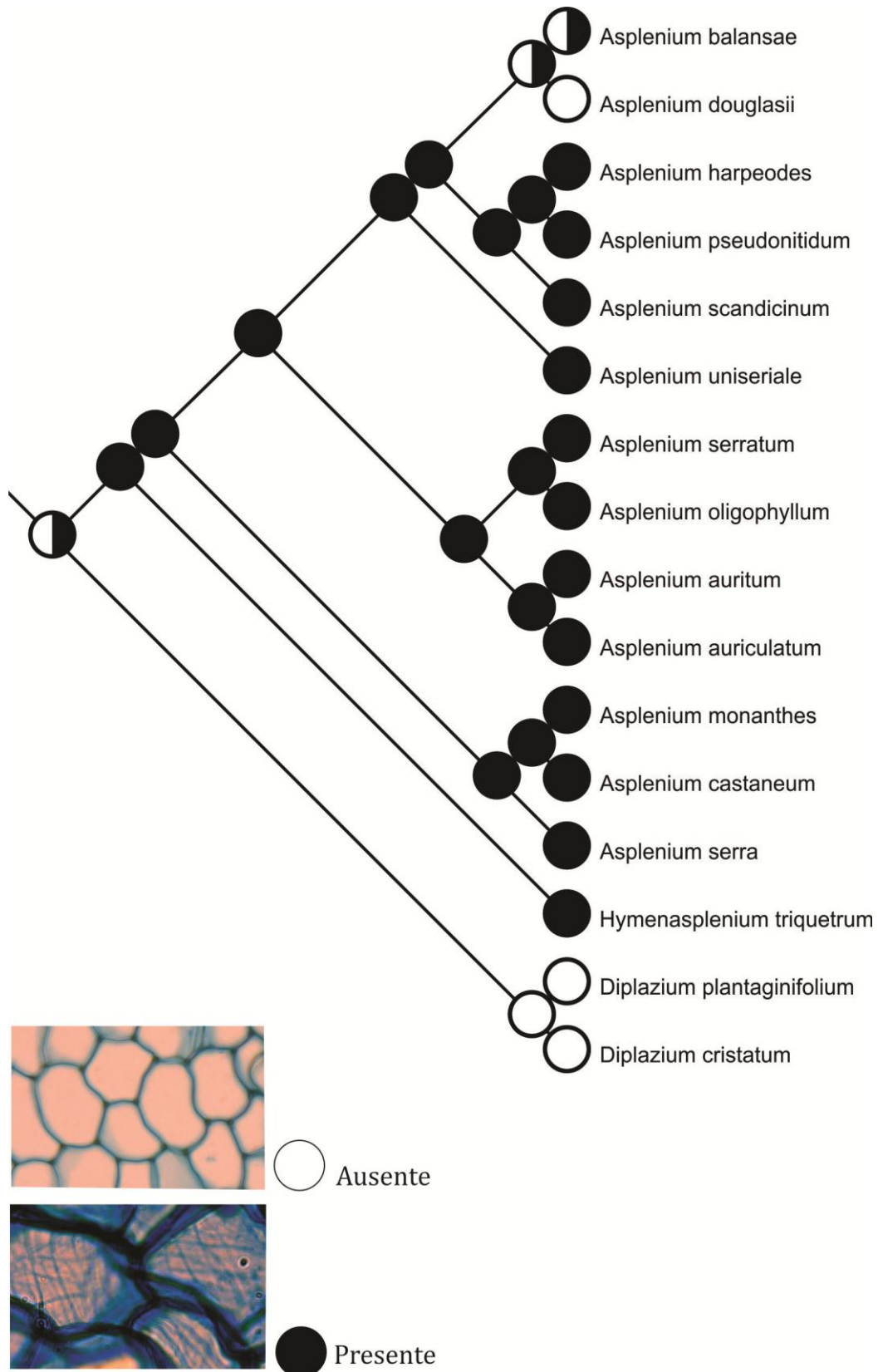


Figura 2. Mapeamento da ocorrência de espessamentos em hélice nas células do córtex da raiz (caráter 3); micrografias em detalhe de *Asplenium douglassii* e *A. serratum*.

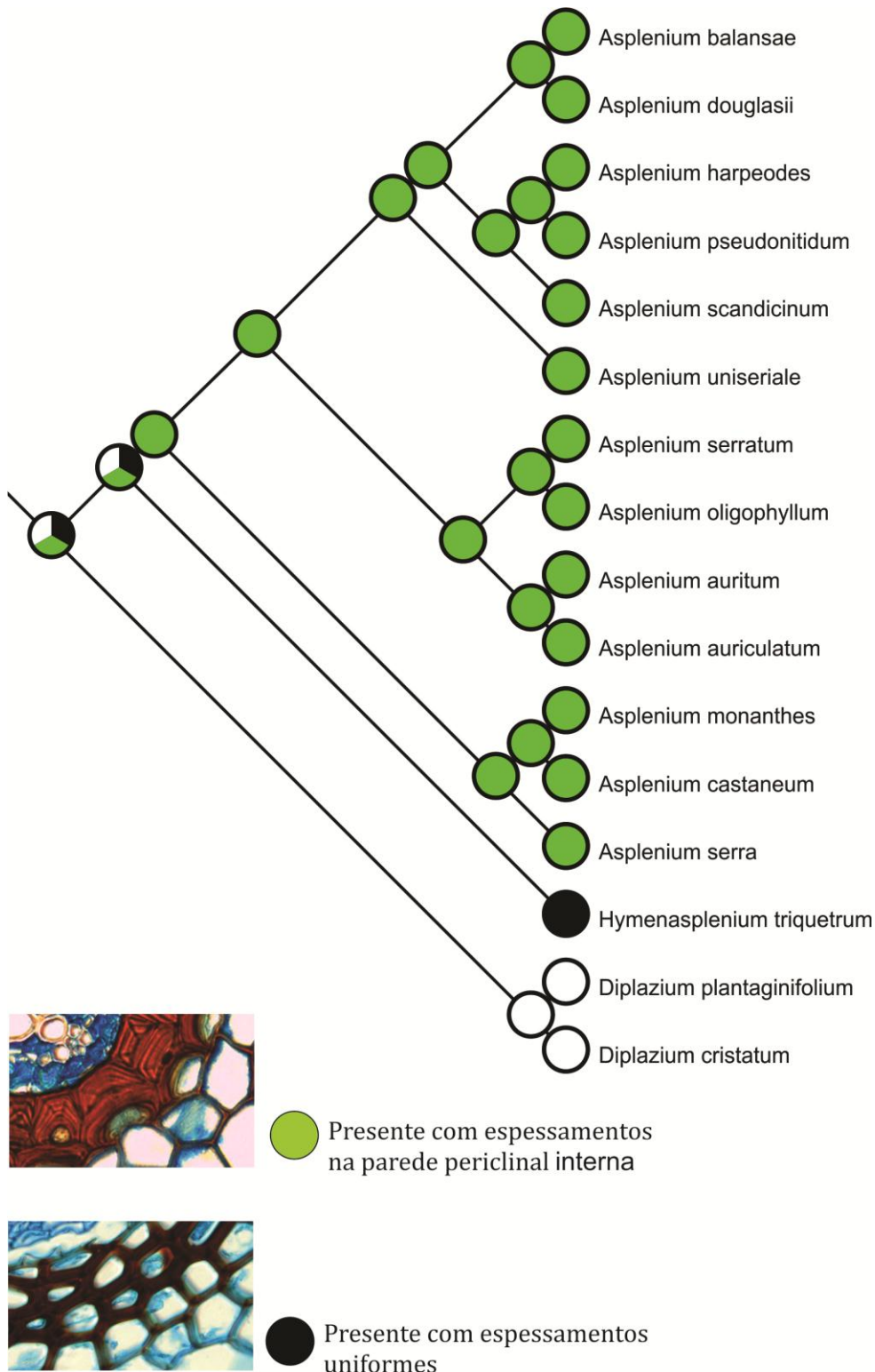


Figura 3. Evolução da ocorrência de esclereides ao redor da endoderme na raiz (caráter 4); micrografias em detalhe de *Asplenium uniseriale* e *Hymenasplenium triquetrum*. A presença de esclereides com espessamento na parede periclinal interna é uma sinapomorfia do gênero

