



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

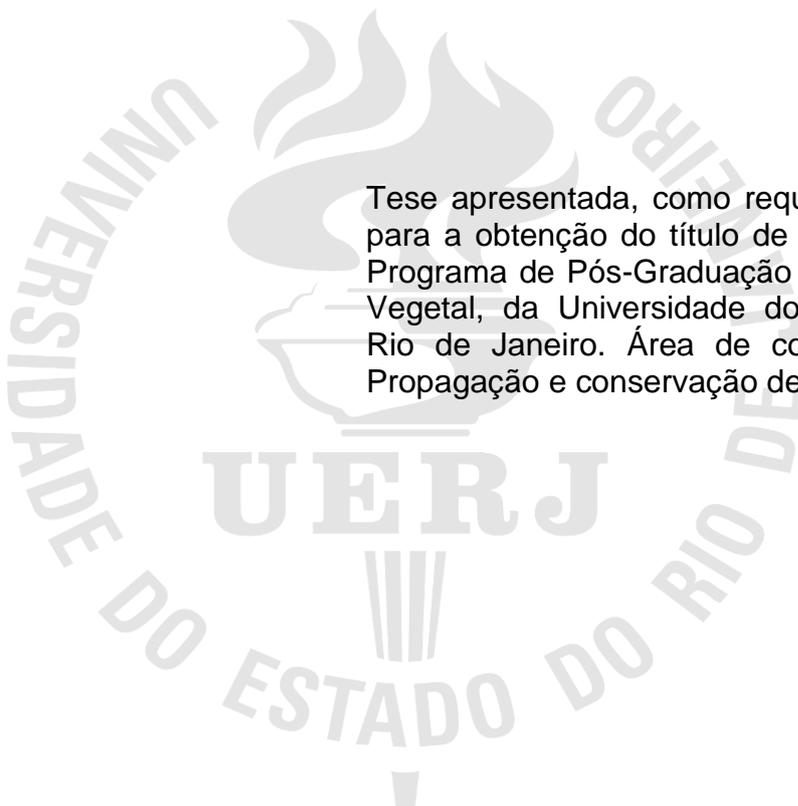
Dilma Melo da Silva

**Morfologia dos esporos da família Blechnaceae
Newman (Polipodiales-Polypodiopsida)**

Rio de Janeiro
2019

Dilma Melo da Silva

**Morfologia dos esporos da família Blechnaceae Newman (Polipodiales-
Polypodiopsida)**



Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Propagação e conservação de plantas.

Orientadoras: Prof.^a Dra. Vania Gonçalves Lourenço Esteves
Prof.^a Dra. Lana da Silva Sylvestre

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

S586 Silva, Dilma Melo da.
Morfologia dos esporos da família Bechnaceae Newman (Polipodiales - Polypodiopsida)/ Dilma Melo da Silva .- 2019.
90f. : il.

Orientadoras: Vania Gonçalves Lourenço Esteves, Lana da Silva Sylvestre.
Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Samambaia - Teses. 2. Morfologia vegetal - Teses. 3. Filogenia - Teses. I. Esteves, Vania Gonçalves Lourenço. II. Sylvestre, Lana da Silva. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 582.35

Patricia Bello Meijinhos CRB7/5217 - Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Dilma Melo da Silva

**Morfologia dos esporos da família Blechnaceae Newman (Polipodiales-
Polypodiopsida)**

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Propagação e conservação de plantas.

Aprovada em 30 de Julho de 2019

Orientadores:

Prof.^a Dra. Vania Gonçalves Lourenço Esteves
Museu Nacional – UFRJ

Prof.^a Dra. Lana da Silva Sylvestre
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Banca examinadora: _____

Prof.^a Dra. Cláudia Barbieri ferreira Mendonça
Museu Nacional- UFRJ

Prof.^o Dr. João Paulo Santos Condack
Pontífice Universidade Católica – RJ

Prof.^a Dra. Raquel Maria Batista Souza de Souza
Museu Nacional- UFRJ

Prof.^a Dra. Andrea Pereira Luiz Ponzó
Universidade Federal de Juiz de Fora

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a minha amada família

AGRADECIMENTOS

A Deus que está acima de tudo e de todos.

A minha orientadora Vania G. L. Esteves por ter me recebido no laboratório de Palinologia, o início de uma nova etapa de minha vida acadêmica repleto de novos desafios e conquistas.

A professora Cláudia Barbieri F. Mendonça que me orientou nos passos iniciais da Palinologia.

A minha coorientadora Lana Sylvestre que me auxiliou com a mudança do projeto, suas sugestões foram fundamentais para o avanço da pesquisa de forma clara e objetiva.

A Elisiane Marinho e a Carolina Mezzonato pela ajuda na estatística.

Aos colegas do laboratório por sempre estar disponíveis para me auxiliar sempre que precisei. Também pelos momentos descontraídos de dias alegres, almoços espremidos numa grande e ruidosa mesa e almoços festivos comendo “gordices”.

As amadas amigas Adriana Gomes, Ana Paula Garcia Costa e Fernanda Cristina Albuquerque companheiras de todas as horas boas e difíceis nessa caminhada.

Ao técnico Pedrinho, sem ele as coisas não funcionam muito bem no laboratório.

A professora Ana Furtado e a técnica Jéssica do laboratório de Polímeros do Instituto de Química da UERJ pela realização do MEV.

Ao Programa de Pós Graduação de Biologia Vegetal pelos auxílios concedidos.

Aos curadores Sebastião José da Silva Neto do Herbário *Bradeanum* - UERJ, Ruy José Válka Alves do Herbário do Museu Nacional, Alexandre Salino do Herbário da Universidade Federal de Minas Gerais, Matthew Pace do New York Botanical Garden, Brendan Lepschi do Australian National Herbarium, Marc Jeanson do

Muséum National d'Histoire Naturelle e Germinal Rouhan curador de samambaias de Herbário de Paris pelas amostras concedidas.

A Claudine Mynssen pela separação e transporte do material do herbário de Paris.

A Robbin Moran pela atenção dispensada.

A Marta Morbelli pelo envio dos artigos escaneados.

Ao INEA e a SISBIO pela licença de coleta concedida.

Aqueles que não me apoiaram, pois foi através de suas barreiras que me incentivaram a seguir em frente e vencê-las.

.....De repente tudo vai ficando tão simples que assusta. A gente vai perdendo as necessidades, vai reduzindo a bagagem. As opiniões dos outros são realmente dos outros, e mesmo que seja sobre nós, não tem importância. Vamos abrindo mão das certezas, pois já não temos certeza de nada. E isso não faz a menor falta. Paramos de julgar, pois já não existe certo ou errado, e sim a vida que cada um escolheu experimentar. Por fim, entendemos que tudo o que importa é ter paz e sossego, é viver sem medo, é fazer o que me alegra, o que me faz bem, o que me faz feliz. É só.

(Mario Quintana)

RESUMO

SILVA, Dilma Melo da. **Morfologia dos esporos da família Blechnaceae Newman (Polipodiales- Polypodiopsida)**. 2019. 87 f. (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Blechnaceae, uma família de samambaias leptosporangiais, é um grupo monofilético com relações infragenéricas controversas, resultando em diferentes classificações. A fim de contribuir para a classificação mais recente do grupo, este trabalho tem como objetivo detectar se morfologia dos esporos contribuem para o reconhecimento dos diferentes gêneros na atual classificação filogenética reconhecida para o grupo. Para atender a esse objetivo, os esporos de 53 espécies e um híbrido, distribuídos em 18 gêneros, foram examinados. O material polínico coletado no herbário foi submetido ao tratamento acetolítico. Os esporos acetolisados foram medidos, descritos e os resultados submetidos à análise estatística. Após a confecção das lâminas, foram feitas imagens dos esporos acetolisados em microscopia de luz. Para as imagens em microscopia eletrônica de varredura foram utilizados esporos não acetolisados. Os esporos são plano convexos em vista equatorial e elipsoidais em vista polar, de tamanho de médio a grande, com cicatriz monolete de tamanho variado, linear e sem margem. A exina é formada por duas camadas, nexina e sexina, psilada na maioria das espécies, exceto em *Stenochlaena*. A perina possui três camadas com exceção da subfamília Stenochlaenoideae que registrou somente uma. Foram segregados dois grandes grupos de acordo com as dobras da perina, sem cristas e com cristas e grande diversidade de ornamentação na superfície do esporo. Entre os esporos sem cristas estão *Austroblechnum* e *Doodia* com ornamentação granulada ou escabrada. *Neoblechnum* é escabrada, *Sadleria* é densamente gemada, ambos de aspecto escamoso. *Salpichlaena* e *Telmatoblechnum* possuem grânulos e gemas. *Stenochlaena* registrou perina fina contornando a exina formando ornamentação equinada ou com dobras densas paralelas. O grupo que registrou cristas compreende *Anchistea* com presença de espinhos, *Cranfillia* e *Struthiopteris* com cristas psiladas ou ondulações, *Diploblechnum* de psilada a granulada, *Icarus* com ornamentação rugulada. *Lomaria* e *Lomaridim* apresentam rugulas e grânulos, *Blechnum* e *Lomariocycas* foram os que apresentaram maior diversidade, provavelmente por influência de poliploidia que promove diversidade morfológica. Ambos apresentaram uma única espécie cristada, *Blechnum* com ornamentação granulada, escabrada, rugulada e psilada, *Lomariocycas* conspicuamente rugulada ou densamente gemada. *Parablechnum* foi caracterizado por cristas de muros altos e baixos com filamentos ou não, *Woodwardia* possui ornamentação escabrada. A análise morfométrica não foi uma ferramenta útil para a segregação de agrupamentos taxonômicos de gêneros por possíveis influências de indivíduos poliploides. Ao contrário, a análise da ornamentação da superfície do esporo permitiu a delimitação dos gêneros, de acordo com o padrão de ornamentação da perina, corroborando com a nova classificação proposta para a família. Neste sentido é comprovada a importância da Palinologia para a segregação dos táxons, fornecendo importantes informações das diferentes variações da ornamentação da

perina, além de contribuir para o enriquecimento do conhecimento palinológico do grupo.

