



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI - MPEG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



PEDRO GONÇALVES DE MORAES NETO

**ASPECTOS ESTRUTURAIS E HISTOQUÍMICOS DE *Anemia* SW.
(ANEMIACEAE)**

**BELÉM
2019**

PEDRO GONÇALVES DE MORAES NETO

**ASPECTOS ESTRUTURAIS E HISTOQUÍMICOS DE *Anemia* SW.
(ANEMIACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da
Amazônia e ao Museu Paraense Emílio Goeldi, como parte
das exigências do programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, para obtenção de título de mestre.
Área de concentração: Botânica Tropical.
Orientadora: Dra. Ana Carla Feio dos Santos.

**BELÉM
2019**

PEDRO GONÇALVES DE MORAES NETO

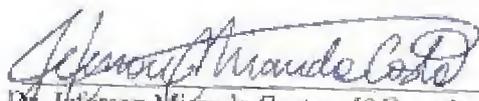
**ASPECTOS ESTRUTURAIS E HISTOQUÍMICOS DE Anemia SW.
(ANEMIACEAE)**

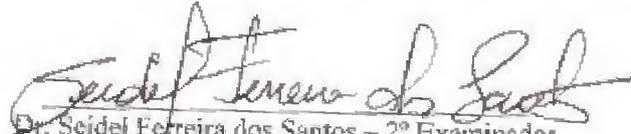
Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Botânica Tropical, da Universidade Federal Rural da Amazônia e Museu Paraense Emílio Goeldi, como parte das exigências para obtenção de título de mestre em Botânica.
Orientadora: Dra. Ana Carla Feio dos Santos.

Aprovado em 31 de maio de 2019.

BANCA EXAMINADORA


Dra. Ana Carla Feio dos Santos – Orientadora
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI – MPEG/
UNIVERSIDADE DA AMAZÔNIA – UNAMA


Dr. Jefferson Miranda Costa – 1º Examinador
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PARÁ
(IFPA-CAMPUS ABAETETUBA)


Dr. Seidel Ferreira dos Santos – 2º Examinador
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ – UEPA


Dr. Pedro Lago – 3º Examinador
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI – MPEG


Dr. André Bragança Gil – Suplente
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI – MPEG

Moraes Neto, Pedro Gonçalves de

Aspectos estruturais e histoquímicos de *Anemia* SW. (Anemiaceae) / Pedro Gonçalves de
Moras Neto; **Orientação de** Ana Carla Feio dos Santos - Belém,

2019.

60 f.

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas – Botânica Tropical, da Universidade Federal Rural da Amazônia e Museu
Paraense Emílio Goeldi, como parte das exigências para obtenção de título de mestre em
Botânica.

1.Samanbaia - Anatomia. 2. Anemiaceae. 3. Estruturas secretoras 4. Afloramentos
rochosos. I. Santos, Ana Carla Feio dos, orient. II. Título.

CDD 587.31044 (20. ed.)

Ao meu filho Gabriel in memoriam,
principal incentivador para a realizaçã
deste curso.

Aos meus pais Carlos Quaresma (Rude) e Maria da Conceição (Conce), aos meus filhos Pietro e Lorenzo, tudo foi por vocês.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Botânica Tropical UFRA/MPEG, por fazer parte de minha formação acadêmica e por toda sua infraestrutura e apoio técnico-científico durante a realização deste estudo.

Em especial, aos meus pais, Carlos Quaresma e Maria da Conceição dos Santos, meus irmãos Carla, Carol e Paulo, minha esposa Gleiciane e meus filhos Pietro e Lorenzo, que sempre me incentivaram a estudar e estiveram ao meu lado, dando força, confiança e amor. Sem o apoio de vocês a realização deste sonho não seria possível.

À orientadora Dr^a Ana Carla Feio, por ter aceitado o desafio de orientar um aluno sem experiência alguma em anatomia, pelas críticas sempre pertinentes e por ter acreditado no meu potencial, permitindo-me crescer como profissional.

À professora Dr^a Ana Claudia Caldeira Tavares Martins por ter apresentando-me na graduação este universo fascinante que é a Botânica, a senhora é exemplo de pessoa e profissional para mim.

À todos os amigos do MPEG, por tudo que vivenciamos e o que representam para mim. Em especial ao Alexandre Oliveira e ao Professor Dr. Jeferson Costa que auxiliaram as coletas de materiais botânico e aos colegas do LAVEG (Layse, Joana e Breno) por compartilharem momentos agradáveis e vários outros de incertezas.

Aos Professores Dr. Pedro Lage Viana e Dr. João Ubiratan, “Bira” assim conhecido por todos, pelo apoio financeiro para a participação no 68º Congresso Nacional de Botânica e excursão para coleta de material botânico, respectivamente.

