



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Botânica

Projeto de Tese de Doutorado

**Sinopse taxonômica do gênero *Hymenophyllum* Sm.  
(Hymenophyllaceae, Filicopsida) no bioma Mata Atlântica e a filogenia  
de *Hymenophyllum* subgênero *Sphaerocionium***

Aluno: Felipe Gonzatti

Orientadora: Dra. Mara Rejane Ritter

Co-orientador: Dr. Paulo Günter Windisch

Porto Alegre, agosto de 2016

**RESUMO**

O gênero *Hymenophyllum* Sm. representa um gênero de samambaias de distribuição cosmopolita, sendo sua maior diversidade nas florestas tropicais e subtropicais do globo. Atualmente está dividido em 10 subgêneros, sendo que *Sphaerocionium* é o subgênero com maior riqueza de espécies na região neotropical, e o único que apresenta endemismos no Brasil. A Mata Atlântica constitui um dos grandes centros de diversidade e endemismos de samambaias e licófitas da região Neotropical, e neste bioma, o gênero apresenta seis espécies endêmicas, todas pertencentes ao subgênero *Sphaerocionium*. A delimitação dos táxons de *Hymenophyllum* neotropicais ainda são obscuras, devido à falta de estudos taxonômicos e de distribuição geográfica além de não serem inclusas nas abordagens filogenéticas atuais. Portanto, o presente projeto objetiva realizar uma revisão acerca das espécies do gênero *Hymenophyllum* ocorrentes no bioma Mata Atlântica, por meio de um estudo florístico/taxonômico e filogenético. Para isto, serão realizadas coletas de material botânico nas diferentes regiões do país, revisões de coleções de herbário, análise morfológica dos espécimes através de microscopia óptica e de varredura. A análise molecular servirá para estabelecer as relações filogenéticas das espécies do subgênero *Sphaerocionium* ocorrentes na área de

estudo, com a utilização dos marcadores plastidiais *rbcl*, *rps4-trnS* e *rps4*. Como resultados esperados estão: a delimitação dos táxons da flora brasileira, o detalhamento de novos caracteres morfológicos e o esclarecimento de complexos de espécies do subgênero *Sphaerocionium* presentes na área de estudo.

#### **PALAVRAS-CHAVE:**

Taxonomia, sistemática, samambaias, endemismos

#### **INTRODUÇÃO**

Hymenophyllaceae compreende cerca de 800 espécies distribuídas nas florestas tropicais úmidas com poucos representantes nas regiões temperadas (Iwatsuki 1984). Sua distribuição está relacionada predominantemente aos ambientes florestais, nebulares, entornos de cachoeiras e sobre rochas úmidas ao longo de riachos (Ebihara *et al.* 2007). Sua morfologia é distinta dentre as samambaias, pois quase todas as espécies apresentam uma única camada de células de espessura no tecido laminar de suas frondes (vide p.ex. Iwatsuki 1990), o que lhe atribui o nome “filmyfern” em inglês. Esta característica, juntamente com soros marginais em forma de invólucro tubular (sino) ou bivalvo e esporângios com anel oblíquo em relação ao receptáculo são diagnósticas e colocam as Hymenophyllaceae como grupo monofilético (Tryon & Stolze 1989, Pryer *et al.* 2001). Outras características importantes podem descrever o grupo como: rizomas

delgados, ou às vezes ereto e robusto, vernação circinada, ausência de estômatos, ausência de cutícula ou então está muito reduzida, geralmente sem escamas nas frondes, indumento muitas vezes composto de tricomas, esporos clorofilados, tríletes, gametófitos filamentosos, muitas vezes com reprodução vegetativa (Smith *et al.* 2006).

O entendimento da família como um grupo monofilético é atualmente amplamente aceito (Pryer *et al.* 2001, Smith *et al.* 2006, Ebihara *et al.* 2006, Christenhusz & Chase 2014), porém, a delimitação dos gêneros dentro da família já sofreu distintas alterações ao longo do tempo, com propostas variadas quanto à circunscrição dos grupos (Ebihara *et al.* 2006, Windisch 2014). Tradicionalmente dois grandes gêneros são reconhecidos (*Hymenophyllum* Sm. e *Trichomanes* L.) e aceitos até hoje por muitos autores como: Smith (1793), Tryon & Tryon (1982), Pryer *et al.* (2001) e Christenhusz & Chase (2014). Esta compreensão baseou-se nas diferenças na morfologia dos soros que são em forma de sino no gênero *Trichomanes* ou bivalvo no gênero *Hymenophyllum*, e também por análises moleculares que sustentam estas duas linhagens evolutivas (Pryer *et al.* 2001). No entanto, ao longo do tempo, muitos autores criaram distintos gêneros para acomodar as espécies de Hymenophyllaceae e tentar definir grupos mais homogêneos e de origem natural. Autores como Presl (1843), Bosch (1858), Prantl (1875), Smith (1875), Christensen (1938), Copeland (1933, 1938, 1947), Morton (1968), Pichi-Sermolli (1977), Iwatsuki (1984, 1985, 1990) segregaram a família em um número de gêneros variando de dois até 42. Recentemente, estudos filogenéticos permitiram uma melhor compreensão quanto as relações evolutivas entre os diferentes grupos de espécies tanto das plantas vasculares sem sementes (tradicionalmente tratadas como pteridófitas e plantas afins) como também na definição de famílias e gêneros em Hymenophyllaceae (Windisch 2014). Nesta abordagem, autores como Dubuisson *et al.* (2003), Hennequin *et al.* (2003), Ebihara *et al.* (2006), Hennequin *et al.* (2006) e Ebihara *et al.* (2007), tem trabalhado com análises dos genes *rbcL* para delimitar, em conjunto com caracteres morfológicos, gêneros monofiléticos. Uma proposta para a divisão da família em nove gêneros foi apresentada por Ebihara *et al.* (2006) onde foram mantidas as espécies de morfologia “himenofilóide” em um único gênero (*Hymenophyllum*) e as demais “tricomanióides” segregados em oito gêneros distintos: *Didymoglossum* Desv., *Crepidomanes* C.Presl, *Polyphlebium* Copel., *Vandenboschia* Copel., *Trichomanes* L., *Abrodictyum* C.Presl, *Cephalomanes* C.Presl e *Callistopteris* Copel.