Palavras-chave: Análise. Perina. Filogenia

ABSTRACT

SILVA, Dilma Melo da. **Morphology of the Blechnaceae Newman (Polypodiales-Polypodiopsida) spores.** 2019. 87 f. (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Blechnaceae, a family of leptosporangiatae ferns, is a monophyletic group with controversial infrageneric relationships, resulting in different classifications. In order to contribute to the most recent classification of the group, this work aims to detect if the spore morphology contributes to the recognition of different genera in the current phylogenetic classification recognized for the group. To meet this goal, the spores of 53 species and one hybrid, distributed in 18 genera, were examined. The spores were collected in the herbarium was submitted to acetolytic treatment. The acetolysed spores were measured, described and the results submitted to statistical analysis. After making the slides, the images of the acetolyzed spores were made in light microscopy. Non-acetylated spores were used for scanning electron microscopy images. The spores are plane-convex in equatorial view and ellipsoidal in polar view, medium to large size, with monolete laesura of varied size, linear and without margin. The exine is formed by two layers, nexine and sexine, psilate in most species, except in *Stenochlaena*. The perine has three layers except for the subfamily *Stenochlaenoideae* which recorded only one. Two large groups were segregated according to folds of the perine, without cristae and cristae and great diversity of ornamentation on the surface of the spore. Among the spores without cristae are *Austroblechnum* and *Doodia* with granulate or scabrate ornamentation. *Neoblechnum* is scabrate, *Sadleria* is thickly gemmate, both of scaly aspect. *Salpichlaena* and *Telmatoblechnum* have granules and gemmae. *Stenochlaena* recorded fine perine outline the exine forming equine ornamentation or with parallel dense folds. The group that recorded cristae comprises *Anchistea* with presence of spines, *Cranfillia* and *Struthiopteris* with psilate cristae or ripples, *Diploblechnum* from psilada to granulate, *Icarus* with rugular ornamentation. *Lomaria* and *Lomaridim* present rugulae and granules, *Blechnum* and *Lomariocycas* were the most diverse, probably due to the influence of polyploidy that promotes morphological diversity, both presented a single cristae species, *Blechnum* with granulate, scabrate, rugulate and psilate ornamentation, *Lomariocycas* conspicuously rugulate or densely gemmate. *Parablechnum* was characterized by cristae of high and low walls with filaments or not, *Woodwardia* has scabrate ornamentation. Morphometric analysis was not a useful tool for the segregation of taxonomic groups in the genus by possible influences of polyploid specimens. In contrast, the analysis of the spore surface ornamentation allowed the delimitation of the genera according to the ornament folds of the perine, corroborating with the new classification proposed for the family, also proving the importance of Palynology for the segregation of taxa and provided important information on the different variations of the perina ornamentation, contributing to the enrichment of the group's palynological knowledge.

Keywords: Analyze. Perina. Phylogeny

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Histórico da classificação da família Blechnaceae	21
Tabela 2-	Classificação da família Blechnaceae segundo Gasper et al. (2017)	22
Tabela 3-	Medidas (em μm) dos esporos em vista equatorial de espécies de Blechnaceae (n=25)	51
Tabela 4-	Medidas (em μm) dos esporos em vista polar (n=10) de espécies de Blechnaceae	57
Tabela 5-	Medidas (em μm) das camadas da exina, perina e comprimento da cicatriz, em vista polar das espécies de Blechnaceae	60
Tabela 6-	Coeficiente de variação (CV%) dos esporos em vista equatorial das espécies de Blechnaceae (n=25).	63
Tabela 7-	Variáveis (em μm) utilizadas na análise de componentes principais (PCA) dos dados morfométricos dos esporos das espécies da família Blechnaceae.	69

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Esquema dos diâmetros dos esporos utilizados nas análises morfométricas das espécies de Blechnaceae	27
Figura 2-	Imagem de Microscopia Óptica e Eletrônica de espécies de Blechnaceae: <i>Anchistea</i> , <i>Austroblechnum</i>	40
Figura 3-	Imagem de Microscopia Óptica e Eletrônica de espécies de Blechnaceae: <i>Austroblechnum</i> , <i>Blechnum</i>	41
Figura 4-	Imagem de Microscopia Óptica e Eletrônica de espécies de Blechnaceae: <i>Blechnum</i>	42
Figura 5-	Imagem de Microscopia Óptica e Eletrônica de espécies de Blechnaceae: <i>Blechnum</i> , <i>Blechnum x caudatum</i>	43
Figura 6-	Imagem de Microscopia Óptica e Eletrônica de espécies de Blechnaceae: <i>Cranfillia</i> , <i>Diploblechnum</i> , <i>Doodia</i>	44
Figura 7-	Imagem de Microscopia Óptica e Eletrônica de espécies de Blechnaceae: <i>Doodia</i> , <i>Icarus</i> , <i>Lomaria</i>	45
Figura 8-	Imagem de Microscopia Óptica e Eletrônica de espécies de Blechnaceae: <i>Lomaridium</i> , <i>Lomariocycas</i> , <i>Neoblechnum</i>	46
Figura 9-	Imagem de Microscopia Óptica e Eletrônica de espécies de Blechnaceae: <i>Parablechnum</i>	47
Figura 10-	Imagem de Microscopia Óptica e Eletrônica de espécies de Blechnaceae: <i>Parablechnum</i> , <i>Sadleria</i> , <i>Salpichlaena</i> , <i>Stenochlaena</i>	48
Figura 11-	Imagem de Microscopia Óptica e Eletrônica de espécies de Blechnaceae: <i>Stenochlaena</i> , <i>Struthiopteris</i> , <i>Telmatoblechnum</i>	49
Figura 12-	Imagem de Microscopia Óptica e Eletrônica de espécies de Blechnaceae: <i>Woodwardia</i>	50
Figura 13-	Dendrograma combinado de dados quantitativos por análise hierárquica de aglomeração (AHC) das espécies de Blechnaceae	67
Figura 14-	Gráfico bidimensional representando as espécies da família Blechnaceae	68

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	MATERIAL E MÉTODOS	23
1.1	Material examinado	23
1.2	Tratamento acetolítico	23
1.3	Mensuração e estatística	24
1.4	Microscopia de luz (ML)	25
1.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	25
1.6	Terminologia adotada	25
1.7	Análise multivariada de dados	25
2	RESULTADOS	28
2.1	Morfologia dos esporos de gêneros da família Blechnaceae	28
2.1.1	<u><i>Austroblechnum</i> Gasper & V.A.O.Dittrich</u>	28
2.1.2	<u><i>Blechnum</i> L.</u>	29
2.1.3	<u><i>Cranfillia</i> Gasper & V.A.O.Dittrich</u>	30
2.1.4	<u><i>Diploblechnum</i> Hayata</u>	31
2.1.5	<u><i>Doodia</i> R. Br</u>	31
2.1.6	<u><i>Icarus</i> Gasper & Salino</u>	32
2.1.7	<u><i>Lomaria</i> Willd.</u>	32
2.1.8	<u><i>Lomaridium</i> C.Presl</u>	33
2.1.9	<u><i>Lomariocycas</i> (J.Sm.) Gasper & A.R. Sm.</u>	33
2.1.10	<u><i>Neoblechnum</i> Gasper & V.A.O.Dittrich</u>	34
2.1.11	<u><i>Parablechnum</i> C.Presl</u>	34
2.1.12	<u><i>Sadleria</i> Kaulf.</u>	35
2.1.13	<u><i>Struthiopteris</i> Scop.</u>	36
2.1.14	<u><i>Salpichlaena</i> J. Sm.</u>	36
2.1.15	<u><i>Stenochlaena</i> J. Sm.</u>	37
2.1.16	<u><i>Telmatoblechnum</i> Perrie, D.J.Ohlsen & Brownsey</u>	38
2.1.17	<u><i>Anchistea</i> C.Presl</u>	38
2.1.18	<u><i>Woodwardia</i> Sm.</u>	38
2.2	Análise multivariada dos dados morfométricos dos esporos das espécies de Blechnaceae	65
2.3	Tamanho dos esporos	66

3	DISCUSSÃO	72
3.1	Ornamentação da superfície	72
3.2	Número de camadas	75
3.3	Análise morfométrica	76
	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79
	ANEXO A – Material examinado	83
	ANEXO B – Matriz de dados da análise de componentes principais (PCA)	88
	ANEXO C– Artigo publicado com resultados parciais	90

INTRODUÇÃO

Blechnaceae Newman, uma família de samambaias leptosporangiadas, é um grupo monofilético (SMITH *et al.*, 2006; ROTHFELS *et al.*, 2012, PPG-1, 2016), representado por ca. de 250 espécies (PPG-1, 2016; DITTRICH *et al.*, 2017). A família é subcosmopolita, com dois centros de diversidade e endemismo, Neotrópico e Austrália/Oceania (DITTRICH *et al.*, 2007), com dominância de gêneros e espécies no hemisfério Sul.