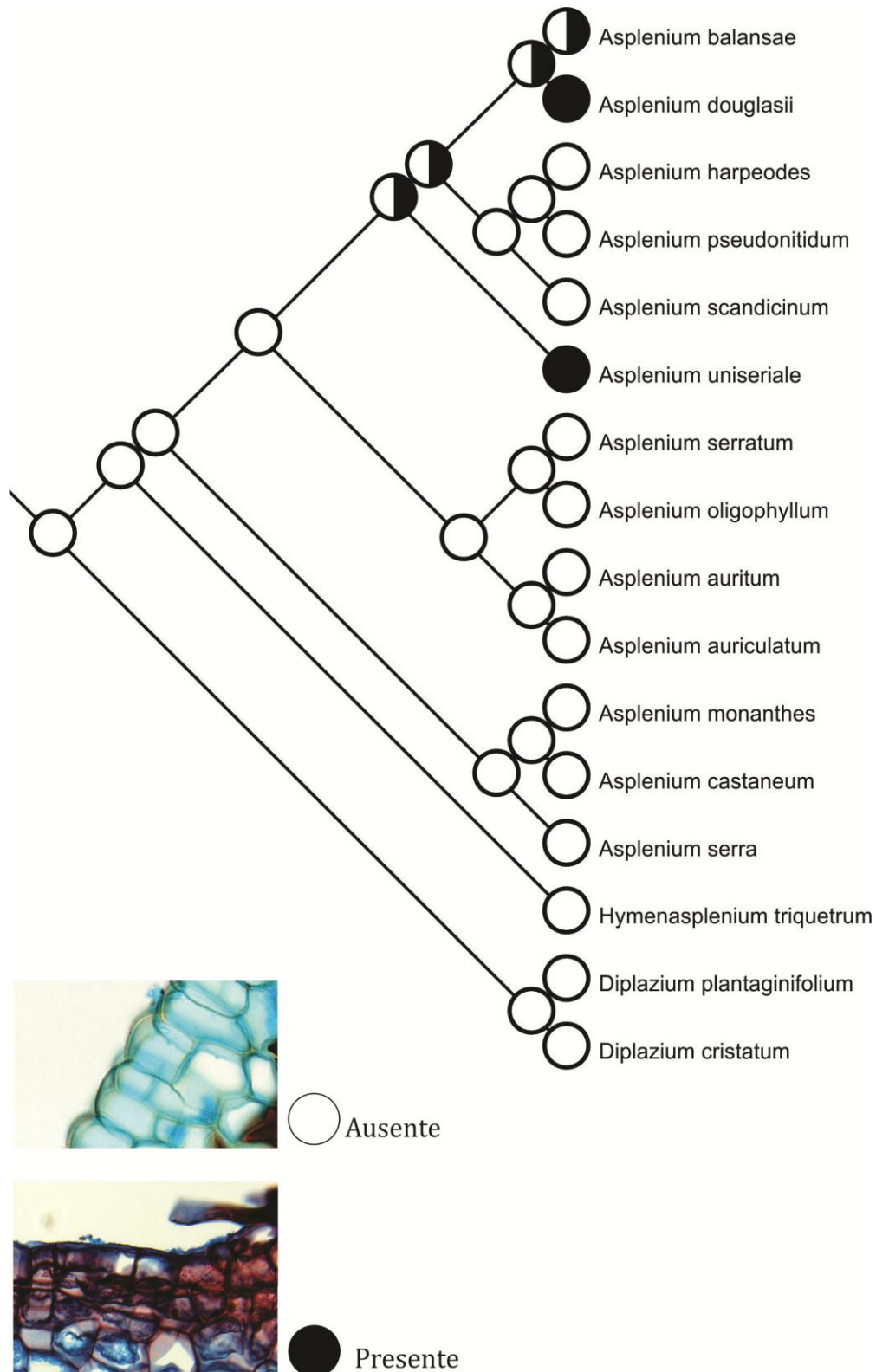


Figura 4. Ocorrência de tanino na epiderme do caule (caráter 5); micrografias em detalhe de *Asplenium monanthes*. e *Hymenasplenium triquetrum*.

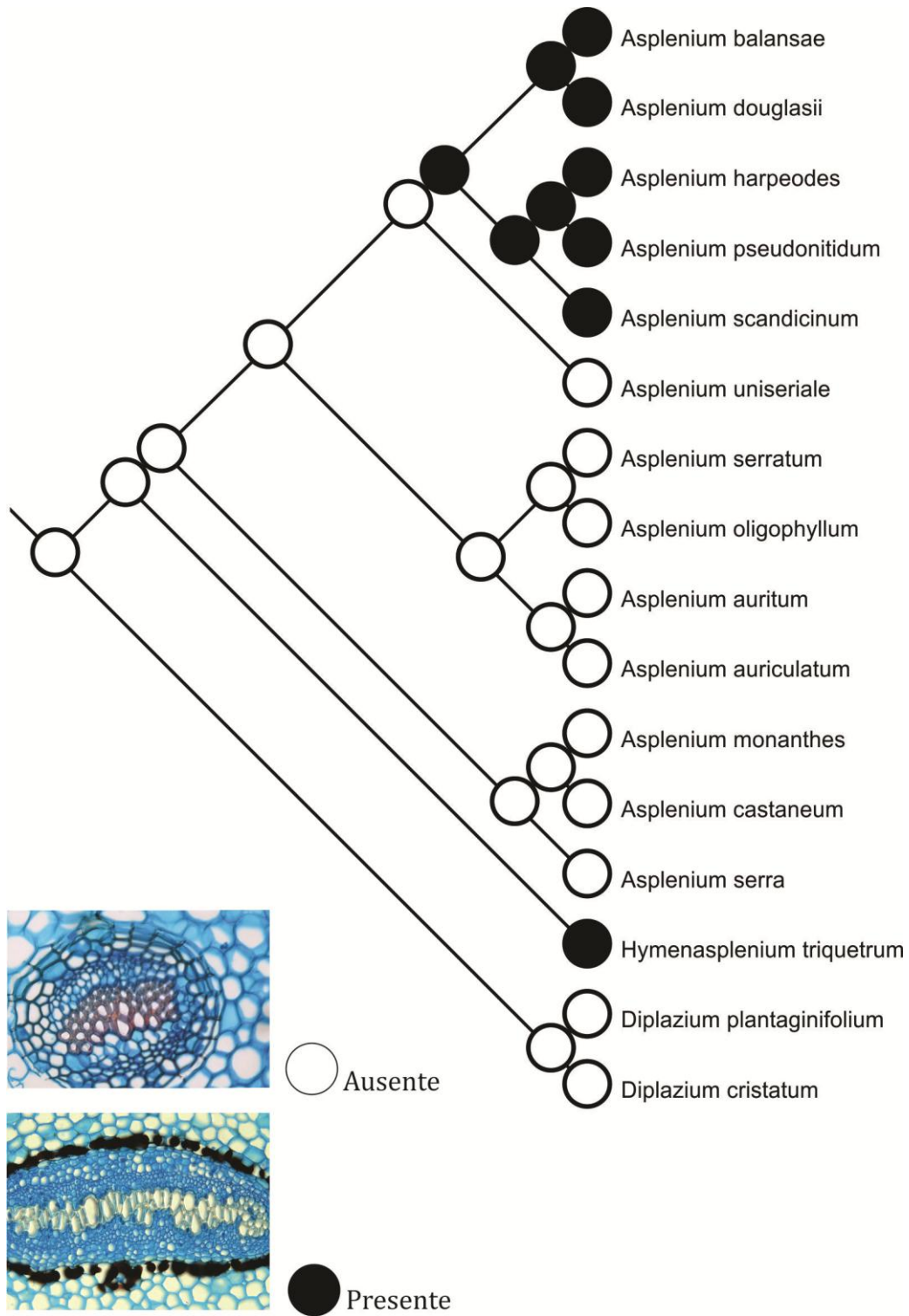


Figura 5. Ocorrência de banda circundodérmica no caule (caráter 6); micrografias em detalhe de *Asplenium monanthes* e *Hymenasplenium triquetrum*. *Hymenasplenium* e o clado 6 apresentam banda e o caráter surgiu independentemente duas vezes.

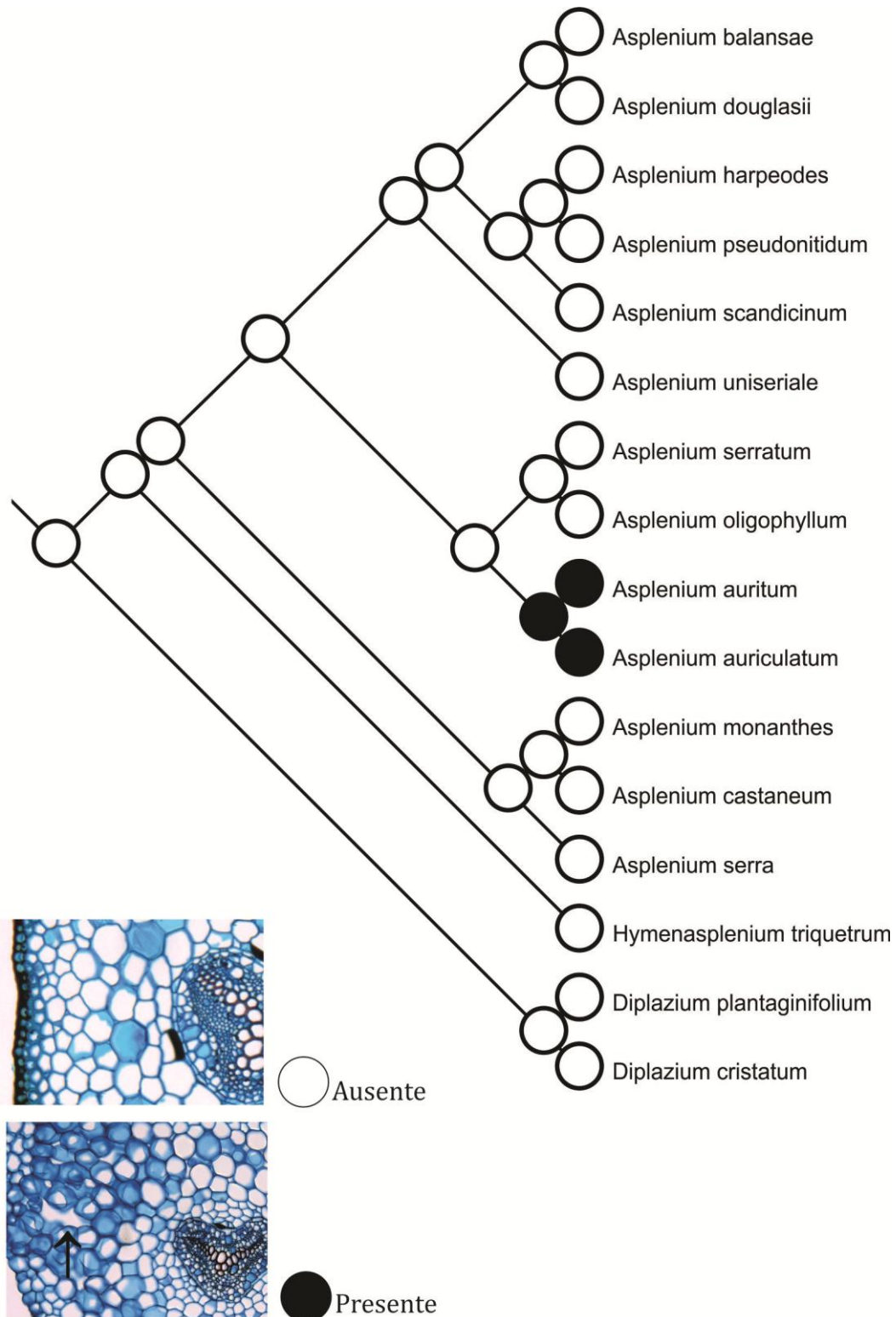


Figura 6. Ocorrência de linhas laterais no pecíolo (caráter 8); micrografias em detalhe de *Asplenium uniseriale* e *A. auriculatum*. A presença de linhas laterais é uma sinapomorfia do clado 21.