O gênero *Hymenophyllum* compreende cerca de 250 espécies distribuídas em todo o mundo (Ebihara *et al.* 2006). Recentemente os estudos filogenéticos com o gênero, utilizando os marcadores *rbcL*, *rps4-trnS* e *rps4*, têm revelado a história evolutiva deste grupo (Pryer *et al.* 2001, Hennequin 2003, Hennequin *et al.* 2010). Ebihara *et al.* (2006) propuseram uma divisão no gênero em 10 subgêneros, com base em análises filogenéticas e morfológicas, sendo: *Cardiomanes* (monotípico da Nova Zelândia), *Diploöphyllum* (monotípico da Nova Zelândia), *Fuciformia* (duas espécies distribuídas no sul do Chile e Nova Zelândia), *Pleuromanens* (cerca de cinco espécies distribuídas no paleotrópico, especialmente na região do Pacífico), não representados na flora brasileira. Os subgêneros *Hymenophyllum* (cerca de 100 espécies de distribuição cosmopolita), *Mecodium* (cerca de 35 espécies e distribuição cosmopolita), *Globosa* (cerca de 25 espécies, distribuição na Ásia e Pacífico com apenas uma espécie na América), *Hymenoglossum* (três espécies conhecidas, ocorrendo no centro e sul da América e Madagascar), *Myrmecostylum* (oito espécies conhecidas, distribuídas no sul da América, Nova Zelândia e Nova Caledônia) e, *Sphaerocionium* (cerca de 70 espécies, distribuição cosmopolita com maior diversidade no Neotrópico) apresentam ocorrência no Brasil.

O subgênero *Sphaerocionium* é distinto entre os demais subgêneros por apresentar em suas frondes, complexos, e variados padrões de indumento, que vão desde tricomas simples até duas ou três vezes decompostos. Este indumento pode estar distribuído amplamente sobre a superfície da lâmina foliar ou restrito às nervuras e bordos das lâminas. Estes padrões de indumento distintos levaram Morton (1947) dividir o subgênero em duas categorias informais: uma denominada *Lanata* (indumento distribuído sobre toda a lâmina foliar) e outra denominada *Ciliata* (tricomas restritos aos bordos da lâmina e nervuras).

*Sphaerocionium* é um subgênero bastante heterogêneo morfológicamente. Apesar de apresentar tricomas estrelados como sinapomorfia para o subgênero, algumas espécies variam quanto aos caracteres comuns aos demais táxons do grupo. O formato dos indúsios semitubulares e a presença de tricomas simples em algumas espécies têm gerado muitas dúvidas quanto o posicionamento destes táxons, o que ocasionou a segregação destes morfotipos, atualmente consideradas como *Sphaerocionium*, em um subgênero específico chamado *Microtrichomanes*. Alguns autores, inclusive posicionaram estas espécies no gênero *Trichomanes*. O conceito atualmente aceito, de *Sphaerocionium* s.l., como grupo monofilético inclui as espécies anteriormente

consideradas como *Microtrichomanes* de distribuição paleotropical e as demais classicamente posicionadas em *Sphaerocionium* que possui distribuição principalmente no neotrópico e no velho mundo (Hennequin *et al.* 2006).