À todos os funcionários da coordenação de Botânica do MPEG e a todos os professores da pós, que contribuíram nesta caminhada, pelo profissionalismo e compartilhamento de seus conhecimentos, muito obrigado!

Aos curadores Dr. Pedro Lage Viana (MG) e Dr^a Thaís Elias Almeida (HSTM) e ao Dr. Jovani B. de Souza Pereira (ITV) pela doação de material e acesso as coleções.

Ao Ideflor-bio pela estadia nos alojamentos durante a excursão e auxílio em campo no período de coleta na Serra das Andorinhas.

À professora Janaína pelo espaço cedido do laboratório de helmintos da UFPA para realização dos testes histoquímicos.

Aos membros da Banca Avaliadora, que aceitaram contribuir com esta pesquisa.

À minha prima Thayná com quem dividi moradia no primeiro ano de curso e a família do meu grande amigo Mairon e Luama que me acolheram ao longo do último ano de curso, serei sempre grato a vocês.

Por último e não menos importante, a Deus por ser meu refúgio e fortaleza nos vários momentos de medo e incertezas dando-me a certeza da vitória.

RESUMO

MORAES NETO, P. G. **ASPECTOS ESTRUTURAIS E HISTOQUÍMICOS DE *Anemia SW.* (ANEMIACEAE)**. 2019. 61f. Mestrado em Ciências Biológicas, Botânica Tropical) - Universidade Federal Rural da Amazônia/Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, 2019.

Anemiaceae Link é monogenérica com 115 espécies, incluídas em *Anemia Sw.* com distribuição tropical e subtropical, sendo o Brasil o principal centro de riqueza com cerca de 60 espécies das quais dez são registradas no Pará, ocorrendo principalmente, sobre afloramentos rochosos. Os trabalhos realizados com *Anemia* não expressam a riqueza e o potencial que as informações anatômicas podem fornecer frente à diversidade ecológica do gênero. Visando preencher em parte esta lacuna, este estudo descreve a anatomia de folhas estéreis de *Anemia buniifolia* (Gardner) T.Moore, *A. elegans* (Gardner) C.Presl, *A. oblongifolia* (Cav.) Sw., *A. phyllitidis* (L.) Sw., *A. presliana* Prantl e *A. trichorhiza* Gardner ex Hooker presentes em afloramentos rochosos, interpretados à luz das informações ecológicas de samambaias, os principais caracteres adaptativos, além de fornecer novos dados para taxonomia do grupo. Entre as principais características estruturais destacam-se: distribuição dos estômatos, presença de estegmatas, tipo de mesofilo, extensão de bainha, entre outras. Testes histoquímicos também foram realizados nas espécies *A. buniifolia*, *A. oblongifolia*, *A. presliana* e *A. trichorhiza*, coletadas de populações naturais, com resultados positivos para compostos fenólicos, alcaloides, polissacarídeos e proteínas, em estruturas como idioblastos, tecidos secretores e tricomas glandulares. Os resultados demonstraram que diversas características estruturais e histoquímicas, presentes em *Anemia*, estão diretamente relacionadas à redução da perda de água, possuindo valor adaptativo à ambientes extremos com alta intensidade luminosa e déficit hídrico, como os afloramentos rochosos. Entre essas, há características multifuncionais, atuando também contra a herbivoria, como tricomas, estegmatas, compostos fenólicos, alcaloides e proteínas. As características anatômicas descritas neste estudo, relacionadas às características abióticas em que espécies ocorrem, também ampliam o conhecimento sobre *Anemia*, fornecendo dados e interpretações inéditas para o gênero.

Palavras-chave: Adaptação. Anatomia ecológica. Estruturas secretoras. Afloramentos rochosos.

ABSTRACT

MORAES-NETO, P. G. **STRUCTURAL AND HISTOCHEMICAL ASPECTS OF *Anemia* SW. (ANEMIACEAE)**. 2019. 61f. Mestrado em Ciências Biológicas, Botânica Tropical) - Universidade Federal Rural da Amazônia/Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, 2019.