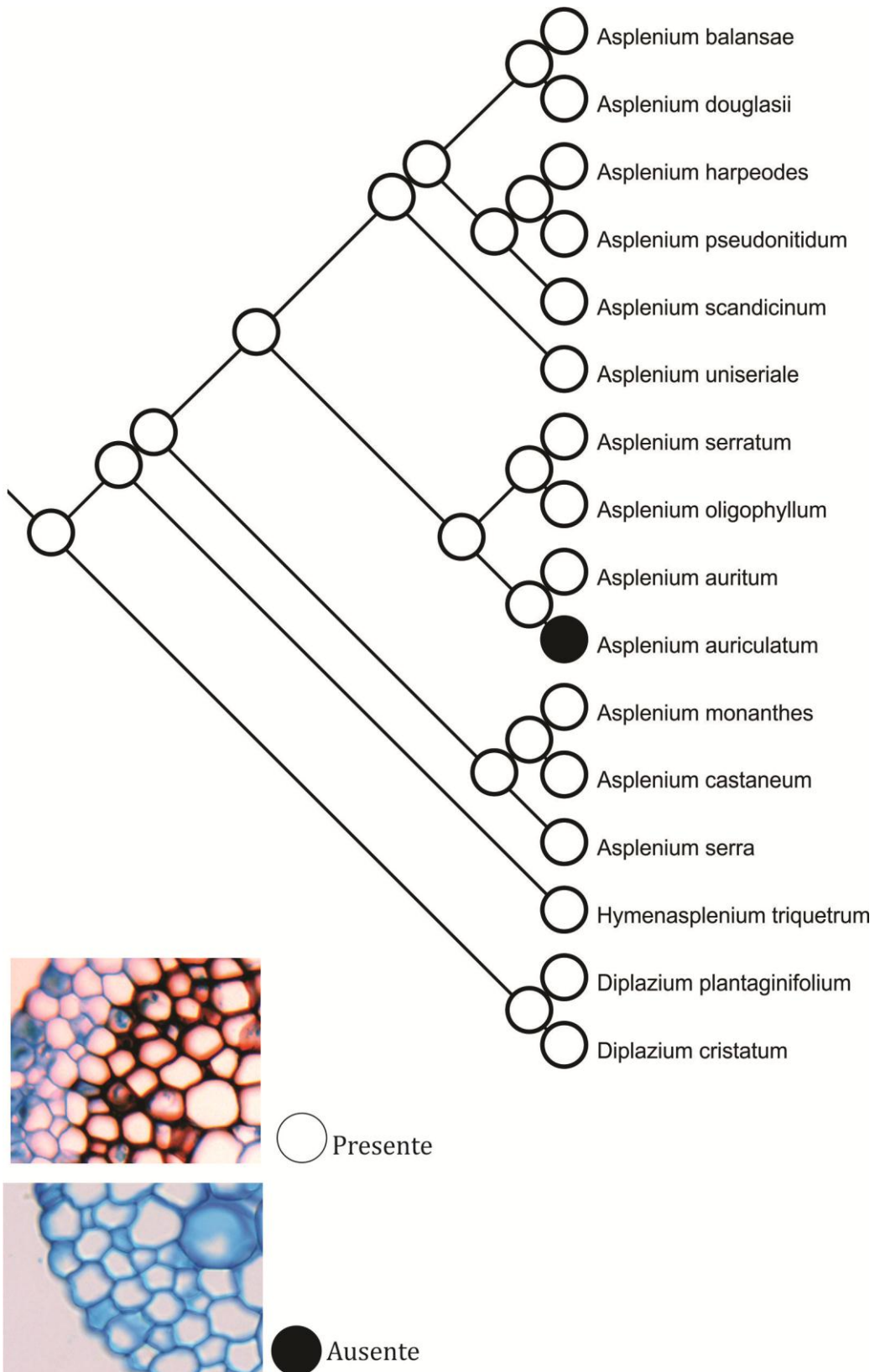


Figura 7. Ocorrência de camadas de esclerênquima no córtex externo (caráter 9); micrografias em detalhe de *Hymenasplenium triquetrum* e *Asplenium auriculatum*.

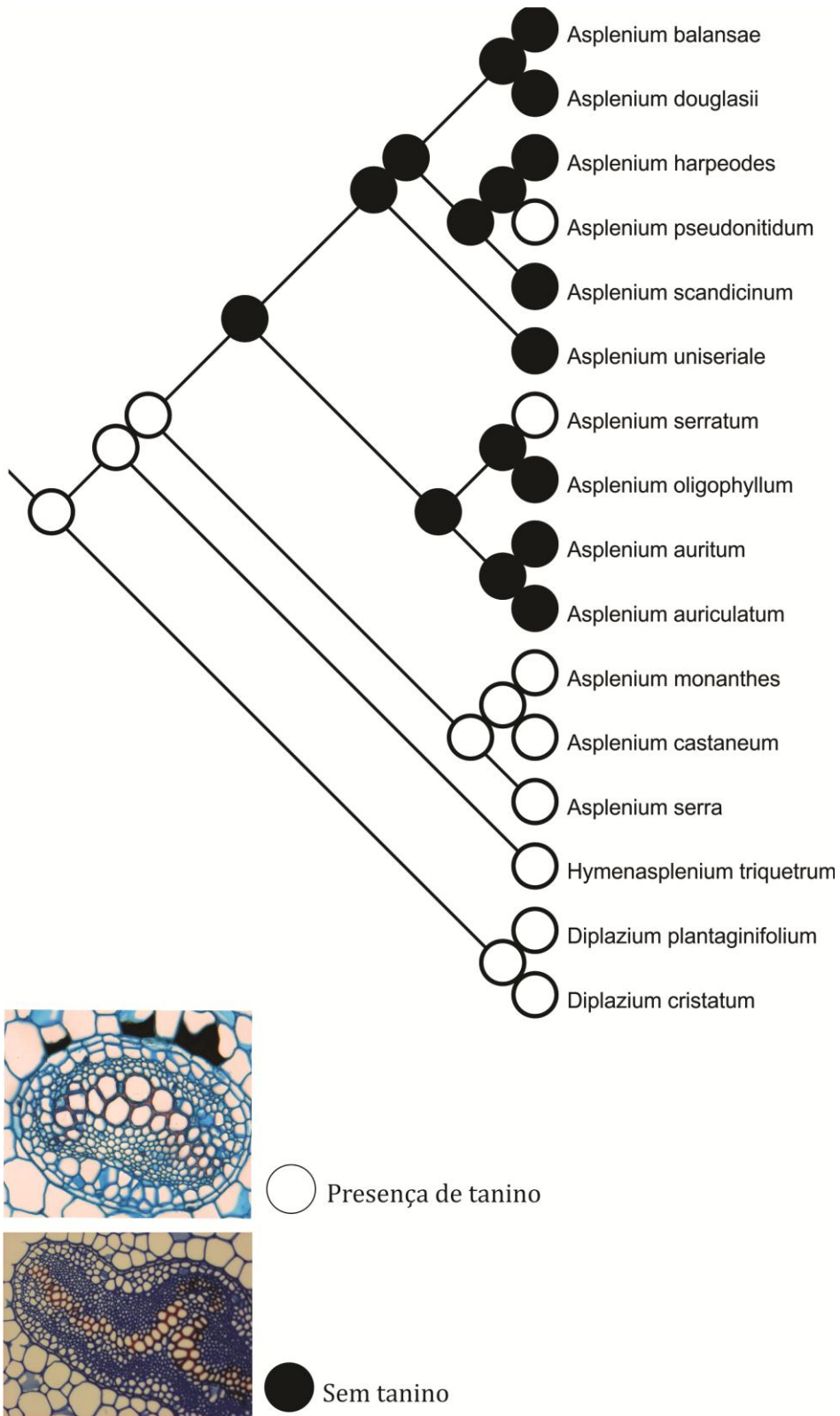
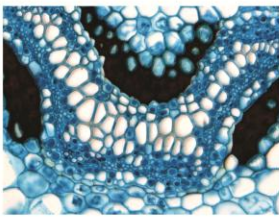
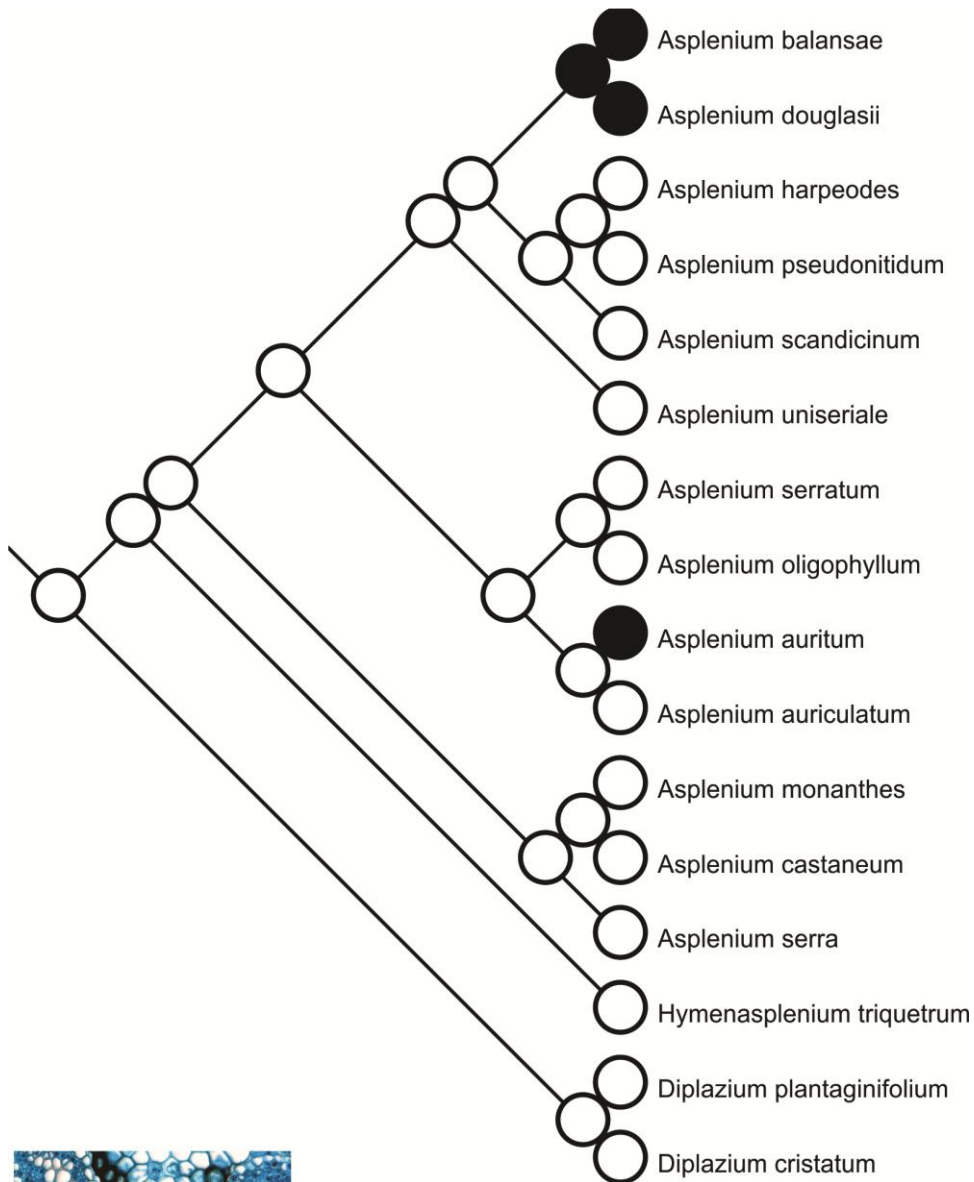
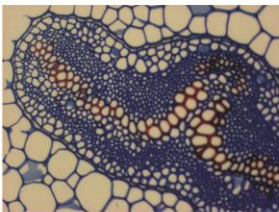