Caracteres comumente usados na delimitação das espécies de *Hymenophyllum* em geral são baseados na morfologia vegetativa das frondes, a qual inclui a presença ou ausência de tricomas simples ou estrelados, padrões de segmentação da lâmina, presença ou ausência de alas nos pecíolos e raque, forma e padrão de recorte dos bordos da lâmina e dos indúsios, dentre outras (Morton 1947, Sehnem 1971, Iwatsuki 1984, Lellinger 1984, Larsen *et al.* 2013, Windisch 2014). No subgênero *Sphaerocionium*, Morton (1947) atribuiu grande importância à variação dos padrões de indumento e segmentação da fronde como caracteres diagnósticos das espécies neotropicais. Já a morfologia dos esporos de Hymenophyllaceae é ainda pouco estudada. De forma geral, os esporos de Hymenophyllaceae são triletes e com cerca de 23 a 45µm de diâmetro no polo equatorial, sendo que a ornamentação da superfície dos esporos varia desde equinada a cônico-verrucosa (Morbelli *et al.* 2010). Em uma publicação pioneira sobre a morfologia de esporos de samambaias e licófitas, Tryon & Lugardon (1990) estudaram 57 espécies da família, sendo 15 do gênero *Hymenophyllum* e oito do subgênero *Sphaerocionium*. Mais recentemente, Lorscheitter *et al.* (1999) realizaram um detalhamento, com base em microscopia eletrônica de varredura, das espécies de *Hymenophyllum* ocorrentes no Estado do Rio Grande do Sul, apresentando a morfologia de esporos de 12 espécies. Segundo Morbelli *et al.* (2010) as variações morfológicas presentes nas superfícies dos esporos de Hymenophyllaceae podem ter valor taxonômico no reconhecimento de táxons a nível genérico e específico.

Em geral, a maioria dos representantes de Hymenophyllaceae neotropicais (cerca de 300 espécies) carece de revisões taxonômicas que permitam clara delimitação dos táxons específicos (Windisch 2014). No que tange o gênero *Hymenophyllum*, Morton (1947) realizou uma revisão taxonômica para a secção *Sphaerocionium* do gênero *Hymenophyllum* ocorrentes no neotrópico, porém com estudo de poucos materiais de procedência brasileira. Recentemente Larsen *et al.* (2013) revisaram as espécies do gênero *Hymenophyllum* para o sul da Argentina e Chile, propondo descrições morfológicas, ecológicas e relações filogenéticas das espécies locais. Algumas espécies de ampla distribuição geográfica foram abordadas em análises moleculares do gênero e subgêneros realizadas por Hennequin *et al.* (2003, 2003a, 2006 e 2010), como

*Hymenophyllum hirsutum* (L.) Sw., porém, envolvendo um número muito reduzido de espécies Neotropicais, e ausência das espécies endêmicas do Brasil.

Estudos locais têm tratado as espécies de forma de lista de espécies ou trabalhos florísticos: Diem & Lichtenstein (1959) compilaram a flora de Hymenophyllaceae para o sul da Argentina e Chile. Floras pontuais do neotrópico foram realizadas por Lellinger (1984) para a Guiana Venezuelana, Tryon & Stolze (1989) para a República do Peru e Pacheco (1995) para a Flora Mesoamericana.

No Brasil, poucos são os trabalhos que focalizaram na taxonomia ou ecologia do grupo. Dentre os trabalhos mais abrangentes está o de Sturn (1870), o qual monografou a família para a *Flora Brasiliensis* de Martius e colaboradores, apresentando 25 espécies de *Hymenophyllum*, incluindo novas ocorrências e descrição de espécies novas. Em 1872, Antoine Fée descrevendo algumas espécies novas em seu tratado: *Cryptogames vasculaires du Brésil*; Sehnem (1971) com apresentação das espécies de Santa Catarina; Windisch (1988, 1992, 1992a, 1996) revisando as espécies do grupo *Trichomanes crispum* L. para a Amazônia Brasileira, a família Hymenophyllaceae na Serra do Cipó e Hymenophyllaceae no estado do Mato Grosso, respectivamente. Recentemente, Windisch (2014) apresentou a sinopse de Hymenophyllaceae para o Estado do Rio Grande do Sul incluindo chaves, ilustrações de informações ecológicas. No entanto, o tratamento taxonômico para as espécies do gênero *Hymenophyllum* abrangendo toda extensão do bioma Mata Atlântica, incluindo a revisão nomenclatural das espécies e o uso de dados moleculares ainda não foi abordado.

Atualmente estima-se que, no Brasil, o gênero *Hymenophyllum* esteja representado por 32 espécies, distribuídas em todas as formações florestais do Brasil (Windisch 2015), sendo a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica como as fitofisionomias mais diversificadas. Muitas espécies que apresentam distribuição na bacia Amazônica são disjuntas com a Mata Atlântica (Tryon & Tryon 1982), porém, devido à falta de amostragem e de conhecimento das floras locais muitas destas disjunções podem não existir. Dentre estas espécies, sete são citadas como endêmicas do Brasil, sendo seis endêmicas da Mata Atlântica brasileira (*Hymenophyllum delicatulum* Sehnem, *H. glaziovii* Baker, *H. rufum* Fée, *H. sampaioanum* Brade & Rosenst., *H. silverae* Christ, *H. vestitum* (K.Presl) v.d. Bosch) e *H. prionema* Kunze endêmica da Amazônia.