Embora seja reconhecida como monofilética, a relação infragenérica foi controversa por muito tempo, resultando em diferentes classificações ao longo do tempo e provocando várias discussões para o estabelecimento das relações do grupo (Tabela 1).

SMITH *et al.* (2006) colocou a família em Polyodiales, grupo Eupolypods II, os autores reconheceram a família como monofilética e *Blechnum* L. como parafilético. ROTHFELS *et al.* (2012) confirmaram a monofilia da família. WANG *et al.* (2013) reconheceram 14 gêneros, destes 8 da China: *Diploblechnum* Hayata, *Brainea* J.Sm., *Stenochlaena* J.Sm., *Woodwardia* Sm, *Chieniopteris* Ching, *Blechnidium* T Moore., *Blechnum* L. e *Struthiopteris* Scopoli.

Blechnum é o gênero mais diverso (TRYON & TRYON, 1982), e claramente polifilético (CRANFILL & KATO, 2003, ROTHFELS *et al.*, 2012, GABRIEL Y GALÁN *et al.*, 2013, PERRIE *et al.*, 2014, GASPER *et al.*, 2017). Nas propostas mais recentes de filogenia de Blechnaceae, GABRIEL Y GALÁN *et al.* (2013) utilizaram 18 espécies para mostrar a divergência entre dados morfológicos e moleculares. No entanto, estes autores não incluíram espécies australianas em suas análises.

PERRIE *et al.* (2014), utilizando amostras da Australásia e Oceania sugeriram 7 gêneros (*Blechnum* L., *Brainea* J.Sm., *Salpichlaena* J.Sm., *Sadleria* Kaulf., *Stenochlaena* J.Sm, *Telmatoblechnum* Perrie *et al.* e *Woodwardia* Sm.), alteraram a circunscrição de *Blechnum* segregando duas espécies em um novo gênero (*Telmatoblechnum*). GASPER *et al.* (2016) sugeriram uma nova classificação para a família. Sua filogenia apontou três grandes clados monofiléticos, que foram reconhecidos como três subfamílias, com um total de 24 gêneros (Tabela 2). O autor utilizou um conjunto de dados dos dois principais centros de diversidade (Neotropical, Australásia/Oceania), com uma amostragem de 60% de representantes neotropicais.

Histórico da morfologia dos esporos da família Blechnaceae

Em um levantamento sobre as primeiras ilustrações de esporos de Samambaias e Licófitas (PRELS, (1836) demonstrou que esse caráter poderia ser utilizado no estudo de taxonomia, caracterizando a morfologia dos esporos quanto à estrutura, forma e ao tipo de ornamentação. Os esporos da família Blechnaceae foram inicialmente estudados por ERDTMAN (1957), o autor descreveu e ilustrou vários polens e esporos pertencentes ao grupo das Gmnospermas, Pteridófitas e Briófitas. Em 1971 ERDTMAN & SORSA analisaram ca. 30 espécies da região Austrália/Oceania.

NAYAR & DEVI (1964), descreveram três espécies de *Blechnum* L. e uma espécie de cada gênero de *Doodia* R. Br., *Woodwardia* Sm. e *Stenochlaena* J. Sm. Os autores concluíram que morfologicamente *Blechnum* é mais derivado do que *Woodwardia*, pois este gênero possui esporos maiores e com dobras altas. *Stenochlaena* é diferente de todos os gêneros analisados, a exina e a perina possuem a ornamentação verrugada.

Com o objetivo inferir sobre a forma e o tamanho dos esporos de espécies híbridas, MORBELLI (1974) fez a análise de 2 híbridos de *Blechnum*, e classificou os esporos em três categorias: normais, anormais e abortados. Segundo a autora, os esporos normais são de número reduzido e sem variações significativas quanto à forma e ao tamanho. Os esporos anormais apresentaram variações quanto à simetria, podendo ser bilaterais com cicatriz monolete ou radiais, ou aletas, circulares. Quanto à dimensão houve variações quanto aos valores médios, podendo apresentar tamanho pequeno ou extremamente grande. Podem estar isolados ou em díades, com desenvolvimento incompleto das paredes da perina. Cada unidade da díade pode possuir o mesmo tamanho ou tamanho diferente, nesse caso uma de tamanho normal ou gigante enquanto a outra é muito menor, reduzida a um apêndice apenas.

Em 1976, MORBELLI elaborou uma chave de identificação baseada na morfologia de espécies austro-americanas do gênero *Blechnum* L., utilizando apenas a ornamentação da perina.

TRYON & TRYON (1982), utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV), avaliaram três gêneros de Blechnaceae: *Salpichaena* J. Sm. (uma espécie), ocorrente no Neotrópico, *Blechnum* L. (10 espécies) e *Woodwardia* Sm. (três espécies).

TRYON & LUGARDON (1991), em sua obra que se tornou referência para o grupo, descreveram, palinologicamente, nove gêneros de Blechnaceae: *Woodwardia* Sm. (seis espécies), *Pteridoblechnum* Hennipman (uma espécie), *Steenisoblechnum* Hennipman (uma espécie), *Doodia* R. Br. (três espécies), *Sadleria* Kaulf. (duas espécies), *Brainea* J.Sm. (uma espécie), *Stenochlaena* J. Sm. (três espécies), *Salpichaena* J.Sm. (duas espécies) e *Blechnum* L. (20 espécies) baseado principalmente MEV.

SYLVESTRE (1995) já ressaltou a escassez de trabalhos com esporos de pteridófitas no Brasil, sendo a abordagem restrita a poucos gêneros ou em estudos de aeropalinologia e paleopalinologia. A referida autora analisou e descreveu os esporos da família Polypodiaceae s.l. do planalto de Itatiaia, estado do Rio de Janeiro, incluindo cinco espécies de *Blechnum* L.

PASSARELLI (2007) descreveu sete espécies de *Blechnum* L. pertencentes ao grupo *Blechnum penna-marina*. Passarelli *et al.* (2010) analisaram 64 espécies e relacionaram os padrões de ornamentação com as formas de vida das espécies. Estes autores avaliaram ainda a relação entre a ornamentação e a complexidade da estrutura da perina. Além de ressaltarem a importância da morfologia dos esporos, que juntamente com outros atributos morfológicos, garantiriam uma classificação robusta à luz dos recentes estudos sistemáticos.

COELHO & ESTEVES (2008) analisaram sete espécies da família Blechnaceae do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga em São Paulo, destacando a existência de uma superfície laminar nos esporos. Segundo os autores, a característica estaria presente em toda família diferenciando-a entre todas as pteridófitas.

RAMOS GIACOSA *et al.* (2009) analisaram a morfologia e a ultraestrutura de 10 espécies de *Blechnum* L. do noroeste da Argentina.

SIGEL (2016), em seu estudo genético em híbridos de samambaias, destacou que os híbridos homoploides, os que possuem o número normal de cromossomos, apresentavam uma taxa de fertilização imprevisível. A produção de esporos viáveis poderia apresentar variações funcionais entre os cruzamentos, seja entre indivíduos distintos ou até mesmo nos esporângios de um mesmo indivíduo.

MORAN *et al.* (2018), utilizando a filogenia de GASPER *et al.* (2017), avaliaram sob microscopia eletrônica de varredura, alguns caracteres da exina e da perina da família Blechnaceae, como a arquitetura geral, número de camadas e tipos

de microestruturas a fim de inferir sobre a sua evolução. Os autores concluíram que os resultados corroboram os dados filogenéticos na nova classificação proposta.

SILVA *et al.* (2019) analisaram a morfologia dos esporos da família Blechnaceae da Mata Atlântica utilizando dados qualitativos, morfologia da exina e perina, e dados quantitativos compilados numa análise multivariada (Anexo C).