Figura 8. Ocorrência de tanino ao redor da endoderme no pecíolo (caráter 11); micrografias em detalhe de *Asplenium uniseriale* e *A. oligophyllum*. O caráter surgiu no clado 5.



○ Com células de parede espessada



● Sem células de parede espessa

Figura 9. Ocorrência de esclereídes ao redor da endoderme no pecíolo (caráter 11); micrografias em detalhe de *Asplenium auritum* e *A. oligophyllum*. O caráter surgiu independentemente duas vezes..

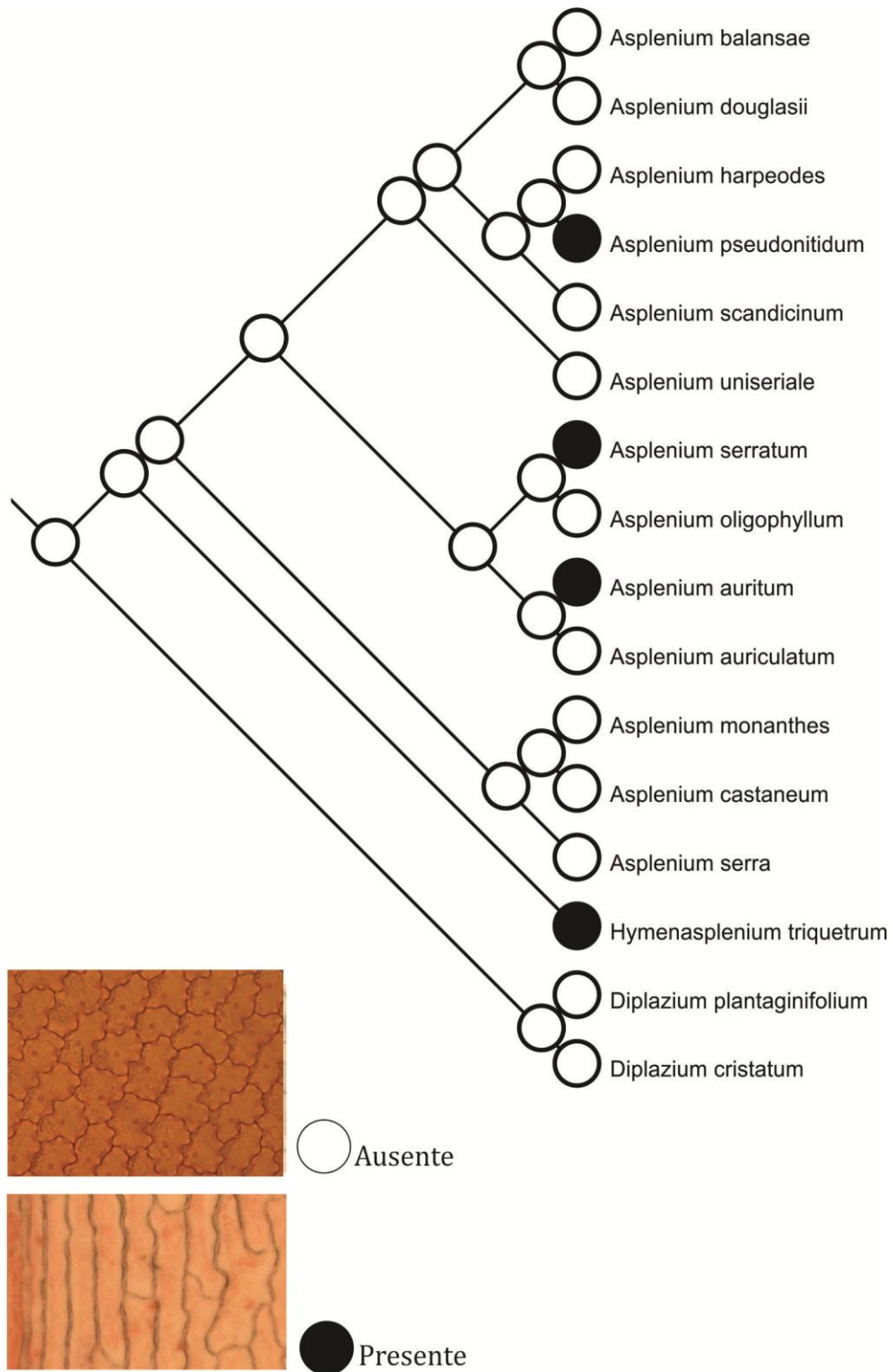


Figura 10. Ocorrência de células epidérmicas mais alongadas na região dos feixes da lâmina foliar (caráter 12); micrografias em detalhe de *Asplenium. balansae* e *A. auritum*

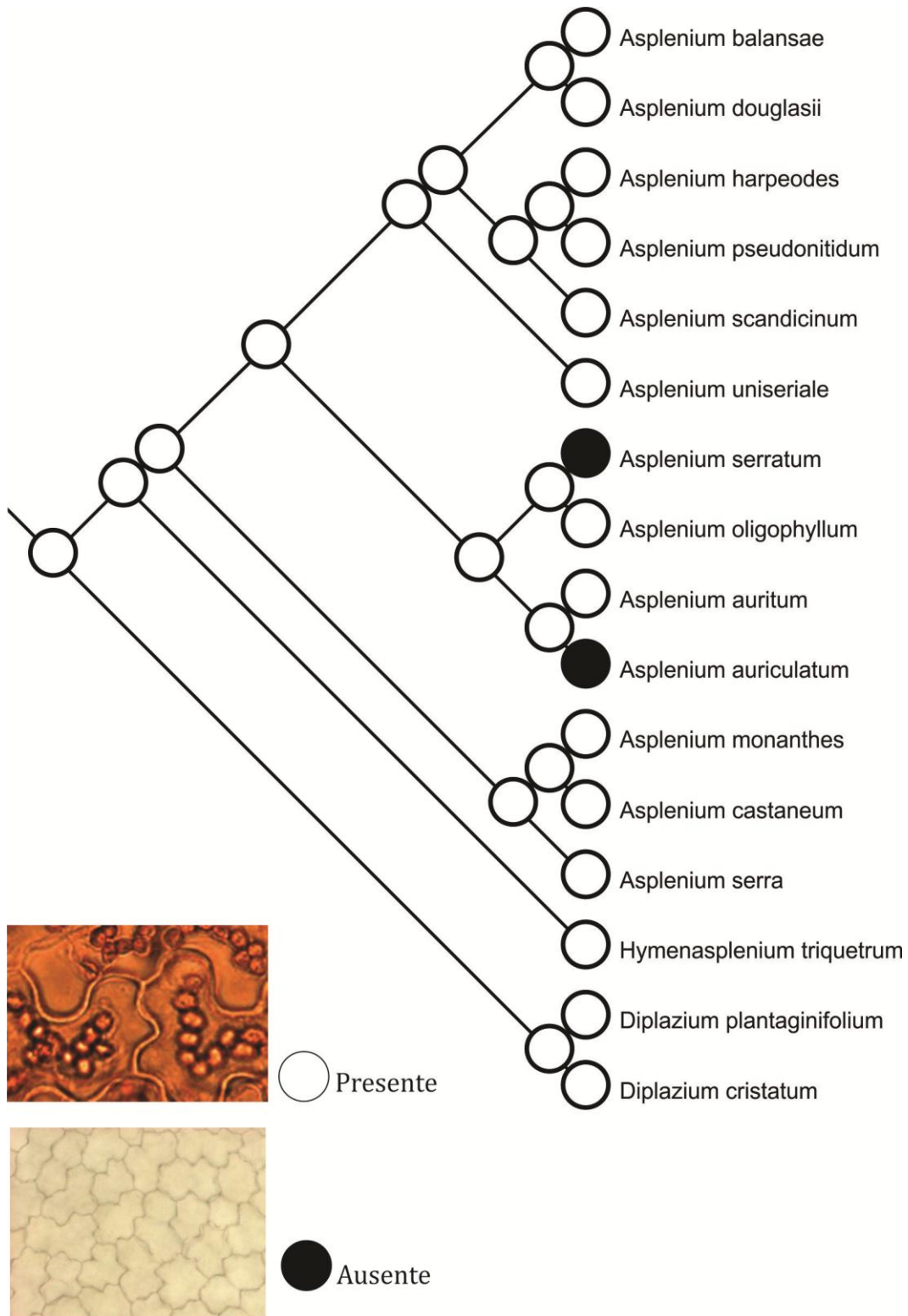


Figura 11. Cloroplastos nas células da epiderme da lâmina foliar (caráter 13); micrografias em detalhe de *Asplenium pseudonitidum* e *A. radiannum*. O caráter surgiu duas vezes no clado 17.