## JUSTIFICATIVA

O estudo taxonômico e ecológico da família Hymenophyllaceae vem despertando interesse desde longa data. A lista bibliográfica de trabalhos taxonômicos contemplando a família é relativamente vasta em amplitude global.

No Brasil, a literatura sobre o tema é formada por revisões antigas da família, ou por meio de floras pontuais realizadas em unidades políticas delimitadas, não levando em conta unidades fitogeográficas ou biomas como um todo. Na Mata Atlântica, por exemplo, considerada como um dos centros de riqueza e endemismos de samambaias sul americanas (Tryon 1972), o tratamento mais completo da família remonta a obra de Sturm, J. G. descrita na *Flora Brasiliensis* de Martius de 1870, onde apresenta descrição taxonômica, ecológica e biogeográfica de 76 espécies ocorrentes no Brasil. Desde então, várias espécies novas foram descritas para o Brasil, e a amostragem das espécies tem sido vastamente ampliada devido acúmulo de materiais de herbário.

Mesmo no subgênero *Sphaerocionium*, o qual foi revisado no neotrópico por Morton em 1947, a delimitação de algumas espécies não é clara. O difícil acesso a muitos materiais do Brasil e a baixa amostragem da época foram empecilhos para um maior detalhamento das espécies brasileiras por parte do autor. Algumas espécies pertencentes ao complexo *Hymenophyllum hirsutum* (que inclui a espécie endêmica da Mata Atlântica *H. vestitum*), *H. plumosum* e *H. elegans*, necessitam de maiores estudos taxonômicos (morfológicos e filogenéticos) para delimitação das espécies presentes na Mata Atlântica e Amazônia. A presença de muitas espécies endêmicas do subgênero no bioma Mata Atlântica instiga para uma abordagem filogenética das espécies ocorrentes nesta área de estudo. Esta abordagem poderá auxiliar não só na delimitação dos táxons, mas também no estabelecimento das relações evolutivas entre as espécies ocorrentes no bioma.

Neste sentido, não há um consenso delimitando os táxons ocorrentes no Brasil. Na maioria dos herbários brasileiros, as coleções de *Hymenophyllum* contam com poucos exemplares bem identificados e outros tantos com identificação duvidosa. Apesar de a família estar bem amostrada nas regiões Sul, Sudeste e parte do Nordeste do Brasil, existem grandes lacunas na amostragem e citação para a flora das demais regiões do Brasil. Atualmente, encontram-se cerca de 3.500 registros de herbário disponíveis (INCT- Herbário Virtual da Flora e dos Fungos, 2016) e contam com mais de 500 amostras sem identificação, com identificações desatualizadas ou realizadas

erroneamente. Esta falta de amostragem e correta identificação pode estar mascarando dados biogeográficos das espécies acarretando em falsos padrões de diversidade e endemismos de espécies.

Atualmente, devido aos acordos assinados pelo País na Convenção da Diversidade Biológica, há a necessidade de até 2020 o País monografar sua flora e disponibilizá-la de forma online. Este requisito atende a Estratégia Global para a Conservação de Plantas (GSPC-CDB) e depende da participação ativa dos taxonomistas nacionais e internacionais para o cumprimento desta meta. No âmbito das Hymenophyllaceae, um plano de trabalho foi submetido e aprovado junto ao projeto Flora do Brasil Online 2020 (FBO 2020) para a monografia do gênero *Hymenophyllum*, com base nos resultados provenientes deste projeto de pesquisa.

A importância de um esclarecimento taxonômico do grupo e a disponibilização de chaves de identificação e dados referentes à ecologia e distribuição das espécies pode auxiliar inúmeros pesquisadores no desenvolvimento de seus estudos com florísticas e ecologia, uma vez que a família apresenta 55% das espécies epifíticas (Zotz 2013) e frequentemente são coletadas em inúmeras amostragens ecológicas.

As espécies de Hymenophyllaceae são vegetais extremamente sensíveis quanto às condições ecológicas as quais estão submetidas, pois apresentam o tecido foliar com apenas uma camada de células e poucos mecanismos de retenção de água devido a cutícula foliar subdesenvolvida. Este fato torna este grupo importante como elemento bioindicador de qualidade ambiental. Além disso, normalmente ocorrem em formações primárias ou em estádios mais avançados de sucessão vegetacional, onde a estrutura arbórea atinge seu clímax e proporciona as condições ecológicas necessárias para o grupo. Grande número de espécies pode ser utilizado como parâmetros de caracterização sucessional da vegetação, podendo ser aplicados de forma prática nos processos de licenciamentos e de conservação vegetal como um todo. Outro fato importante é de que muitas espécies de Hymenophyllaceae são epifíticas e apresentam desenvolvimento exclusivo em algumas espécies de samambaias arborescentes tornando-se importantes bioindicadores da presença e de estratégias de conservação mutuas entre os dois grupos.

A falta de especialistas na família é outra demanda existente. Atualmente, poucos são os taxonomistas de samambaias e licófitas no Brasil, e poucos têm direcionado investigações com o grupo. A ampla distribuição das espécies, e muitas alterações



nomenclaturais na delimitação dos gêneros e secções têm dificultado algumas abordagens ao longo do tempo.