Anemiaceae Link is monogenic with 115 species, included in *Anemia* Sw. with tropical and subtropical distribution, Brazil being the main center of richness with about 60 species of which ten are registered in Pará, occurring mainly on rocky outcrops. The works performed with *Anemia* do not express the richness and potential that anatomical information can provide in view of the ecological diversity of the genus. In order to partially fill this gap, this study describes the anatomy of sterile leaves of *Anemia buniifolia* (Gardner) T. Moore, *A. elegans* (Gardner) C.Presl, *A. oblongifolia* (Cav.) Sw., *A. phyllitidis* (L.) Sw., *A. presliana* Prantl and *A. trichorhiza* Gardner ex Hooker present in rocky outcrops, interpreted in light of fern ecological information, the main adaptive characters, besides providing new data for the group taxonomy. Among the main structural characteristics are: stomatal distribution, presence of stegmatas, type of mesophyll, sheath extension, among others. Histochemical tests were also performed on *A. buniifolia*, *A. oblongifolia*, *A. presliana* and *A. trichorhiza*, collected from natural populations, with positive results for phenolic compounds, alkaloids, polysaccharides and proteins in structures such as idioblasts, secretory tissues and trichomes glandular. The results showed that several structural and histochemical characteristics present in *Anemia* are directly related to the reduction of water loss, having adaptive value to extreme environments with high light intensity and water deficit, such as rocky outcrops. Among these, there are multifunctional characteristics, also acting against herbivory, such as trichomes, stegmates, phenolic compounds, alkaloids and proteins. The anatomical characteristics described in this study, related to abiotic characteristics in which species occur, also increase the knowledge about *Anemia*, providing unprecedented data and interpretations for the genus.

Keywords: Adaptation. Ecological anatomy. Secretory structures. Rock outcrops.

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	11
2. OBJETIVO	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 O gênero Anemia	14
3.2 Anatomia ecológica	15
ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
ESTRATÉGIAS ADAPTATIVAS DE ANEMIA SW. (ANEMIACEAE): ASPECTOS ESTRUTURAIS E HISTOQUÍMICOS	21
MATERIAL E MÉTODOS	24
RESULTADOS	26
DISCUSSÃO	28
CONCLUSÕES	33
LITERATURA CITADA	34
LEGENDAS E FIGURAS	47

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

As samambaias ocorrem em uma grande diversidade de ambientes, especialmente nas Florestas Tropicais Úmidas onde alcançam maior diversidade taxonômica e ecológica (MORAN, 2009), devido principalmente à complexidade e variedade de microhabitat e nichos especializados presentes nestes locais (LOPES, 2013). Contudo, algumas famílias, dentre elas Anemiaceae Link, ocorrem em habitat aberto e bem drenado, crescendo em barrancos, margens de rios, encostas de arbustos, entre afloramentos rochosos, pequenos penhascos e margem de estrada (TRYON; TRYON, 1982).

Anemiaceae compreende cerca de 115 espécies, todas circunscritas em *Anemia* Sw., apresentando distribuição neotropical, com ocorrência na África, Madagascar, Sul da Índia e ilhas do Oceano Índico (MICKEL, 2016). O Brasil é o principal centro de riqueza com cerca de 60 espécies (LABIAK et al., 2018) e no Pará são registradas dez espécies ocorrendo em afloramentos rochosos (GÓES-NETO; PIETROBOM, 2012; PRADO et al., 2015; MICKEL, 2016; FLORA DO BRASIL 2018, 2020).

Morfologicamente, o gênero é caracterizado por caule ereto a reptante, apresentando tricomas marrons a alaranjados; frondes hemidimorfos (com o par de pinas basais modificadas, portando os soros) ou raramente monomorfos ou dimorfos; pecíolos estramíneos a castanhos, com tricomas semelhantes aos do caule ou glabros; venação livre a anastomosada, sem vênulas livres inclusas; esporângios sésseis, subglobosos a ovais e indúcio ausente (MICKEL, 2016).

Apesar da grande diversidade, o conhecimento sobre as características estruturais relacionadas à adaptação aos diferentes habitats ainda é incipiente. Dentre os poucos trabalhos de anatomia no gênero, destaca-se o estudo de *Anemia tomentosa* (Sav.) Sw. var. *anthriscifolia* (Schrad.) Mickel, em que foi detectado a primeira ocorrência de isoafrianol, sem análises de sua atividade biológica e/ou função, contudo, observações de campo permitiram constatar que diferentes espécies de *Anemia* possuem aroma peculiar, podendo ser distinguidas olfativamente (SANTOS et al., 2006), o que demonstra a importância de estudos estruturais, bem como a localização in situ deste e possivelmente outros compostos biologicamente ativos em *Anemia*. Além de Ribeiro et al. (2007) com anatomia ecológica de *A. tomentosa* var. *anthriscifolia* e *A. villosa* Humb. & Bonpl. ex Willd., constatando diferenças quanto a densidade e comprimento dos tricomas, espessura foliar, espessura mesofílica e tipologia de estômatos. Nesse mesmo trabalho, os autores também observaram compostos fenólicos que estariam relacionados à adaptação das plantas ao meio terrestre.

Posteriormente, Ribeiro et al. (2011) analisaram a variação anatômica de quatro populações de *A. villosa* crescendo em diferentes ambientes, dentre eles, os afloramentos rochosos.