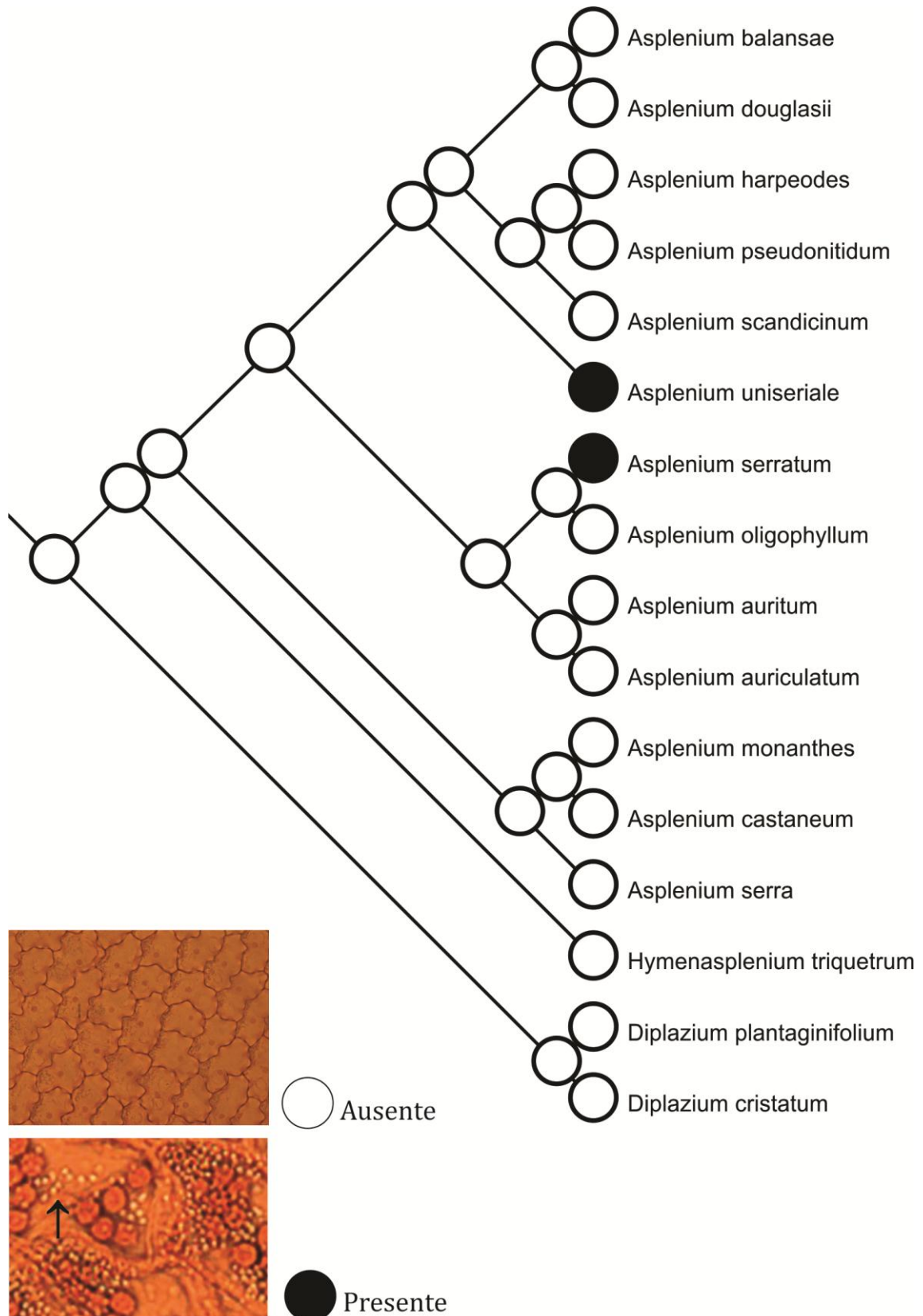


Figura 12. Ocorrência de pequenos cristais nas células da epiderme da lâmina foliar (caráter 15); micrografias em detalhe de *Asplenium balansae* e *A. unisseriale*.

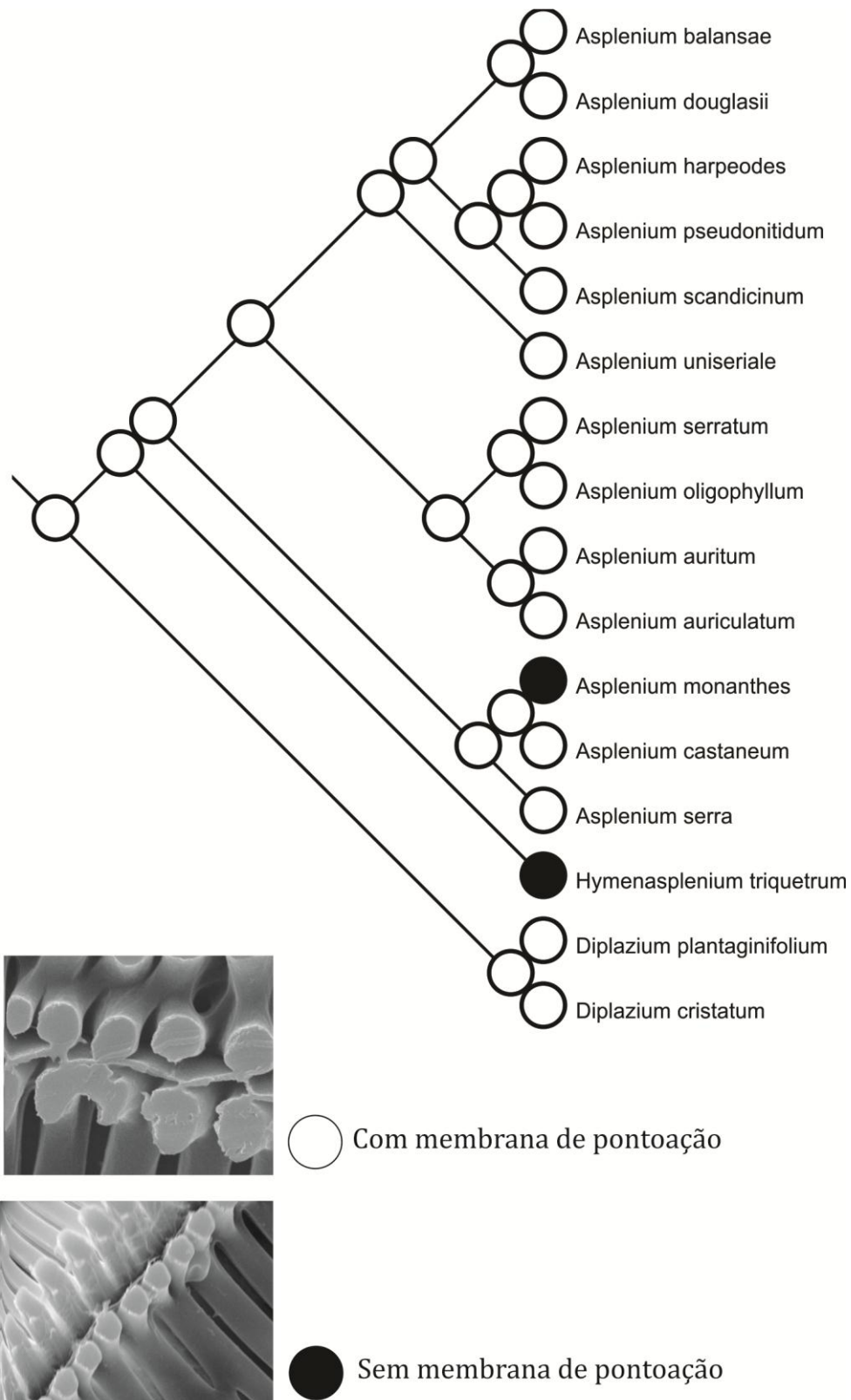


Figura 15. Mapeamento da presença de membrana de pontuação nas paredes terminais dos elementos traqueais (caráter 20): micrografias em detalhe de *Asplenium douglasii* e *A. monanthes*.

DISCUSSÃO

É comum encontrar na literatura dados que apontam a anatomia da folha como uma fonte de caracteres informativos para filogenia (Schuttpelz & Pryer, 2008). Para as samambaias um dos trabalhos mais significativos é o de Hernandez-Hernandez *et al.* (2012) que estudando a anatomia de 89 espécies concluíram que a reconstrução do estado ancestral das características anatômicas do pecíolo trouxeram grandes avanços para o entendimento da evolução das samambaias. De fato, no presente trabalho foi verificado que muitos dos caracteres anatômicos utilizados foram informativos. Além disso, é importante ressaltar o fato de que não somente a anatomia da folha gerou dados relevantes, mas também o caule e a raiz. Dessa forma se sugere que todos os órgãos do esporófito sejam explorados em trabalhos futuros.

A evolução da banda circueododérmica

Um dos caracteres que mais gerou informações foi a banda circueododérmica, uma camada com células de paredes espessadas ou impregnadas de tanino frequente em muitas famílias de samambaias.

Na raiz foi possível perceber que a presença de esclereides ao redor da endoderme é constante, como já havia sido demonstrado no trabalho de Schneider (2004), um dos poucos que utilizou o órgão como fonte de informação. No entanto, fica claro que a presença de células com paredes periclinais internas mais espessadas ao redor da endoderme não pode ser considerada uma sinapomorfia de Aspleniaceae, como apontava o autor, já que *Hymenasplenium* apresenta células com paredes igualmente espessadas. Fica evidente que a presença de banda circueododérmica com células desigualmente espessadas na raiz é uma sinapomorfia sim, mas não da família como se pensava e sim do gênero *Asplenium* sendo a condição mais derivada dentro da família.

No caule a banda circueododérmica aparece em *Hymenasplenium* e no clado 6. Vários terminais não apresentam a banda o que difere da raiz na qual todas as Aspleniaceae apresentam banda.