## OBJETIVO GERAL

O presente projeto objetiva fazer um estudo florístico e taxonômico das espécies de *Hymenophyllum* presentes no bioma Floresta Atlântica, além da filogenia das espécies do subgênero *Sphaerocionium* ocorrentes neste bioma.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Subsidiar a monografia do gênero *Hymenophyllum* para Flora do Brasil 2020;
- Caracterizar os esporos e tipificar a morfologia dos tricomas das espécies de *Hymenophyllum*;
- Estabelecer as relações filogenéticas das espécies de *Hymenophyllum* subgênero *Sphaeroconium* ocorrentes na Mata Atlântica brasileira;
- Testar a natureza dos grupos *Ciliata* e *Lanata* propostas por Morton (1947).

## HIPÓTESES

- Existe, na Floresta Atlântica, uma riqueza de espécies maior que a relatada pela bibliografia atualmente;
- Os esporos das espécies de *Hymenophyllum* ocorrentes na Mata Atlântica apresentam ornamentações distintas que podem auxiliar na identificação das espécies;
- As espécies do subg. *Sphaerocionium* ocorrentes na Mata Atlântica formam um grupo intimamente relacionado, sendo que as espécies endêmicas são derivadas das demais co-ocorrentes.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o cumprimento dos objetivos são realizadas revisões bibliográficas, revisões de herbários, análises morfológicas, análises moleculares e, coletas de campo de todas

as espécies de *Hymenophyllum* ocorrentes no Brasil, obedecendo a seguinte metodologia:

### **Revisão de coleções de Herbários e amostragem de campo**

A revisão taxonômica das espécies de *Hymenophyllum* será realizada através análise de bibliografia, publicações de cunho florístico, taxonômico, ecológico e molecular. A revisão de herbários nacionais e estrangeiros será feita através de pedidos de empréstimos e visitas às coleções. Sempre que possível serão analisados os exemplares-tipo (*Typus*) de cada táxon ou então, serão solicitadas imagens de alta resolução destes para averiguar a identidade taxonômica de cada espécie e proposição de possíveis sinonímias.

Excursões de coleta serão realizadas na região da Mata Atlântica, buscando amostrar áreas pouco coletadas, bem como as áreas de distribuição das espécies endêmicas. A ferramenta Lacunas disponível pelo sistema Species Link (<http://lacunas.inct.florabrasil.net/2015/index>) será utilizada para elencar áreas com menor amostragem do grupo. Os locais de coleta de plantas incluem as Unidades de Conservação (UC), parques ou áreas particulares. No Rio Grande do Sul, os esforços de amostragem serão feitos principalmente na região Oeste, especificamente no Parque Nacional da Serra Geral, Parque Nacional dos Aparados da Serra e Floresta Nacional de São Francisco de Paula, onde os registros das espécies são escassos. Esta amostragem é de fundamental importância para o entendimento dos limites fitogeográficos das espécies, marcação de populações, registro visual das características biológicas e ecológicas *in situ*, além da aquisição de imagens das espécies aqui estudadas.

Os espécimes serão coletados e tratados conforme as técnicas usuais de herborização (Windisch 1992), realizando conjuntamente os dados relativos ao ambiente (substrato, luminosidade e grau de umidade), às populações (tamanho da população, formas de propagação vegetativa, etc.), possíveis variações morfológicas, e eventuais associações com populações de outras espécies. Além do material a ser incorporado nos herbários, serão feitas coletas de amostras genéticas para estudos moleculares das espécies. Para tanto serão coletadas folhas jovens dos materiais coletados a campo, que serão dessecadas em embalagens plásticas contendo sílica gel, para posterior extração de DNA.

Mapas de ocorrência das espécies confirmadas serão elaborados com base nos pontos de coleta (posicionamento marcado com GPS) e em informações das fichas de exsicatas de herbário. Os materiais sem informação de coordenadas serão georreferenciados a partir do banco de dados (Species Link – ferramenta geoLoc – <http://splink.cria.org.br/geoloc>) ou por imagens de satélite (Google Earth ©) da sede dos municípios. O material coletado será incorporado ao Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN).

### **Análise morfológica**

Para a análise morfológica será utilizada a metodologia clássica, usual em taxonomia a, consistindo na observação de formas, medições e análise de estruturas dos esporófitos utilizando-se observações diretas, estereomicroscópio e microscópio óptico. Para tanto, serão analisadas todas as exsicatas disponíveis de cada táxon. Os táxons confirmados serão ilustrados, detalhando-se a forma da fronde, tamanho, indumento, formato de indúcio, com o uso de fotografias e também com o auxílio de estereomicroscópio com câmara acoplada. As definições quanto à nomenclatura morfológica seguirão Lellinger (2002). As medidas serão feitas em material seco e serão observadas as medidas mínimas e máximas das estruturas.