No Brasil, o estudo dos esporos da família Blechnaceae é raro, quando encontrado, as análises apenas descrevem a morfologia sem discutir as implicações sistemáticas do grupo e suas relações com as outras famílias. Por outro lado, estudos taxonômicos (SEHNEM, 1968; DITTRICH *et al.*, 2017) quase não mencionam a morfologia dos esporos no grupo. Diante do exposto surgiu um questionamento, se a morfologia dos esporos poderia ser utilizada como ferramenta para auxiliar a Taxonomia do grupo.

Desse modo, a hipótese para esse estudo é: será que a morfologia dos esporos da família Blechnaceae possui valor diagnóstico para estudos taxonômicos, servindo como ferramenta que auxilie a nova divisão proposta para a família?

Em vista disso, o objetivo deste trabalho é:

- avaliar se os esporos das espécies dos gêneros reconhecidos por GASPER *et al.* (2017) possuem padrões morfológicos que corroboram com a classificação proposta.

- Contribuir com o conhecimento palinológico através da descrição minuciosa dos esporos.

- Avaliar se os dados morfométricos contribuem para segregar os táxons

- Discutir os dados obtidos com a Taxonomia do grupo

Tabela 1 - Histórico da classificação da família Blechnaceae (continua)

Autor/Ano	Subfamília	Gêneros	Espécies	Observações
NEWMAN	-	-	-	Estabelecimento da família em “A History of British Ferns”
COPELAND, 1947	-	<i>Blechnum</i> L. <i>Brainea</i> J.Sm. <i>Doodia</i> R.Br. <i>Lorinseria</i> Presl <i>Sadleria</i> Kaulf <i>Salpichlaena</i> J.Sm. <i>Stenochlaena</i> J.Sm. <i>Woodwardia</i> Sm.	-	-
PICCHI-SERMOLLI, 1977	-	<i>Anchistea</i> C.Presl <i>Blechnidium</i> T. Moore <i>Blechnum</i> <i>Brainea</i> <i>Doodia</i> <i>Chieniopteris</i> Ching <i>Lorinseria</i> <i>Pteridoblechnum</i> Hennipman <i>Sadleria</i> <i>Salpichlaena</i> , <i>Stenochlaena</i> <i>Woodwardia</i>	-	-

Tabela 1 - Continuação. Histórico da classificação da família Blechnaceae (continuação)

Autor/Ano	Subfamília	Gêneros		Espécies	Observações
TRYON & TRYON, 1982	-	<i>Blechnum</i> L. <i>Brainea</i> J.Sm <i>Diploblechnum</i> Hayata <i>Doodia</i> R. Br <i>Pteridoblechnum</i> Hennipman <i>Sadleria</i> Kaulf. <i>Salpichlaena</i> J.Sm. <i>Stenochlaena</i> J.Sm. <i>Woodwardia</i> Sm.		175	3 gêneros no Novo Mundo.
KRAMER <i>et al.</i> 1990	2	Blechnoideae <i>Blechnum</i> <i>Brainea</i> <i>Doodia</i> <i>Pteridoblechnum</i> <i>Sadleria</i> <i>Salpichlaena</i> <i>Steenisoblechnum</i> Hennipman <i>Woodwardia</i>	Stenochlaenoideae <i>Stenochlaena</i>	200	-

Tabela 1 - Continuação. Histórico da classificação da família Blechnaceae (continuação)

Autor/Ano	Subfamília	Gêneros	Espécies	Observações
SMITH, 2006	-	<i>Blechnum</i> s.l. <i>Brainea</i> J.Sm <i>Doodia</i> R. Br <i>Pteridoblechnum</i> Hennipman <i>Sadleria</i> Kaulf <i>Salpichlaena</i> J.Sm. <i>Steenisoblechnum</i> Hennipman <i>Stenochlaena</i> J.Sm. <i>Woodwardia</i> Sm.	200	Agrupada em Eupolypods II, associada à Thelypteridaceae, Aspleniaceae, Woodsiaceae s.l e Onocleaceae. Monofilia da família e <i>Blechnum</i> parafilético.
ROTHFELS <i>et al.</i> 2012	-	-	200	Confirmação da monofilia da família. Reconhecimento so subclado Onocleaceae e Blechnaceae
WANG <i>et al.</i> 2013	-	<i>Blechnidium</i> T. Moore <i>Blechnum</i> L. <i>Brainea</i> <i>Chieniopteris</i> Ching <i>Diploblechnum</i> Hayata <i>Stenochlaena</i> J.Sm. <i>Struthiopteris</i> Scop. <i>Woodwardia</i>	250	8 gêneros na China.

Tabela 1 - Continuação. Histórico da classificação da família Blechnaceae (conclusão)

Autor/Ano	Subfamília	Gêneros	Espécies	Observações
PERRIE <i>et al.</i> 2014	-	<i>Blechnum</i> L. <i>Brainea</i> J.Sm <i>Sadleria</i> Kaulf. <i>Salpichlaena</i> J.Sm., <i>Stenochlaena</i> J.Sm. <i>Telmatoblechnum</i> Perrie, D. J. Ohlsen & Brownsey <i>Woodwardia</i> Sm.	200	Inclusão de <i>Pteridoblechnum</i> Hennipman, <i>Steenisiolechnum</i> Hennipman e <i>Doodia</i> R. Br. Perrie et al. (2014) em <i>Blechnum</i> . Segregação de outras espécies em um novo gênero - <i>Telmatoblechnum</i> Perrie, D.J.Ohlsen & Brownsey.
GASPER et al. 2017; PPG1, 2016; DITTRICH et al. 2017.	3	24	250	Reclassificação com novos gêneros e combinações. Subfamílias: Woodwardioideae, Stenochlaenoideae e Blechnoideae.

Tabela 2 - Classificação da família Blechnaceae segundo Gasper et al. (2017)

Subfamília/Gênero	Número de espécies
Subfamília Blechnoideae Gasper, V.A.O.Dittrich & Salino	
<i>Austroblechnum</i> Gasper & V.A.O.Dittrich	40
<i>Blechnidium</i> T.Moore	1
<i>Blechnopsis</i> C.Presl	2
<i>Blechnum</i> L.	30
<i>Brainea</i> J.Sm.	1
<i>Cleistoblechnum</i> Gasper & Salino	1
<i>Cranfillia</i> Gasper & V.A.O.Dittrich	11
<i>Diploblechnum</i> Hayata	6
<i>Doodia</i> R.Br.	19
<i>Icarus</i> Gasper & Salino	1
<i>Lomaria</i> Willd.	6
<i>Lomaridium</i> C.Presl	1
<i>Lomariocycas</i> (J.Sm.) Gasper & A.R.Sm.	19
<i>Neoblechnum</i> Gasper & V.A.O.Dittrich	1
<i>Oceaniopteris</i> Gasper & Salino	8
<i>Parablechnum</i> C.Presl	65
<i>Sadleria</i> Kaulf.	6
<i>Struthiopteris</i> Scop.	5
Subfamília Stenochlaenoideae (Ching) J.P.Roux	
<i>Salpichlaena</i> J.Sm.	3
<i>Stenochlaena</i> J.Sm.	7
<i>Telmatoblechnum</i> Perrie, D.J.Ohlsen & Brownsey	2
Subfamília Woodwardioideae Gasper, V.A.O.Dittrich & Salino	
<i>Anchistea</i> C.Presl	1
<i>Lorinseria</i> C.Presl	1
<i>Woodwardia</i> Sm.	13
Total	250

1 MATERIAL E MÉTODOS

Para a análise dos esporos foram utilizadas plantas herborizadas provenientes de exsicatas depositadas nos seguintes herbários: Australian National Herbarium (CANB), Australian National Botanic Gardens (CBG), Herbarium Bradeanum (HB), Herbário da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB), Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HRJ), Muséum National d'Histoire Naturelle (P), Herbário do Museu Nacional (R) e Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB). As siglas estão de acordo com *Index Herbariorum* (THIERS *et al.* continuamente atualizado).

1.1 Material examinado

Foram analisados os esporos de 53 espécies e um híbrido, subordinados a 18 gêneros (Anexo A), a saber, *Anchistea* C. Presl, *Austroblechnum* Gasper & V.A.O.Dittrich, *Blechnum* L., *Cranfillia* Gasper & V.A.O.Dittrich, *Diploblechnum* Hayata, *Doodia* R.Br., *Icarus* Gasper & Salino, *Lomaria* Willd., *Lomaridium* C.Presl, *Lomariocycas* (J.Sm.) Gasper & A.R. Sm., *Neoblechnum* Gasper & V.A.O. Dittrich, *Parablechnum* C.Presl, *Sadleria* Kaulf., *Sapichlaena* J.Sm., *Stenochlaena* J.Sm., *Struthiopteris* Scop., *Telmatoblechnum* Perrie, D.J.Ohlsen & Brownsey e *Woodwardia* Sm. Não foi possível obter as amostras dos gêneros *Blechnidium* T. Moore, *Blechnopsis* C.Presl, *Brainea* J.Sm., *Cleistoblechnum* Gasper & Salino, *Lorinseria* C.Presl e *Oceaniopteris* Gasper & Salino que não foram incluídos nessa análise, por não ter sido possível a aquisição de material ou pelos mesmos não estarem com esporos viáveis. A discussão sobre os referidos gêneros foi baseada nos resultados em bibliografia pertinente.