Diferentemente do observado na raiz e no caule, a presença de banda circueodérmica no pecíolo é constante (seja com conteúdo de tanino ou com células de paredes espessas) e foi perdida em apenas um dos terminais. Esse resultado se contrapõe ao observado por Hernandez-Hernandez *et al.* (2012) que apontaram a perda da banda circueodérmica em Aspleniaceae.

Dessa forma, no que se refere a banda circueodérmica, tanto na raiz quanto no pecíolo, os dados obtidos nesse trabalho se opuseram aos dados encontrados na literatura. Isso deixa clara a urgência de se analisar um número maior de espécies a fim de se ter um entendimento mais preciso sobre a evolução dos caracteres anatômicos.

Ainda sobre a banda circueodérmica do pecíolo foi possível observar no presente trabalho que a banda é descontínua em praticamente todas as espécies. Ao analisar esse caráter Hernandez-Hernandez *et al.* (2012) concluíram que a descontinuidade da banda circueodérmica não parece estar relacionada a ontogenia do pecíolo e como todos os estágios de contínua, descontínua até a perda total puderam ser observadas em Thelypteridaceae, a descontinuidade deve ser um estágio evolutivo transicional antes da perda secundária. De fato, ao se confrontar essa ideia com os dados obtidos é possível perceber a consonância nos resultados e concluir que a banda contínua é plesiomórfica. Nas espécies analisadas o grupo externo e *Hymenasplenium* (clado mais basal de Aspleniaceae) apresentam banda contínua e os demais terminais BC descontínua, com exceção de *A. oligophyllum* que não apresenta banda.

É importante destacar o fato de que a ocorrência da banda circueodérmica se mostrou ser independente entre os órgãos. Por exemplo, sua presença na raiz não implica que a mesma ocorrerá na folha da mesma espécie. Além disso, sua condição variou entre plesiomórfica e apomórfica entre os diferentes órgãos.

Sinapomorfias que reforçam grupos de afinidade

A presença de linhas laterais é uma sinapomorfia do clado que inclui *A. auritum* e *A. auriculatum*. Tal dado é interessante, pois as espécies já foram apontadas como integrantes de um grupo de afinidade morfológica por Sylvestre (2001) e também moleculares.

Regressões

Mutações deletérias não são raras e de acordo com Schneider (2009) muitas das linhagens derivadas, em samambaias são caracterizadas pela redução ou ausência de estruturas. Algumas regressões podem ser verificadas nas espécies analisadas.

A ausência de esclerênquima no córtex externo do pecíolo de *A. auriculatum* é um bom exemplo de mutação deletéria observada no presente trabalho. A perda do esclerênquima já foi observada também por Schneider (2009) que relatou o mesmo evento em Ophioglossiidae e Maratiidae.

Os espessamentos em hélice ocorrentes no córtex da raiz de *Asplenium* foram claramente perdidos. A característica não é observada no clado que incluía as espécies anteriormente agrupadas no gênero *Antigramma*(clado 8). Por isso o caráter é não somente uma regressão, mas também uma sinapormorfia do clado formado por tais plantas.

Os cloroplastos nas células epidérmicas da lâmina foliar também foram perdidos em dois terminais (*A. serratum* e *A. auriculatum*). A presença de cloroplastos na epiderme é bem característica de samambaias (Ogura 1972) e no presente trabalho é observada em todas as plantas de sombra. As plantas que perderam os cloroplastos da epiderme vivem sob luz intensa, o que ajuda a explicar essa regressão.

Surgimentos independentes

A membrana de pontoação sofreu intensa lise em duas espécies (*H. triquetrum* e *A. monanthes*). Tal característica surgiu independentemente nos dois terminais. Essa informação confirma o observado por Carlquist & Schneider (2001). Os autores acreditam que os elementos de vaso surgiram de forma independente já que o processo que leva a lise da membrana de pontoação é muito simples (camadas de celulose são retiradas com a ação da celulase e pectinase). Dessa forma, os resultados obtidos com a reconstrução dos estados ancestrais da membrana de pontoação ajudam a reforçar ainda mais a hipótese discutida no capítulo 2. Ou seja, o ambiente tem muita influência sobre a espessura e lise da membrana de pontoação.

Além da membrana de pontuação, outras características também surgiram de forma independente: pequenos cristais nas células da epiderme, ráfides e células mais alongadas na região dos feixes. Todas esses surgimentos ocorrem na folha que é sabidamente o órgão mais plástico da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARLQUIST, S. & SCNEIDER, E. L. 2001. Vessels in ferns: structural, ecological, and evolutionary significance. *Am. J. of Bot.* 8: 1-13.
- CATAI, M. B. 2007. Anatomia em Velloziaceae: caracteres, evolução e filogenia. Dissertação apresentada à Universidade de São Paulo. 67 páginas.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, D.J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- GUINDON, S.; DUFAYARD, J. F.; LEFORT., V., ANISIMOVA, A., HORDIJK, W. & GASCUEL, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies. *Systematic Biology* 59 (3): 307-321.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95 98 NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- HERNANDES- HERNANDEZ, V., TERRAZAS, T., MEHLTRETER K. & ANGELES G. 2012. Studies of petiolar anatomy in ferns: structural diversity and systematic significance of the circundodermal band. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169, 596-610.
- MADISON, W. P. & MADISON, D. R. 2015. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.02. <http://mesquiteproject.org>.
- MURAKAMI N. S., YOKOYAMA X. CHENG H. IWASAKI R. IMAICHI K. IWATSUKI 1998. Molecular α -taxonomy of *Hymenasplenium obliquissimum* complex (Aspleniaceae) based on rbcL sequence comparisons. *Plant Species Biology*13: 51-56.
- MURAKAMI N. S. NOGAMI M. WATANABE K. IWATSUKI 1999a. Phylogeny of Aspleniaceae inferred from rbcL nucleotide sequences. *American Fern Journal*89: 232-243
- NOGUERA-SAVELLI, E. & D. JÁUREGUI. 2011. Anatomía foliar Comparada y relaciones filogenéticas de 11 especies de Laeliinae con énfasis en *Brassavola* (Orchidaceae). *Rev. Biol. Trop.* 59: 1047-1059.
- SARAIVA, D. P. 2013. Filogenia morfológica de *Pticairnia* L'Her (Bromeliaceae-Pticainioideae). Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 94 páginas

- SCHNEIDER, H., SMITH, A. R. PRYER, K. 2009. Is morphology really at odds with molecules in estimating fern phylogeny. *Systematic Botany* 34 (3), p 455-475.
- SCHNEIDER, H., S. J., COX, C. J., BAKKER, F., HENDERSON, S., RUMSEY, F., BARRET, J., GIBBY, M. e VOGEL, J. C. 2004. Chloroplast phylogeny of Asplenoid ferns based on rbcL and trnL-F spacer sequences (Polypodiidae, Aspleniaceae) and its implications for Biogeography. *Scientific Botany* 29 (2) 260-274
- SCHULZE, G., J. TREUTLEIN, and M. WENK. 2001. Phylogenetic relationship between *Asplenium bourgaei* (Boiss.) Milde and *A. jahandiezii* (Litard) Bory inferred for morphological characters and rbcL sequences. *Plant Biology* 3: 364–371.
- SCHUTPELLZ, E. & PRYER, K. M. 2008. Fern phylogeny. In: HAUKER, T. A. & HAUFLE, C. M. (eds.). *The biology and evolution of ferns and Lycophytes*. Cambridge Univ. Press Pp.395-416.
- VAN DEN HEEDE, C. J., R. L. L. VIANE, and M. W. CHASE. 2003. Phylogenetic analysis of *Asplenium* subgenus *Ceterach* (Pteridophyta: Aspleniaceae) based on plastid and nuclear ribosomal ITS DNA sequences. *American Journal of Botany* 90: 481–495.
- VOGEL, J. C., S. J. RUSSELL, S. A. BARRETT, and M. GIBBY. 1996. A noncoding region of chloroplast DNA as a tool to investigate reticulate evolution in European ASPLENIUM. Pp. 313–327 IN PTERIDOLOGY IN PERSPECTIVE, EDS. J. M. CAMUS, R. J. JOHNS, AND M. GIBBY. KEW: ROYAL BOTANIC GARDENS.

CONCLUSÕES GERAIS

1. A presença de células de parede periclinal interna espessa circundando a endoderme na raiz não pode ser considerada uma sinapomorfia da família Aspleniaceae como proposto por Schneider (2004), mas pode ser considerada uma sinapomorfia do gênero *Asplenium*.
2. Apesar de a anatomia do pecíolo ter se mostrado bastante útil no que se refere à exploração de caracteres informativos o presente trabalho demonstrou que outros órgãos como a raiz e o caule também geram dados relevantes e devem ser mais explorados em trabalhos futuros.
3. Caracteres anatômicos da raiz e caule, como a bainha circundodérmica da raiz e a configuração dos meristelos do caule, mostraram-se úteis para confirmar a segregação dos dois gêneros de Aspleniaceae. Enquanto a anatomia da folha revelou muitas características diagnósticas para as espécies (ex: tricomas, cristais nas células da epiderme, configuração do xilema na região distal do pecíolo).
4. Os elementos traqueais de Aspleniaceae variam muito pouco no que se refere a tamanho da célula e formato das pontoações. As células são sempre alongadas, com paredes laterais escalariformes, e paredes terminais oblíquas.. As células condutoras sempre ocorrem agrupadas com as faces laterais em contato com a de outras células condutoras.
5. A presença de membrana de pontoação nas paredes terminais das células variou entre as espécies e dessa forma podem ser encontrados traqueídes e elementos de vaso.
6. A espessura das membranas de pontoação parece ter relação com o ambiente em que a planta ocorre e não com seu habitat.

-
7. Os caracteres anatômicos incluídos na filogenia, como a configuração do xilema e a bainha circundodérmica da raiz, caule e folha de Aspleniaceae mostraram-se informativos.