### **Análise microscópica**

A caracterização palinológica das espécies será realizada através da análise dos esporos em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e em microscopia óptica. Os esporos das espécies serão retirados das exsicatas de herbário, dos materiais que representam a forma típica da espécie. As amostras serão tratadas através das técnicas usuais e avaliadas quanto sua morfologia, ornamentação e dimensões, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Além dos esporos, este procedimento será aplicado aos tricomas do indumento das espécies para fins de caracterização dos mesmos.

## **Análise filogenética**

Para análise filogenética serão utilizadas todas as espécies do subgênero *Sphaerocionium* ocorrentes no bioma Mata Atlântica. As análises objetivam o enquadramento das espécies dentro das seções do gênero, conforme realizado por Larsen *et al.* (2013), bem como para elucidar a delimitação e relação evolutiva entre as espécies. Para tanto, folhas jovens dos materiais coletados a campo serão dessecadas em embalagens plásticas contendo sílica gel, para posterior extração de DNA, ou serão obtidas a partir de exsiccatas de herbários. Amostras também poderão ser obtidas através de contato com pesquisadores de outras instituições brasileiras. Outras espécies poderão ser inclusas nas análises medida que serão realizadas as amostragens de campo e de herbários e contatadas espécies novas e/ou endêmicas.

O grupo interno contará com pelo menos dez indivíduos de cada táxon amostrados na área de estudo, oriundos de diferentes locais, o que possibilita a observação de possíveis variações ambientais. Além destas espécies, serão selecionadas para análise demais espécies do subgênero com sequências do gene *rbcL*, *rps4-trnS* e *rps4* já disponíveis no GenBank e detalhadas por Pryer *et al.* (2001), Hennequin *et al.* (2010) e Larsen *et al.* (2013). Para o grupo externo serão tomados representantes de outros subgêneros de *Hymenophyllum*, além de espécies do gênero *Trichomanes* também disponíveis no GenBank.

A extração de DNA seguirá o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987). A seleção de *primers* para os marcadores selecionados seguirá Pryer *et al.* (2001) e Hennequin *et al.* (2003), Hennequin (2003a), sendo: aF e M1390. A amplificação do material genético segue o utilizado por Larsen *et al.* (2013), com edição e alinhamento das sequências obtidas no programa Bioedit. As análises dos dados obtidos, juntamente com a construção das filogenias serão realizadas nos programas MrBayes e FigTree respectivamente.

## **RESULTADOS ESPERADOS**

Os temas abordados no projeto poderão resultar na descoberta de novas espécies, delimitações de padrões biogeográficos, novos caracteres morfológicos para o reconhecimento dos táxons e a sistemática filogenética das espécies de *Sphaerocionium*

da Mata Atlântica. Estes resultados serão divulgados por meio das seguintes publicações:

- Um artigo referente à descrição palinológica das espécies de *Hymenophyllum* com submissão à Brazilian Journal of Botany (*qualis* Capes B1);
- Um artigo contendo a revisão taxonômica e filogenética das espécies de *Sphaerocionium* com publicação no periódico Phytotaxa (*qualis* Capes B1);
- Descoberta de novas espécies, se houverem, serão publicadas no periódico Flora ou com *qualis* equivalente (*qualis* capes B1);
- Possíveis alterações nomenclaturais referentes à tipificação das espécies poderão ser publicadas no periódico Taxon (*qualis* Capes A2).

## **CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO**

Atividade/Semestre	2016/I	2016/II	2017/I	2017/II	2018/I	2018/II	2019/I	2019/II
Obtenção de créditos	X	X	X					
Revisão de herbários	X	X	X	X	X	X	X	
Análises morfológicas	X	X	X	X	X	X	X	
Excursões de coleta	X	X	X	X	X	X		
Estágio no exterior					X			
Exame de qualificação						X		
Análise filogenética das espécies					X	X	X	
Redação da tese							X	

## **ORÇAMENTO**

A presente proposta de tese de doutorado será submetida a financiamento nos próximos editais que surgirem nas linhas de fomento à taxonomia, visando um aprimoramento nos trabalhos de campo e análises filogenéticas. Para a realização do estágio no exterior será pleiteada uma vaga por meio de editais de bolsas específicas, com no mínimo de três meses de estada nos Estados Unidos (Herbários US, MO, NY e

GH). De uma forma geral a parte florístico-taxonômica já tem a infraestrutura e recursos garantidos.