Para cada espécie estudada foi escolhido um espécime considerado padrão, indicado por asterisco (*) anteposto aos dados do coletor, utilizado para a realização das descrições e ilustrações (Anexo A).

Sempre que possível, procurou-se estudar até três espécimes de cada espécie, denominados "material de comparação" com a finalidade de se estabelecer a variação morfométrica dos espécimes.

1.2 Tratamento acetolítico

Para reconhecer os padrões de ornamentação e estratificação da esporoderma foi utilizada a observação sob microscopia de luz (ML). Os esporos

foram preparados segundo o método acetolítico de ERDTMAN (1952), com as modificações propostas por MELHEM *et al.* (2003). Os esporos acetolisados foram medidos até sete dias após sua preparação (SALGADO-LABOURIAU, 1973), as espécies analisadas foram: *Austroblechnum divergens* (Kunze) Gasper & V.A.O. Dittrich, *A. lehmannii* (Hieron.) Gasper & V.A.O. Dittrich, *Blechnum. asplenioides* Sw., *B. auriculatum* Cav., *B. fraxineum* Willd., *B. gracile* Kaulf., *Cranfillia mucronata* (Fée) V.A.O. Dittrich & Gasper *Lomaridium plumieri* (Desv.) C. Presl, *Salpichlaena volubilis* (Kaulf.) J.Sm., *Telmatoblechnum serrulatum* (Rich.) Perrie, D.J.Ohlsen & Brownsey e *Woodwardia spinulosa* M.Martens & Galeotti.

Para os esporos que demonstraram fragilidade à metodologia de acetólise de ERDTMAN (1952), foi utilizada a acetólise láctica a 40% (RAYNAL & RAYNAL, 1971). Os esporos foram medidos, observados e fotomicrografados até três dias após sua preparação (WANDERLEY & MELHEM, 1991). Em algumas espécies, para melhor visualização da forma da perina, alguns esporos foram tratados segundo o método de Woodehouse (1935).

1.3 Mensuração e estatística

As medidas foram feitas em microscópio de luz com objetivas nos aumentos de 40 X e 100 X. As lâminas utilizadas no estudo foram depositadas na Palinoteca do Laboratório de Palinologia Álvaro Xavier Moreira, no Departamento de Botânica do Museu /UFRJ.

De acordo com o esquema da figura 1, foram tomadas, ao acaso, 25 medidas do diâmetro polar (DP) e 25 medidas do diâmetro equatorial (DE) dos esporos em vista equatorial. Em vista polar, foram tomadas 10 medidas do diâmetro maior (DM) e diâmetro menor (Dm). As medidas foram obtidas em um mínimo de três lâminas. Para cada espécie, foram realizadas 10 medidas da cicatriz em vista polar e 10 medidas da espessura da exina e da perina, em vista equatorial.

Foram estabelecidos, baseados nas medidas encontradas na cicatriz, os seguintes tamanhos: pequeno (8,8-11,4 μm), médio (11,5-13,9 μm) e grande (a partir de 14,0 μm).

Todas as medidas foram tratadas estatisticamente, determinando-se as médias aritméticas (\bar{x}); o desvio padrão da amostra (s); o desvio padrão da média ($s\bar{x}$), o intervalo de confiança a 95% (I.C) e o coeficiente de variabilidade (CV%). Os resultados do tratamento estatístico foram expressos em forma de tabelas.

1.4 Microscopia de luz (ML)

As imagens dos esporos capturadas em microscopia de luz foram realizadas com auxílio de câmera digital Canon Power Shot G6 acoplada ao microscópio Zeiss Axiostar Plus, na objetiva de 100X. As ilustrações representam os esporos em vista polar e equatorial, detalhando a ornamentação da perina.

1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV), os esporângios foram rompidos e os esporos, não acetolisados, foram pulverizados sobre suportes recobertos por fita de carbono (MELHEM *et al.*, 2003). O conjunto foi metalizado com uma camada de ouro puro por cerca de 3 minutos, posteriormente foram analisados em aparelho JSN 6510- LV no Instituto de Química, no Laboratório de Polímeros da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e em aparelho Jeol, JSM 6390 do Departamento de Invertebrados do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

1.6 Terminologia adotada

A terminologia utilizada foi a de PUNT *et al.* (2007) e BARTH & MELHEM (1988) levando-se em consideração o tamanho, o contorno do esporo e o padrão de ornamentação da exina e perina.

1.7 Análise multivariada dos dados

A análise exploratória dos dados foi realizada utilizando o Programa PC-ORD versão 5.31 (MCCUNE & MEFFORD, 2011). Os atributos morfológicos dos esporos das espécies analisadas foram organizados em uma matriz de um total de oito variáveis (Tab.7). Para melhor organização nos gráficos, abreviou-se o nome das espécies com as primeiras quatro letras dos epítetos, exceto o híbrido *Blechnum caudatum* Cav., *Doodia australis* Parris e *D. caudata* (Cav.) R. Br. que tiveram a inicial do gênero precedido à abreviação. Os atributos polínicos foram expressos pelas iniciais que os definem.

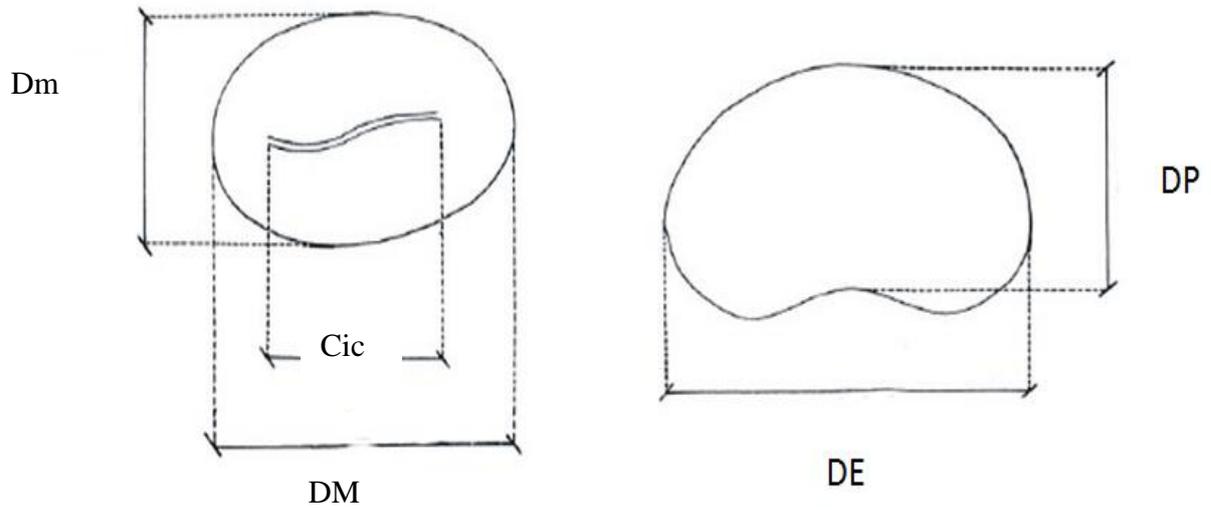
As variáveis morfométricas incluídas na análise multivariada foram: DP (diâmetro polar), DE (diâmetro equatorial), DM (diâmetro maior), Dm (diâmetro menor) CiC (cicatriz), sexina (sex), nexina (nex) e perina (per).(Tab.7).

A matriz utilizada para análise multivariada (PCA e Cluster) foi transformada pela raiz quadrada de potência 0,5 a fim de padronizar os dados mensuráveis.

Para a ordenação das variáveis, realizou-se a análise de componentes principais (PCA) para verificar se os atributos morfológicos permitem o agrupamento das espécies. A matriz de variância e a covariância (var-cov) (Anexo B) foram obtidas a partir da média dos dados morfométricos na análise palinológica, coordenadas em um gráfico biplot com base na distância euclidiana. Os resultados foram mostrados em um gráfico bidimensional com o primeiro e segundo componente principal. Os valores dos vetores em cada eixo e o total da variância acumulativa foram representados em tabelas.

A análise de agrupamento (Cluster-AHC) foi realizada com o objetivo de classificar as espécies em grupos que compartilham (similaridade) variáveis medidas. Foram considerados dois aspectos em relação aos grupos formados e ao conjunto de variáveis analisadas: o percentual de informações necessárias para chegar aos grupos, associado à quantidade final de grupos formados. Na análise de Cluster (AHC), foi construído um dendrograma, usando a medida de distância euclidiana (CACCAVARI *et al.*, 2008) com método de linkage Ward's

Figura 1 - Esquema dos diâmetros dos esporos utilizados nas análises morfométricas das espécies de Blechnaceae.