 8. Algumas características como a presença de células mais alongadas na região dos feixes parecem ter surgido independentemente em vários momentos distintos da evolução do grupo

BIBLIOGRAFIA GERAL

- APOSTOLAKOS, P. & GALATIS, B. 1999. Microtubule and actin filament organization during stomatal morphogenesis in the fern *Asplenium nidus*. II. Guard cells. *New Phytol.* 141: 209-223.
- BARROS, I. C. L, SILVA, M. B. C. 1996. Taxonomia, padrão de venação e aparelhos estomáticos de *Pteris schwackeana* Chris. (Pteridophyta, Pteridaceae). *Bol. Soc. Brot.* 67: 257-262.
- BECK, C. B., SCHMID, R. e RODWELL, G. W. 1982. Stellar morphology and the primary vascular system of seed plants. *Botanical Review* 48:691-816.
- BERCU, R. 2005. Contribution to the anatomy of *Asplenium ruta-muraria*. *Studia bot. hung* 36: 13-20.
- BERCU, R. 2007. On the anatomy of the endangered plant species *Asplenium lepidum* (Aspleniaceae). *Studia bot. hung* 38:125-131.
- BOODLE, F. L. S. 1901. Comparative anatomy of the Hymenophyllaceae, Schizaeaceae and Gleicheniaceae. *Am. Bot.* 15: 351-421.
- BUKATSH A. 1972. Bemerkungen zur Doppel farburng Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61:255
- CARLQUIST, S. 1975. Ecological strategies of xylem evolution. University of California Press, Berkley, California, USA.
- CARLQUIST, S. 1992. Pit membrane remnants in perforation plates of primitive dicotyledons and their significance. *Am. J. of Bot.* 79: 666-672.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L 1997a. SEM studies on vessel in ferns.2. *Pteridium*. *Am. J. of Bot.*84: 581-587.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L 1997b. SEM studies on vessel in ferns. 4. *Astrolepsis*. *Am. fern J.* 87: 43-50.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 1997c. SEM studies on vessels in ferns. 1. *Woodsia obtusa*. *Am. Fern J.* 87:1-8.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L 1998a. Origin and nature of vessels in monocotyledons. 5. Araceae family Colocasioidae. *Bot. J.Linne.Soc.* 128: 71-86.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L 1998b. SEM studies on vessel in ferns. 6. *Woodsia ilvensis*, with comments on vessel origin in ferns *Flora* 193: 179-185.

- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 1998c. SEM studies on vessel in ferns. 10. Selected Osmudaceae and Schizaeaceae. *Int. J. of Plant Sci.* 159:788-797.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 1999. Marratiaceae, with comments on vessel patterns in eusporangiate ferns. *Am. J. of Bot.* 86:457-464.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 1999b. SEM studies on vessels in ferns. 8. *Platyzoma*, *Aust. J. of Bot.* 47:277-282.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 2000a. SEM studies of vessel in ferns. 14. *Ceratopteris*. *Aquatic Bot.* 66:1-8.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 2000b. SEM studies on Vessels in Ferns. 16. Pacific Tree Ferns (*Blechnaceae*, *Cyatheaceae*, *Dicksoniaceae*). *Pacific Sci.* 54: 75-86.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 2000c. SEM Studies on Vessels in Ferns. 18. Montane Cheilanthoid Ferns (*Pteridaceae*) of North America. *Aliso* 19: 31-39.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 2000d. SEM Studies on Vessels in Ferns. 20. Hawaiian Hymenophyllaceae. *Pacific Science* 54: 365-375.
- CARLQUIST, S. & SCHNEIDER, E. L. 2001. Vessels in ferns: structural, ecological, and evolutionay significance. *Am. J. of Bot.* 8: 1-13.
- CATAI, M. B. 2007. Anatomia em *Veloziaceae*: caracteres, evolução e filogenia. Dissertação apresentada à Universidade de São Paulo. 67 páginas.
- CHERLE, P. & VIANE, R. L.L. 2004. Leaf anatomy and the ocrrence of false veins in *Asplenium* (*Aspleniaceae*, *Pteridophyta*). *Bot. J. of the Linnean Soc.* 145: 187-194.
- CHOAT, B; COBB, A. R. & JANSEN, S. 2007. Structure and function of bordered pits: new discoveries and implications on whole-plant hydraulic function. *Tansley review. New phytologist* 177: 608-626.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, D.J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- ESAU, K. 1976. Anatomia das plantas com sementes. Edgard Blücher, São Paulo,
- FERRARI, F. B. 2009. Anatomia de espécies de *Aspleniaceae* Newman ocorrentes no Brasil: contribuições à taxonomia. Dissertação de mestrado, UFV.
- FRANKLIN, G.L. 1945. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resins composites, and a new macerating method for wood. *Nature*, 155: 51.

- GIFFORD, E. M. & FOSTER 1989. Morphology and evolution of vascular plants. W. H. Freeman, 626 p.
- GRAÇANO, D, AZEVEDO A.A. & PRADO, J. 2001. Anatomia foliar das espécies de Pteridaceae do Parque Estadual do Rio Doce (PERD)-MG. Revista Brasileira de Botânica., São Paulo, 24: 333-347.
- GUINDON, S.; DUFAYARD, J. F.; LEFORT., V., ANISIMOVA, A., HORDIJK, W. & GASCUEL, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies. Systematic Biology 59 (3): 307-321.
- GWYNNE-VAUGHAN. D. T. 1901. Observations on the anatomy of solenostelic ferns I. Loxsoma, Ann. of Bot. 15: 71-98.
- HACKE, U. G & SPERRY, J. S. 2001. Functional and ecological xylem anatomy. perspectives in plant acology, evolution and systematics. vol 4:87-115.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95 98 NT. Nucleic Acids Symposium Series 41:95-98.
- HAYATA, B., 1927. On the systematic importance of the stelar system in the Filicales I. Bot. Mag., Tokyo, 41: 697-174.
- HERNANDES- HERNANDEZ, V., TERRAZAS, T., MEHLTRETER K. & ANGELES G. 2012. Studies of petiolar anatomy in ferns: structural diversity and systematic significance of the circuendodermal band. Botanical Journal of the Linnean Society, 169, 596-610.
- KRAUS, J.E; MONTENEGRO, G. & KIM, A. J. 1993. Morphological studies on entomogenous stem galls of *Microgramma squamulosa* (Kauf.) Sota (Polypodiaceae). JENSEN 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. W. H. Freeman, San Francisco
- KRAMER, K. U., & R. L. L. VIANE. 1990. Aspleniaceae. In K. U. Kramer and P. S. Green [eds.], Pteridophytes and gymnosperms, 52–56. Springer- Verlag, Berlin, Germany
- KRAUS J. E.; ARDUIN, M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro: EDUR. 25p.
- IWATSUKI, K. & KATO, M. 1976. Evolution of fern leaves through fusion. Phytomorp. 26: 234-239.

- JENSEN 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. W. H. Freeman, San Francisco.
- JOHANSEN, D. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York-London, 52 p.
- LANGERON, M. 1949. Précis de microscopie. Masson, Paris.
- LANG, W. H. 1912. On the interpretation of the vascular anatomy of the Ophioglossaceae. Mem Proc. Manchester Lit. Philosophy society 56 (12): 1-15.
- LAVAELE, M.C E PRADA, C. 2007. Morfología del esporófito y el gametófito de *Asplenium dareoides* (Aspleniaceae, Pteridophyta). Darwiniana 45 (1).
- LEROUX, A. BAGNIEWSKA-ZADWORNA, S. K. RAMBE, J. P. KNOX, S. E. MARCUS, E. BELLFROID, D. STUBBE. CHABBERT, A. HHABRANT, M. CLAEYS & R. L. L. VIANE, 2011. Non-lignified helical cell wall thickenings in root cortical cells of Aspleniaceae (Polypodiales): histology and taxonomical significance. Annals of Botany 107: 195–207, 2011
- LEROUX, A. BAGNIEWSKA-ZADWORNA, J. P. KNOX, M. CLAEYS AND R. L. L. VIANE, 2011b. Ultrastructure and cell appositions in the roots of *Asplenium* (Polypodiales). Micron 42(8): 863-70.
- LIN, B. L. & DE VOL, C. E. 1977a. The use of stipe characters in ferns taxonomy. I. Taiwaniana 22: 91-99.
- LIU,H; WANG, Q. & TAYLOR, W 2006. Morphological and anatomical variation in sporophylles of *Isoetes sinensis* Palmer (Isoteaceae), an endangered quillwort in China. American Fern Journal 96 (3):67-74.
- LUCAS, J. A.. 2002. Plant pathology and plant interactions. Blacwell Publishing. Oxford UK.
- MADISON, W. P. & MADISON, D. R. 2015. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.02. <http://mesquiteproject.org>.
- MAZUNDAR, J. 2010. Phytoliths of pteridophytes. South African Journal of Botany 20p.
- MEYLAN, B. A., & BUTTERFIELD, B. G. 1978. The structure of New Zealand woods. DSIR. Bulletin 222. New Zealand Departament of Scientific and Industrial Research, Wellington, New Zealand.

- MICKEL, J. T. & LESTERN, N. R. 1967. Floating stomates (adetostomy) in ferns: distribution and ontogeny. *Am. J. of Bot.* 54 (9): 1181-1185.
- MITSUTA, S, KATO, M. & IWATSUKI, K. 1980. Stellar structure of Aspleniaceae. *Bot. Mag. Tokyo* 93:275-289.
- MURAKAMI N. S., YOKOYAMA X. CHENG H. IWASAKI R. IMAICHI K. IWATSUKI 1998. Molecular α -taxonomy of *Hymenasplenium obliquissimum* complex (Aspleniaceae) based on *rbcL* sequence comparisons. *Plant Species Biology* 13: 51-56.
- MURAKAMI N. S. NOGAMI M. WATANABE K. IWATSUKI 1999a. Phylogeny of Aspleniaceae inferred from *rbcL* nucleotide sequences. *American Fern Journal* 89: 232-243
- MURAKAMI N. S., YOKOYAMA X. CHENG H. IWASAKI R. IMAICHI K. IWATSUKI 1998. Molecular α -taxonomy of *Hymenasplenium obliquissimum* complex (Aspleniaceae) based on *rbcL* sequence comparisons. *Plant Species Biology* 13: 51-56.
- NAMBOODIRI, K. K. e BECK, C. B. 1968. A comparative study of the primary vascular system of conifers. III. Stellar evolution in Gymnosperms. *Amer. J. Bot.* 55: 464-472.
- NOGUERA-SAVELLI, E. & D. JÁUREGUI. 2011. Anatomía foliar Comparada y relaciones filogenéticas de 11 especies de Laeliinae con énfasis en *Brassavola* (Orchidaceae). *Rev. Biol. Trop.* 59: 1047-1059.
- OGURA, Y. 1972. Comparative anatomy of vegetative organs of the pteridophytes. Gebruder Borntraeger, Berlin.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER N. & MCCULLY, M. E. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.
- PERRIE, L. R & ROWNSEY, P.J. 2005. Insights into the biogeography and polyploidy evolution of New Zealand *Asplenium* from chloroplast DNA sequence data. *American Fern Journal* 95 (1): 1-21.
- PRADO, J. 1998. Pteridófitas do estado de São Paulo. Pp 47-61. In: C. E. M. Bicudo & G. J. Sheperd (eds), *Biodiversidade do Estado de São Paulo*. 2. Fungos macroscópicos & plantas. FAPESP, São Paulo.