Demais despesas:

Atividade	Custo
Visita aos herbários	R\$ 10.000,00
Coletas em campo	R\$ 6.000,00
Microscopia eletrônica	R\$ 2.000,00
Análises filogenéticas (kits para extração, confecção de <i>primers</i> , sequenciamento e reagentes)	R\$ 7.000,00
Total	R\$ 25.000,00

## EQUIPE

A realização deste projeto conta com as seguintes participantes:

Dra. Mara Rejane Ritter – orientadora

Dr. Paulo Günter Windisch – co-orientador

Uma parceria com o laboratório de Sistemática Molecular de samambaias do Instituto Darwinion (Dra. Mónica Ponce - Argentina) já está sendo tratada para realização dos procedimentos filogenéticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOSCH, R.B. van den. 1858. Synopsis Hymenophyllacearum: monographiae hujus oridinis Prodomus. Mededeelingen van 's Rijks Herbarium, Leiden, vol. 17, No. 1, p.1-36.
- CHRISTENHUSZ, M.J.M. & CHASE, M.W. 2014. Trends and concepts in fern classification. *Annals of Botany* 113: 571-594.
- COPELAND, E.B. 1938. Genera Hymenophyllacearum. *The Philippine Journal of Science* 67: 1-110.
- COPELAND, EB. 1933. Trichomanes. *Philippine Journal of Science* 51: 119-280.
- COPELAND, EB. 1938. Genera Hymenophyllacearum. *Philippine Journal of Science* 67(1): 1-110.
- COPELAND, EB. 1947. *Genera Filicum: the genera of ferns*. Chronica Botanica Co. Waltham. Pp 247.

- DIEM, J. & de LICHTENSTEIN J.S. 1959. Las himenofiláceas del área argentino–chilena del sud. *Darwiniana* 11(4): 611-760.
- DOYLE, J. J. & J. L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- DUBUISSON, J.Y.; HANNEQUIN S.; DOUZERY E.J.P.; CRANFILL, R.B.; SMITH A.R. & PRYER K.M. 2003. *rbcL* phylogeny of the fern genus *Trichomanes* (Hymenophyllaceae) with special reference to Neotropical taxa. *International Journal of Plant Sciences* 164: 753-761.
- EBIHARA, A., S. HENNEQUIN, K. IWATSUKI, P. D. BOSTOCK, S. ATSUMOTO, R. JAMAN, J.-Y. DUBUISSON, and M. ITO. 2004. Polyphyletic origin of *Microtrichomanes* (Prantl) Copel. (Hymenophyllaceae), with a revision of the species. *Taxon* 53: 935–948.
- EBIHARA, A.; DUBUISSON, J.; ITAWSUKI, K.I. & ITO, M. 2007. Systematics of *Trichomanes* (Hymenophyllaceae: Pteridophyta), progress and future interests. *Fern Gazette* 18(12): 53-58.
- EBIHARA, A.; DUBUISSON, J.; ITAWSUKI, K.I.; HENNEQUIN, S. & ITO, M. 2006. A taxonomic revision of Hymenophyllaceae. *Blumea* 51: 221-280.
- FÉE, A.L.A. 1869. *Cryptogames vasculaires du Brésil*. V. 1. Veuve Berger-Levrauld & Fils, Paris.
- HENNEQUIN, S. 2003. Phylogenetic relationships within the fern genus *Hymenophyllum* s.l. (Hymenophyllaceae, Filicopsida): contribution of morphology and cytology. *Comptes Rendus Biologies* 326: 599-611.
- HENNEQUIN, S., EBIHARA, A., ITO, M., IWATSUKI, K., DUBUISSON, J.-Y., 2003. Molecular systematics of the fern genus *Hymenophyllum* s.l. (Hymenophyllaceae) based on chloroplastic coding and noncoding regions. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 27, 283– 301.
- HENNEQUIN, S. 2003<sup>a</sup>. Phylogenetic relationship within the fern genus *Hymenophyllum* s.l. (Hymenophyllaceae, Filicopsida): contribution of morphology and cytology. *Comptes Rendus Biologies* 326: 599-611.
- HENNEQUIN, S., A. EBIHARA, M. ITO, K. IWATSUKI & J.-Y. DUBUISSON. 2006. Phylogenetic systematics and evolution of the genus *Hymenophyllum* (Hymenophyllaceae: Pteridophyta). *Fern Gazette* 17: 247-257.
- HENNEQUIN, S., A. EBIHARA, J.-Y. DUBUISSON & H. SCHNEIDER. 2010. Chromosome number evolution in *Hymenophyllum* (Hymenophyllaceae), with