Dm (diâmetro menor), DM (diâmetro maior), Cic (cicatriz), DE (diâmetro equatorial), DP (diâmetro polar).
Modificado RAMOS GIACOSA *et al.* 2009.

REFERÊNCIAS

- BARTH, O.M. & MELHEM, T.S. Glossário Ilustrado de Palinologia. Campinas: Ed. Unicamp, 1988. 75p.
- CACCAVARI MA, NAAB AO, TAMAME MA. Palynological and physicochemical characteristics of three unifloral honey types from central Argentina. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6: 566-576. 2008.
- COELHO, C.B. & ESTEVES, L. M. Morfologia de esporos de pteridófitas do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil): Blechnaceae. *Hoehnea*, 35(3): p. 387-393. 2008.
- COPELAND, E.B. Genera Filicum - the genera of ferns. *Annales Cryptogamici et Phytopathologici*, 5, p. 1–247. 1947.
- CRANFILL, R.B. & KATO, M. Phylogenetics, biogeography and classification of the woodwardioid ferns (Blechnaceae). *In: Chandra, S. & Srivastava, M. (Eds.) Pteridology in the New Millennium*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 25–48. 2003. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-017-2811-9_4
- DITTRICH, V.A.O.; HERINGER, G.; SALINO, A. Blechnaceae. *In: Cavalcanti, T.B., Ramos, A.E. (Eds.), Flora Do Distrito Federal. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brasília, 2007. p. 91–108.
- DITTRICH, V.A.O; SALINO, A; MONTEIRO, R; GASPER. A.L de. The family Blechnaceae (Polypodiopsida) in Brazil: key to the genera and taxonomic treatment of *Austroblechnum*, *Cranfillia*, *Lomaridium*, *Neoblechnum* and *Telmatoblechnum* for southern and southeastern Brazil. *Phytotaxa*, 303 (1), 1–33. 2017.
- ERDTMAN, G. Pollen morphology and plant taxonomy – Angiosperms. *Almqvist & Wiksell, Stockhol.*, The Chronica Botanica CO, 1952. p. 189-190.
- _____ Pollen and spore morphology/plant taxonomy. Gymnospermae, Pteridophyta, Bryophyta (Illustrations). An introduction to palynology II. The Chronica Botanic Company, Stockholm. 1957.
- _____ Handbook of palynology. Morphology, Taxonomy, Ecology. New York. *Hafner Publishing Company*. 1969. p.486.
- ERDTMAN, G.; SORSA, P. *Pollen and Spore Morphology and Plant Taxonomy: Pteridophyta* (text and additional illus.) with special chapters by J. Pettitt and B. Gullvag. Editora Almqvist & Wiksell. 1971. p. 302.
- GABRIEL Y GALAN; PRADA, C.; ROLLERI, C.H.; AINOUCHE, A.; VICENT, M. cpDNA supports the identification of the major lineages of American *Blechnum* (Blechnaceae, Polypodiopsida) established by morphology. *Turkish Journal of Botany*. 37, 769–777.2013.

- GASPER, A.L.; DITTRICH, V.A.O; SMITH. A.R. & SALINO, A. A classification for Blechnaceae (Polypodiales: Polypodiopsida): New genera, resurrected names, and combinations. *Phytotaxa*, 275 (3), p. 191-227. 2016.
- GASPER, A.L.; ALMEIDA, T.E; DITTRICH, V.A.O; SMITH. A.R; SALINO, A. Molecular phylogeny of the fern family Blechnaceae (Polypodiales) with a revised genus-level treatment. *Cladistics* 33(4): 429-446. 2017.
- KRAMER, K. U.; CHAMBERS, T.C.; HENNIPMAN, E. Blechnaceae. In: Kramer, K.U. Green, P. S. (Eds.). *The Families and Genera of Vascular Plants.v.1. Pteridophytes and Gymnosperms. Springer-Verlag Wien, Berlin, 1990. p. 60–68.*
- LLOYD, R. M. Spore Morphology of the Hawaiian Genus *Sadleria* (Blechnaceae). *American Fern Journal*, Vol. 66 (1), p. 1-7. 1976.
- MCCUNE B, MEFFORD MJ. 2011. PC-ORD. *Multivariate Analysis of Ecological Data*. Version 6. Gleneden Beach, MjM Software.
- MELHEM, T.S.; CRUZ-BARROS, M.A.V.; CORRÊA, A.M.S.; Makino-Watanabe, H.; SILVESTRE-CAPELATO, M.S.; ESTEVES, V.L.G. Morfologia polínica em plantas de Campos do Jordão (São Paulo, Brasil). *Boletim do Instituto de Botânica*, 16. p. 1-104. 2003.
- MORAN RC, HANKS JG, LABIAK PH. Evolution of spore morphology in the Blechnaceae. *International Journal of Plant Sciences* v. 179: 000-000. 2018.
- MORBELLI, M. A. Análisis palinológico en híbridos interespecíficos del género *Blechnum* L. subgénero *Blechnum* (Blechnaceae–Pteridophyta). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, v. 15 (4), p. 447-465. 1974.
- _____ Estudio palinológico de las especies austrosudamericanas Del género *Blechnum* L. subgénero *Blechnum* (Blechnaeace–Pteridophyta). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* , v. 17 (1–2), p. 155–175. 1976.
- NAYAR, B. K. & DEVI, S. Spore morphology of Indian ferns II. Aspleniaceae and Blechnaceae. *Grana Palynologica*, 5 (2), p. 222-246. 1964.
- NEWMAN, E. *A history of British ferns*. J. van Voorst. 1854.
- PASSARELLI, L. M. Estudios esporales en especies del grupo *Blechnum penna-marina* (Blechnaceae-Pteridophyta). *Acta Botanica Malacitana*, 32. p. 49-66. 2007.
- PASSARELLI, L.M.; GABRIEL Y GALÁN, J.M.; PRADA, C.; ROLLERI, C.H. Spore morphology and ornamentation in the genus *Blechnum* (Blechnaceae). *Grana*, 49, p. 243–262. 2010.

- PERRIE, L.R.; WILSON, R.K.; SHEPHERD, L.D.; OHLSEN, D.J.; BATTY, E.L.; BROWNSEY, P.J.; BAYLY, M.J.; Molecular phylogenetics and generic taxonomy of Blechnaceae ferns. *Taxon*, 63, p. 745–758. 2014.
- PICHI SERMOLLI, R.E.G., Tentamen Pteridophytorum genera in taxonomicum ordinem redigendi. *Webbia*, 31, p. 313–512. 1977.
- PPG I, The Pteridophyte Phylogeny Group. Eric Schuettpelz & Harald Schneider (Org). Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences. *Journal of Systematics and Evolution* 54(6): p. 563-603. 2016.
- PRESL, C. B. Tentamen Pteridographie seu Genera Filicacearum praesertim juxta venarum decursum et distributionem exposita. Prague. *Haase*. 1836.p. 340.
- PUNT, W.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S. & LE THOMAS. A. Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Paleobotany and Palynology*, 143: p.1-81. 2007.
- RAMOS GIACOSA, J. P., MORBELLI, M. A., e GIUDICE, G. E. Spore morphology and wall ultrastructure of *Blechnum* L. species from North West Argentina. *Review of Paleobotany and Palynology*, 156(1-2), 185–197. 2009
- RAYNAL, J. & RAYNAL, A. Une technique de preparation des grains de pollen fragiles. *Andansonia*. 1971. 11: p. 77-79
- ROTHFELS, C.J.; SUNDUE, M.A.; KUO, L.Y.; LARSSON, A.; KATO, M.; SCHUETTPELZ, E. & PRYER, K.M. A revised family-level classification for eupolypod II ferns (Polypodiidae: Polypodiales). *Taxon*, 61: p. 515–533. 2012.
- ROUX, J.P. Conspectus of Southern African Pteridophyta: In *Enumeration of the Pteridophyta of Angola, Botswana, Lesotho, Malawi, Mozambique, Namibia, South Africa (including the Marion Island Group), Swaziland, Zambia and Zimbabwe*. Sabonet, Pretoria, 223 pp. 2001.
- SALGADO-LABOURIAU, M. L. *Contribuição à palinologia dos cerrados*. Academia Brasileira de Ciências. 1973. p. 291.
- SEHNEM, A. 1968. Blechnáceas. In: R. Reitz (ed.). *Flora Ilustrada Catarinense*. BLEC. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, pp. 1–90.
- SIGEL, E.M. Genetic and genomic aspects of hybridization in ferns. *JSE Journal of Systematics and Evolution*, 54 (6), p. 638-755. 2016. <http://doi:10.1111/jse.12226>.
- SILVA, D.M; SYLVESTRE, L.S; MENDONÇA, C.B.F., ESTEVES, V.G. Pollinic diversity of Blechnaceae in the Atlantic Forest. *Acta Botanica Brasilica* 33: p.0102. 2019.
- SMITH, A.R.; PRYER, K.M.; SCHUETTPELZ, E.; KORALI, P.; SCHNEIDER, H. & WOLF, P.G. A classification for extant ferns. *Taxon*, 55(3): p. 705-731. 2006.