- PRADO, J. & SYLVESTRE, L. DA S. 2014. Coords. Lista de espécies: samambaias e licófitas. In Forzza, R. C, org., *et al.* Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Catálogo de plantas e fungos do Brazil (on line).
- PESACRETA , T. C. , L. H. GROOM , & T. G. RIALS . 2005 . Atomic force microscopy of the intervessel pit membrane in the stem of *Sapium sebiferum* (Euphorbiaceae). *International Association of Wood Anatomists Journal* 26 : 397 – 426 .
- RIBEIRO, M.L.R. DA C., COSTA, C. G. & BARROS, C. F. 2007 a. Anatomia e micromorfologia foliar de duas espécies e de um híbrido de *Anemia* Sw. (Anemiaceae-Monilophyta). Dissertação de mestrado, UFRJ, 73p.
- RIBEIRO, M. L. R. da C., MORAES, M & SANTOS, M. G. 2007 b. Leaf anatomy of two *Anemia* SW. Species (Schizaeaceae- Pteridophyta) from a rocky outcrop in Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 30(4):695-702.
- RIBEIRO, M.L.R. DA C., SANTOS, M. G., COSTA, C. G & BARROS, C. F. 2011. Intraespecific variation in four distinct populations of *Anemia villosa* Humb. & Bonpl. ex. Willd (Anemiaceae) occurring in Rio de Janeiro, Brazil. *American Fern Journal* 101(2): 70-80
- ROÇAS, G., BARROS, C. F, SCARANO, F.R. 1997. Leaf anatomy plasticity of *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae) under distinct light regimes in a Brazilian montane Atlantic rain forest. *Trees* 11 (8): 469-473.
- ROLLERI, C., DEFERRI, A., LAVAELE., M DEL C., 1991. Epidermal morphology of the pinnae of *Angiopteris*, *Danaea*, and *Marattia*. *Am. Fern J.* 81 (2): 44-62.
- ROTHFELS, C. J.; SUNDUE, M. A.; KUO, L. Y.; LAISSON, A.; KATO, M.; SCHUTTPELZ, E. & PRYER, K. M. 2012. A revised family level classification for Eupolypo II ferns (Polypodiidae: Polypodiales). *Taxon* 61: 515-533.
- SARAIVA, D. P. 2013. Filogenia morfológica de *Pticairnia* L'Her (Bromeliaceae-Pticainioideae). Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 94 páginas
- SEN, U. & DE, B. 1992. Structure and ontogeny of stomata in ferns. *Blumea* 37: 239-261.
- SCHNEIDER, S.M 1993. "Plasticity as a selectable trait: reply to via, *American naturalist* 142: 371-373.

- SCHNEIDER, H. (1996): The root anatomy of ferns: a comparative study. Pteridology in perspective. -Royal Botanical Garden, Kew, pp. 271-283.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1997. SEM studies on vessels in ferns. 3. *Phlebodium* and *Polystichum*. Int. J. of Plant Sci. 1158: 343-349.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1998a. Origin and nature of vessels in monocotyledons. 4. Araceae subfamily Philodendroidae. Journal of the Torrey Bot. Soc. 125: 253-260.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1998b. SEM studies on vessels in ferns. 5. *Woodsia scopulina*. Am. Fern J. 88:17-23.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1998c. Sem studies on vessels in ferns. 7. *Microgramma nitida*. Ann. del Inst. Biol. de la Uni. Auton. de Méx. 69:1-7.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1998d. SEM studies on vessels in ferns. 9. *Dicranopteris* (Gleicheniaceae) and vessels patterns in leptosporangiate ferns. Am. J. of Bot. 85: 1028-1032.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1999a. SEM studies on vessels in ferns. 11. *Ophioglossum*. Bot. J. of the Linn. Soc. 129:105-114.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1999b. SEM studies on vessels in ferns. 13. *Nephrolepis* Am. Fern J. 89: 171-177.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 1999c. SEM studies on vessels in ferns.. 15. Selected rosette epiphytes Aspleniaceae, Elaphoglossaceae, Vittariaceae). Int. J. of Plant Sci. 160: 1013-1020.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 2000. SEM Studies on Vessels in Ferns. 17. Psilotaceae. Am. J. of Bot. 87:176-181.
- SCHNEIDER, E.L. & CARLQUIST, S. 2000. SEM Studies on Vessels in Ferns. 19. Marsilea. Am. Fern J. 90: 32-41.
- SCHNEIDER, H.; SCHUETTPPELZ, E; PRYER, K. M.; CRANFILL, R.; MAGALLON, S. & LUPIA, R. 2004a. Ferns diversified in the shadow of angiosperms. Nature 428: 553-557.
- SCHNEIDER, H., RUSSEL, S. J., COX, C. J., BAKKER, F., HENDERSON, S., RUMSEY, F., BARRET, J., GIBY, M. E VOGEL, J. C. 2004 b. Chloroplast phylogeny Asplenioid ferns based on rbcL and trnL-F spacer sequences (Polypodiidae, Aspleniaceae) and its implications for Biogeography. Scientific Botany 29 (2) 260-274.

- SCHLITING, C. D 1986. The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Ann. Rev. of Ecol. Syst.* 24:35-68.
- SCHMID, R. 1982. The terminology and classification of steles: historical perspective and the outlines of a system. *The Bot.Rev.* 48: 817-931.
- SCHULZE, G., J. TREUTLEIN, and M. WENK. 2001. Phylogenetic relationship between *Asplenium bourgaei* (Boiss.) Milde and *A. jahandiezii* (Litard) Bory inferred for morphological characters and rbcL sequences. *Plant Biology* 3: 364–371.
- SCHUTPELLZ, E. & PRYER, K. M. 2008. Fern phylogeny. In: HAUKER, T. A. & HAUFLE, C. M. (eds.). *The biology and evolution of ferns and Lycophytes*. Cambridge Univ. Press Pp.395-416.
- SHANE, M. W., M., MC CULLY & M. J. CANNY 2000. Architecture of branch-root junctions in maize: structure of the connecting xylem and the porosity of pit membranes. *Annals of botany* 85: 613-624.
- SMITH, A. R.; PRYER, K. M.; SCHUETTPELZ, E.; KORALL, P.; SCHNEIDER, M. & WOLF, P. G. 2006. A classification of extant ferns. *Taxon* 55: 705-731.
- SYLVESTRE, L.S. 2001. Revisão taxonômica das espécies da família Aspleniaceae A. B. Frank ocorrentes no Brasil. São Paulo: USP. 571p. Tese de doutorado.
- SUNDUE, M. 2009. Silica bodies and their systematic implications in Pteridaceae (Pteridophyta). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2009, 161, 422–435
- SUNDUE, M. & ROTHFELS, C. J. 2014. Stasis and convergence characterize morphological evolution in Eupolypod II ferns. *Annals of Botany* 113 (1): 35-54.
- TRYON, R. M. & TRYON, A. F. 1982. *Ferns and allied plants with special reference to Tropical America*. Springer-Verlag.
- UMIKALSON, Y. 1992. Anatomical studies of the Malasyan Aspleniaceae and Athyriaceae. *Bot. J. of the Linn. Soc.* 110: 111-119.
- VAN DEN HEEDE, C. J., R. L. L. VIANE, and M. W. CHASE. 2003. Phylogenetic analysis of *Asplenium* subgenus *Ceterach* (Pteridophyta: Aspleniaceae) based on plastid and nuclear ribosomal ITS DNA sequences. *American Journal of Botany* 90: 481–495.

- VASCO, A., ROBBIN, C. M., & AMBROSE, B. 2013. The evolution, morphology, and development of fern leaves. *Frontiers in Plant Science* 4:1-15.
- VILALTA, J. M., MENCUCCINI, M., ALVAREZ, X, CAMACHO, J. LOEPPE, L PINOL, J. 2012. Spatial distribution and packing of xylem conduits. *American Journal of Botany* 99 (7): 1189-1196.
- VOGEL, J. C, S. J. RUSSELL, S. A. BARRETT, and M. GIBBY. 1996. A noncoding region of chloroplast DNA as a tool to investigate reticulate evolution in European ASPLENIUM. Pp. 313–327 IN PTERIDOLOGY IN PERSPECTIVE, EDS. J. M. CAMUS, R. J. JOHNS, AND M.GIBBY. KEW: ROYAL BOTANIC GARDENS.
- WHITE, R.A., TURNER, M.D. 1995. Anatomy and development of the fern sporophyte. *The Bot. Ver.* 6 n4.
- WINDISCH, P. G. 2000. Pteridologia no Brasil no ano 2005: possíveis cenários P.p 122-125. *In: Tópicos Atuais em Botânica. Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia/ SBB, Brasília.*
- WOODCOCK, D. W, DOS SANTOS, G & REYNEL, C. 2000. Wood characteristics of Amazon forest types. *International association of Wood anatomists journal* 21 277-292.
- WYLIE, R. B. 1948. The dominant role of the epidermis in leaves of *Adiantum*. *Am. J of Bot*: 35: 465-47.
- ZIMMERMANN, M. H. 1983. Xylem structure and the ascent of sap. Springer, Berlin.
- ZWIENIECK, M. A, MELCHER, P. J & HOLBROOK, N. M. 2001. hydrogel control of xylem hydraulic resistance in plants. *Science* 291: 1059-1062.