- special reference to the subgenus *Hymenophyllum*. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 55: 47-59.
- INCT - Herbario Virtual da Flora e dos Fungos (<http://inct.splink.org.br>) em 27 de Julho de 2016 às 10:25.
- IWATSUKI, K. 1984. Studies in the systematic of filmy ferns VII. A scheme of classification based on the Asiatic species. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 35: 165-179.
- IWATSUKI, K. 1985. The Hymenophyllaceae of Asia, excluding Malesia. *Journal of the Faculty of Science, University of Tokyo* Sect. 3. Bot 13: 501-551.
- IWATSUKI, K. 1990. Hymenophyllaceae. In K. Kubitzki (ed.). *The families and genera of vascular plants*. Vol. 1. Pteridophytes and gymnosperms: 157-163. Springer Verlag., Berlin.
- LARSEN, C., PONCE, M. M. & SCATAGLINI, A. M. 2013. *Hymenophyllum* del sur de Argentina y Chile. *Gayana Botánica* 70(2): 274-329.
- LELLINGER, D.B. 1984. Hymenophyllaceae. In Maguire, B. The Botany of the Guayana highlands par XII. *Memorial New York Botanical Garden* 38: 9-46.
- LELLINGER, D.B. 2002. *A modern multilingual glossary for taxonomic pteridology*. Pteridologia 3. The American Fern Society, Inc., 263p.
- LORSCHREITER, M.L.; ASHRAF, A.R.; WINDISCH, P.G.; MOSBRUGGER, V. 1999. Pteridophyte spores of Rio Grande do Sul Flora, Brazil. Part II. *Palaeontographica*. Abt B 251: 71-235.
- MORBELLI, M.A.; PIÑEIRO, M.R. & GIUDICE, G. E. 2010. Spore morphology and wall ultrastructure of Hymenophyllaceae Link (Pteridophyta) from north-west Argentina. *Grana* 49:1, 37-46
- MORTON, C.V. 1947. The American species of *Hymenophyllum* sect. Sphaerocionium. *Contributions from the United States National Herbarium* 29: 139-201.
- MORTON, C.V. 1968. The genera, subgenera and sections of the Hymenophyllaceae. *Contributions from the United States National Herbarium* 38(5): 153-214.
- PACHECO, L. 1995. Hymenophyllaceae. In G. Davidse, M. Sousa & A.S. Knapp (eds.), *Flora Mesoamericana 1: Psilotaceae a Salviniaceae*. p. 62-83. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, México.
- PICHI-SERMOLLI, R.E.G. 1977. Tentamen Pteridophytorum genera in taxonomicum ordinem redigendi. *Webbia* 31: 313-512.



- PRANTL, K. 1875. Die Hymenophyllaceen. *Untersuchungen zur Morphologie der Gefasskryptogamen*. v.1. p.1-73.
- PRESL, K.B. 1843. Hymenophyllaceae. *Abhandlungen der Koniglichen Gesellschaft der Wissenschaften*, ser. 5 (3): 98-162.
- PRYER, K.M.; SMITH, A.R.; HUNT, J.S. & DUBUISSON, J.Y. 2001. *rbcL* data reveal two monophyletic groups of filmy ferns (Filicopsida: Hymenophyllaceae). *American Journal of Botany* 88: 1118-1130.
- SEHNEM, A. 1971. Himenofiláceas. In Reitz, R., Ed. *Flora Ilustrada Catarinense* (Himen). Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí. 98p.
- SMITH, J.E. 1793. Tentamen Botanicum de Filicum Generibus Dorsiferarum. *Memories de L'Académie Royale des Sciences de Turin* 5: 401-422. SMITH, J. 1875. *Historia Filicum*. MacMillan, London.
- SMITH, A.R.; PRYER, K.M.; SCHUETTPELZ, E.; KORALL, P.; SCHNEIDER, H. & WOLF, P.G. 2006. A classification for extant ferns. *Taxon* 55(3): 705-731.
- STURM, J.G. 1859. Ophioglossaceae et Hymenophyllaceae. In C. F. P. Martius & A. G. Eichler (eds.). *Flora Brasiliensis*. Lipsiae apud Frid. Fleischer in Comm. Monachii. 1(2): 142-304.
- TRYON, R. 1972. Endemic areas and geographic speciation in Tropical American ferns. *Biotropica* 4(3):121-131.
- TRYON, A. F. & LUGARDON, B. 1991. *Spores of the Pteridophyta: surface, wall structure and diversity based on electron microscope studies*. New York: Springer.
- TRYON, R.M & TRYON, A.F. 1982. *Ferns and Allied Plants, with special reference to Tropical America*. Springer Verlag, New York. Pp 857.
- TRYON, R.M. & STOLZE R.G. 1989. Pteridophyta of Peru, Part I. *Fieldiana Botany* 20: 1-145.
- WINDISCH, P.G. 1988. Sinopse das espécies do grupo *Trichomanes crispum* L. (Pteridophyta – Hymenophyllaceae) ocorrentes na Amazônia brasileira. *Bradea* 5: 55-58.
- WINDISCH, P.G. 1992. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Hymenophyllaceae. *Boletim de Botânica* 13: 133-139.
- WINDISCH, P.G. 1992a. *Pteridófitas da região norte-ocidental do estado de São Paulo*: guia para estudo e excursões. UNESP, São José do Rio Preto, 2ed., 122 p.
- WINDISCH, P.G. 1996. Pteridófitas do Estado de Mato Grosso: Hymenophyllaceae. *Bradea* 6: 400-423.

- WINDISCH, P.G. 2014. Hymenophyllaceae (Polypodiopsida) no estado do Rio Grande do Sul. *Pesquisas, botânica* 65: 15:48.
- WINDISCH, P.G. 2015. Hymenophyllaceae. *In* Lista de Espécies da Flora do Brasil. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB91174>>. Acesso em 20 outubro 2015.
- ZOTZ, G. 2013. The systematic distribution of vascular epiphytes: a critical update *Botanical Journal of the Linnean Society* 171:453-481.