- SYLVESTRE, L, da S. Palinologia das Polypodiaceae *sensu lato* do Planalto de Itatiaia, Rio de Janeiro, Brasil. *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro* 33(1): 1995. p. 9-73.
- THIERS, B [continuously updated]. Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. *New York Botanical Garden's Virtual Herbarium*. <http://sweetgum.nybg.org/ih> 15 Jun. 2018
- TRYON, A.F. Fern spores: evolutionary levels and ecological differentiation. *Plant Systematics and Evolution* (Supp, 5): p. 71 -79. 1990.
- TRYON, A.F. & LUGARDON, B. 1991. Spores of Pteridophyta: surface, wall structure, and diversity based on electron microscope studies. *Springer Verlag*, New York.
- TRYON, R.M. & TRYON, A.F. Ferns and allied plants - with special reference to Tropical America. *Springer-Verlag*, New York: 1982. p. 857.
- WANDERLEY, M.G.L. & MELHEM, T.S. Flora Polínica da Reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil). Família: 178 - Bromeliaceae. *Hoehnea*, 18: p. 5-42. 1991.
- WANG, F.G., XING, F.W., DONG, S.Y. e KATO, M. Blechnaceae. In: Wu, Z.Y., Raven, P.H. & Hong, D.Y. (Eds.) *Flora of China*, Vol. 2–3 (Pteridophytes). Beijing: Science Press, St. Louis, pp. 411–417. 2013
- WODEHOUSE, R.P. Pollen grains. *Their structure, identification and significance in science and medicine*. McGraw-Hill Book Company, New York. 1935.

ANEXO A - Material examinado

Anchistea virginica (L.) C. Presl – ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. *G.D.E* s/n, HB73624; *Hagonah* 811*, HB7709.

Austroblechnum andinum (Baker) Gasper & V.A.O. Dittrich – BRASIL. *Salino* 15700, BHCB160949; *Brade* s/n*, HB38753.

Austroblechnum divergens (Kunze) Gasper & V.A.O. – BRASIL. *Mota* 1538 *et al.*, BHCB73942; *Salino* 6252 *et al.*, BHCB57670; *Brade & Lima* 11608*, R221848.

Austroblechnum lehmannii (Hieron.) Gasper & V.A.O. Dittrich – BRASIL. *Brade* 10200*, R2107.

A. lherminieri (Bory) Gasper & V.A.O. Dittrich – BRASIL. *Brade* 9554, R227189; *Brade* 8265*, R 227190.

A. microphyllum (Goldm.) Gasper & V.A.O. Dittrich – CHILE. *Emmerich* 3313*, HB5000.

Austroblechnum penna-marina (Poir.) Gasper & V.A.O. Dittrich – BRASIL. *Silva* 267* & *Sylvestre* L.S., HRJ12807; *R. Reitz* 2042, R49041.

Austroblechnum squamipes (Hieron.) Gasper & V.A.O. Dittrich – BRASIL. *Salino* 11979*, BHCB110149.

A. vallegrandense (M.Kessler & A.R.Sm.) Gasper & V.A.O. Dittrich – BOLÍVIA. *Almeida* 3090*, BHCB156552.

Blechnum anthracinum R.C.Moran – BOLÍVIA. *Windisch* s/n*, HB82605.

Blechnum asplenioides Sw. – BRASIL. *Krieger* 20374* *et al.*, R201018.

Blechnum auriculatum Cav. – BRASIL. *Pereira & Pabst* 7971*, HB31029.

Blechnum austrobrasilianum de la Sota – BRASIL. *Salino* 13634* *et al.*, BHCB122792; *Salino* 10487 & Almeida, BHCB99532; *Santos* 981 *et al.*, RB535762.

Blechnum fraxineum Willd. – BRASIL. *Mosén* 2100, R774; *Brade* 8410*, R1575232; *Sparnagel* 500, R13782.

Blechnum gracile Kaulf. – BRASIL. *Salino* 2587, BHCB31616; *Leoni* 746*, HB78387.

Blechnum lanceola Sw. – BRASIL. *Jascone* 779 *et al.*, HB91701; *Oliveira* 50, BHCB43443; *Duarte* 10233*, HB45415.

B. meridense Klotzsch – BRASIL. *G. Hatschbach* 23134, HB50445; *Pabst* 6081, HB22574; *Pabst* 6749*, HB22545.

Blechnum occidentale L. – BRASIL. *Brade* 10320*, R28083; *Rondon* 67758, R225949.

Blechnum polypodioides Raddi – BRASIL. *Silva* 265*, HRJ12805; *Souza Araújo* R121981; *Diogo* s/n, R775. , s/coletor, R30102.

Blechnum × *caudatum* Cav. (*Blechnum occidentale* L. × *Blechnum gracile* Kaulf.) – BRASIL. *Salino* 43*, BHCB23369; *Salino* 6795 & *Morais*, BHCB59244.

Cranfillia caudata (Baker) V. A. O. Dittrich & Gasper – BRASIL. BHCB147619; *Fernandes* 896* BHCB147960.

Cranfillia mucronata (Fée) V. A. O. Dittrich & Gasper – BRASIL. *Salino* 13818 *et al.*, BHCB12472; *Brade* 10251*, R21806; *Sampaio*, 4666, R16054.

Dipoblechum fraseri Hayata – NEW ISLAND. *Th. Raulf* s/n*, HB54191.

Doodia aspera R. Br. – AUSTRALIAN. *Dahl* 8774*, CANB515480; *Telford* 24445, CBG24445; *Bailey* 149, CANB 514423.

Doodia australis Parris – NEW ZEALAND. Sykes 1574, CANB525584; AUSTRALIAN. Carroll s/n, CBG17486; *Beaglehole* 5976*, CANB141847.

Doodia caudata R. Br. – AUSTRALIAN. Jones 11651, CBG9704670; Latz 6622, CANB267094; Jones 1829, CBG8506313; *Constalle* s/n*, RB119969.

Doodia dives Kunze – INDONESIA. *Moussel* 460*, P1605264.

Doodia paschalis C.Chr. – CHILE. *Christenhusz* 5047, P1625249.

Icarus filimorfis (A. Cunn.) Gasper & Salino – NEW ZEALAND. *Kirk* 1875, P1606551.

Lomaria spannagelii (Rosenst.) Gasper & V. A. O. Dittrich – BRASIL. *Costa* 269, BHCB136961; *Salino* 11940*, BHCB110110.

Lomaridium plumieri (Desv.) C. Presl – BRASIL. *Sousa* 20, BHCB101285; *Pabst* 6977*, HB22786.

Lomariocycas buchtienii (Rosenst) Gasper & A.R. Sm. – COSTA RICA. *Yatskievych* 86-11*, HB 860049.

Lomariocycas obtusifolia (Ettingsh.) Gasper & A.R.Sm. – BRASIL. *Anderson* 6403*, HB69597.

Lomariocycas schomburgkii (Klotzsch) Gasper & A. R. Sm. – BRASIL. *Silva* 268* e *Sylvestre*, L. S., HRJ12796; s/nome, R121926.

Neoblechnum brasiliense (Desv.) Gasper & V. A. O. Dittrich – BRASIL. *Santos* 1849*, R221614); s/nome, R221617; *Pietrobon* 3263, HB77233.

Parablechnum cordatum (Desv.) Gasper & Salino – BRASIL. *Brade* 11990*, R221843; *Anderson* 6299*, HB69589.

Parablechnum glaziovii (Christ) Gasper & Salino – BRASIL. *Hatschbach* 43618*, HB82796.

Parablechnum lineatum (Sw.) Gasper & Salino – BRASIL. *Irwin e Maxwell* s/n, HB82564; BOLÍVIA. *Windisch* s/n*, HB71740

Parablechnum proliferum (Rosenst.) Gasper & Salino – BRASIL. *Werneke* 487 & S.G. *Rezende*, BHCB818111; *Salino* 8745* *et al.*, BHCB81811; BOLÍVIA. *Windisch* 2463, HB82606; *Brade* s/n, HB38768.

Parablechnum schiedeana (Schltdl. ex C. Presl) Gasper & Salino – PANAMÁ. *Salino* 15418*, BHCB158731.

Parablechnum usterianum (Christ) Gasper & Salino – BRASIL. *Brade* 6906*, R15751; *Salino* 8808 *et al.*, BHCB82090.

Sadleria cyatheoides Kaulf. – ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. *Baldwin* s/n*, CANB2676; *Gagne & Kroft* 650, CBG8904733.

Sadleria pallida Hook. & Arn. – HAWAÍ. *John* 18703*, P1566080.

Salpichlaena volubilis (Kaulf.) J. Sm. – BRASIL. *Herbário do Colégio Catarinense* s/n*, HB78227; *Stival-Santos* 1227, RB644269; *Pietro* 2022, HB75119.

Stenochlaena areolaris (Harr.) Copel. – PAPUA-NEW GUINEA. *Croft* 1709*, CBG8904738; *Croft* 1110, CBG8904739; *Croft* 774, CBG8904741.

Stenochlaena milnei Underw. – PAPUA-NEW GUINEA. *Takeuchi* 7466*, CANB726206; *Croft* 1703-B, CBG8904743; *Croft* 1694-B, CBG8904744.

Stenochlaena palustris (Burm.f.) Bedd – TAILAND. *Tetsana et al.* 5355*, P2433178; AUSTRÁLIA. *Gray* 8883, CANB599479; *Mitchell* 3978, CANB473583.

Stenochlaena tenuifolia (Desv.) Moore – MAYOTTE. *Rakotondrainibe* 6639*, P0310465.

Continuação - Matriz das coordenadas das espécies da família Blechnaceae

Espécies	Axis (component)					
	DP	DE	DM	Dm	CIC	Perina
caud	-33.0709	0.5425	2.2590	-0.8956	-0.2545	0.4067
mucr	14.8622	-0.0660	-2.9135	-1.9857	-3.5543	3.0486
fras	-10.8299	-5.3030	1.7132	-1.3722	2.3975	0.8603
aspe	-36.7285	0.5595	3.2491	-1.8210	-1.3148	-0.1145
daust	-38.5337	0.8017	4.1200	-1.4299	-2.8827	-0.2790
dcaud	-19.0969	-0.2339	0.3023	-2.0552	1.6278	-0.8955
dive	-17.4672	0.2291	0.8208	-0.3024	0.8264	-0.6982
pasc	-26.4507	-0.5056	0.5462	-1.3905	0.3372	0.9284
fili	-7.5174	-2.7493	1.0808	-0.5902	-1.5652	2.0462
span	-3.3908	-0.3537	-2.3667	0.0607	4.1262	-0.9325
plum	11.3047	-5.4551	4.0508	1.4012	-4.3587	2.6975
buch	15.1223	11.4989	-9.3134	-4.0735	4.1024	1.3730
obtu	60.0632	-3.3799	-2.3660	-1.1752	-2.6236	0.6890
scho	13.2772	-0.2299	-0.1061	1.6472	4.0235	0.7009
bras	-13.8857	-4.8026	1.0510	-3.9072	-8.3843	-2.0791
cord	48.6069	0.9312	2.9436	-4.5434	1.2924	-2.3302
glaz	42.4612	1.6270	-1.1801	-3.9220	-1.0182	0.1030
line	25.1808	1.0195	-5.0175	-4.7782	-4.0101	0.1977
prol	12.5297	-0.8504	-3.5612	-3.5722	-4.2826	-4.4026
schi	32.1703	5.9380	3.7003	-7.0372	-2.7940	1.4126
uste	22.6738	-1.2782	-2.5178	-0.3010	1.1179	-3.6159
cyat	20.8868	-1.1105	4.1411	-0.9422	-1.1039	-1.2942
pall	8.4282	-3.3088	-3.2207	2.6681	4.5490	-0.4953
volu	50.1074	3.9502	25.5707	-0.6026	0.0808	0.4776
areo	31.0260	-23.1193	-0.7595	11.4720	-4.9918	-1.6003
miln	-12.6873	-6.1336	0.1133	2.3957	-0.0543	1.3301
palu	-23.2088	-3.1061	-3.0997	-0.2324	-0.4841	-0.2471
tenu	-15.1928	19.3883	-2.6865	5.7877	-5.5442	-0.6739
spic	-0.1824	-0.0778	-1.0865	-1.3816	4.7002	-0.7978
serr	-16.7846	-2.3690	3.1679	-1.1524	1.9360	-1.3911
fimb	33.0262	29.4682	-0.3069	9.1408	-0.0045	-0.6601
mart	35.0800	-4.9607	2.3814	2.8799	5.4599	0.2882
spin	49.5287	-2.2041	-2.7894	1.8464	1.1775	2.0253

Struthiopteris spicant (L.) F.W. Weiss – ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. Solbrig 2143*, HBHB 73716.

Telmatoblechnum serrulatum (Rich.) Perrie, D.J.Ohlsen & Brownsey – BRASIL. Santos 1781 *et al.*, R; Santos 1449*, HB1449; Souza 4522 *et al.*, R192869; Costa 325 *et al.*, R195652.

Woodwardia fimbriata Sm. – MÉXICO. Windisch 952*, HB73495.

Woodwardia martinezii Maxon ex Weath. – MÉXICO. Windisch 959*, HB73496.

Woodwardia spinulosa M. Martens & Galeotti – MÉXICO. Salino *et al.* 15746*, BHCB; Morelvas s/n, HB59568.

ANEXO B - Matriz de dados da análise dos componentes principais (PCA)

Matriz de Variância e Covariância das espécies da família Blechnaceae

Axis	Eigenvalue	% of Varianc.	Cum.% of Var.	Broken-stick Eigenvalue
1	32.399.387	87.211	87.211	12.621.262
2	2.459.187	6.620	93.830	7.977.433
3	1.255.298	3.379	97.209	5.655.519
4	489.465	1.318	98.527	4.107.577
5	430.031	1.158	99.684	2.946.620
6	109.259	0.294	99.978	2.017.854
7	4.977	0.013	99.992	1.243.882
8	3.023	0.008	100.000	580.479

Matriz das coordenadas das espécies da família Blechnaceae

Espécies	Axis (component)					
	DP	DE	DM	Dm	CIC	Perina
virg	13.0207	1.2511	1.0342	1.1763	1.7495	2.1152
andi	-25.8740	.9266	-1.1488	-0.6691	0.5122	-0.6810
diver	13.9798	-6.0779	-0.0997	0.9655	3.9138	0.2011
lehm	-7.8311	1.4345	-0.9851	-1.1120	2.0298	-1.6244
lher	-6.2533	-0.0873	-1.4185	0.2232	1.9901	0.3221
micro	-27.9507	-0.3032	-1.4522	-0.4033	0.7620	1.0292
pena	-14.2157	1.0124	-1.8976	-0.4901	1.5040	1.0817
squa	-6.0184	1.7127	0.3966	-1.2291	1.9876	0.2123
vall	-2.2528	0.7016	-0.4803	-1.0388	3.1049	-1.7959
anth	10.1375	-2.4726	-15.7411	1.8859	-3.8047	1.2729
aspl	-7.1035	-1.7667	0.9405	0.7762	1.3096	0.3529
auri	-13.3006	0.5637	0.1161	0.5933	0.3253	1.3737
aust	-27.5932	14.1280	1.8284	2.8591	-2.4402	-0.5470
frax	-12.1538	-3.1830	2.8406	1.9403	-0.2074	-0.1675
grac	-30.9753	-1.2790	1.8828	0.1866	-0.1720	0.0120
lanc	-21.4056	-2.1377	-1.3651	1.8494	1.3352	-1.0979
meri	3.4688	-3.2711	0.2876	1.9010	1.0165	1.4289
ocid	-15.3946	0.8869	0.9566	0.8327	0.2528	-0.0273
poli	-20.2209	-2.9351	4.8681	1.3946	-0.1899	-0.9222
bxca	-20.3924	-1.6077	0.6011	0.8750	-0.0092	1.3838

ANEXO C - Artigo com resultados parciais



Acta Botanica Brasilica
doi: 10.1590/0102-33062018abb0321

Spore diversity among species of Blechnaceae in the Atlantic Forest

Dilma Melo da Silva¹ , Lana da Silva Sylvestre² , Cláudia Barbieri Ferreira Mendonça³  and Vania Gonçalves-Esteves^{3*} 

Received: September 23, 2018
Accepted: March 8, 2019

ABSTRACT

The palynological diversity of Blechnaceae in the Atlantic Forest was investigated. While the monophyletic family belongs to the group of leptosporangiate ferns, a new classification proposed by recent phylogenetic study reorganizes the family and adds new genera. To expand palynological knowledge of the group, the spore morphology of 23 species and a hybrid, distributed among 10 genera, was described. Material from herbarium collections were submitted to acetolysis and mounted on slides, with subsequent statistical analysis of spore measurements. Photomicrographs of the material were taken under both light and scanning electron microscopy. Perine ornamentation varied among psilate, rugulate and scabrate; granules and gemmae were present along with thin, smooth cristae. Species of *Blechnum* and *Austroblechnum* exhibited the greatest diversity. The attributes of the spores obtained here were able to differentiate the analyzed species, although the spore morphology of some taxa was found to be very similar. Multivariate analysis assessed the relevance of quantitative data for differentiating the taxa.

Keywords: *Austroblechnum*, *Blechnum*, spore, multivariate analysis, palynology