A maioria das investigações que relacionam modificações morfoanatômicas de espécies vegetais frente a diferentes condições ambientais concentram-se nas angiospermas (ARENS, 1997), mas tratando-se de afloramentos rochosos inclusive para plantas com flor, os estudos de anatomia ecológica são incipientes, e para samambaias não há registro de trabalhos desta natureza nos últimos dez anos, sendo a linha de pesquisa menos investigada (SILVA, 2016), possivelmente, isto se deve ao pequeno número de especialistas investigando o grupo em comunidades rupícolas (LEWINSOHN; PRADO, 2002) e, mais ainda, com experiência em anatomia ecológica (SILVA, 2016).

Afloramentos rochosos são ecossistemas frágeis e vulneráveis às ações antrópicas, apesar de atuarem como refúgios para espécies raras e endêmicas (MEIRELLES et al., 1999), por esse motivo, estudar estes ambientes são necessários para caracterizar as plantas vasculares sem sementes que ocupam essas formações tão singulares (SANTOS; SYLVESTRE, 2006). A partir dessas informações, observa-se que os trabalhos realizados com *Anemia* não expressam a sua riqueza e o potencial que as informações anatômicas podem fornecer, frente à diversidade taxonômica e ecológica do gênero. E visando preencher em parte esta lacuna, pretende-se responder duas perguntas a partir dos dados estruturais e histoquímicos, interpretados à luz das informações ecológicas de samambaias:

- Sabendo que *Anemia* apresenta grande diversidade taxonômica e ecológica, existem características anatômicas peculiares relacionadas ao estabelecimento em afloramentos rochosos?
- A partir da localização *in situ* de metabólitos secundários, é possível identificar estratégias adaptativas nas espécies de *Anemia*?

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Investigar a anatomia foliar de *Anemia* Sw. ocorrentes no estado do Pará, a fim de identificar características relacionadas ao estabelecimento destas espécies em afloramentos rochosos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar a descrição estrutural detalhada das espécies;
- ✓ Selecionar os caracteres anatômicos mais relacionados aos afloramentos rochosos;
- ✓ Identificar as principais classes de metabólitos secundários;
- ✓ Caracterizar as estruturas secretoras foliares.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O gênero *Anemia*

Anemia são plantas terrícolas ou rupícolas, raramente epífitas, que apresentam caule reptante a ereto, com tricomas alaranjados a marrons, frondes hemidimorfas (com par de pinas basais, portando os soros) ou raramente monomorfas ou dimorfas; pecíolos estramíneos a castanhos, com tricomas semelhantes aos do caule ou glabros; venação livre a anastomosada, sem vênulas livres inclusas; esporângios sésseis, subglobosos a ovais e indúcio ausente (MICKEL, 2016).

Nas últimas quatro décadas *Anemia* sofreu algumas mudanças na sua circunscrição. Inicialmente, estava circunscrito em Schizaeaceae Kaulf. (TRYON; TRYON, 1982; KRAMER, 1990) até ser elevada ao status de família (SMITH et al., 2006). Diante disto, segue um breve histórico com as principais mudanças ocorridas na circunscrição do gênero até a classificação atual:

Tryon; Tryon (1982) propuseram uma classificação em que Pteridophyta engloba Filicopsida, na qual está inserida Polypodiales e Schizaeaceae, na qual estão incluídos os gêneros *Anemia*, *Lygodium* Sw., *Schizaea* Sm. e *Mohria* Sw. todos na América do Sul e América do Norte, exceto *Mohria* que ocorre apenas na África, Madagascar e ilhas adjacentes.

Na classificação proposta por Kramer (1990) Schizeaceae permaneceu com quatro gêneros: *Lygodium*, *Mohria*, *Schizaea* e *Anemia*, porém, trouxe como novidade dois subgêneros *Trochopteris* Gardner e *Hemianemia* (Prantl) Reed – que se juntaram a *Anemia* e *Coptophyllum* Gardner – já reconhecidos por Tryon; Tryon (1982).

Samambaias e Licófitas foram tratadas anteriormente como um grupo único (Pteridophyta). Porém, estudos baseados em filogenia molecular demonstraram que esses vegetais constituem duas linhagens evolutivas monofiléticas não relacionadas: Lycopodiophyta e Euphyllophyta (PRYER et al., 2001), que resultou em mudanças na circunscrição de vários taxa (SMITH et al., 2006). A principal novidade apresentada por Smith et al. (2006) foi a criação de novas classes dentre elas Polypodiopsida que incluiu a ordem Schizaeales englobando as famílias Schizeaceae, Lygodiaceae e Anemiaceae. Anteriormente, *Anemia* estava circunscrita em Schizaeaceae, mas, a partir desses estudos o gênero foi elevado ao status de família chamada Anemiaceae, cujo monofiletismo foi possível com a inclusão de Mohriaceae, totalizando cerca de 100 espécies (SMITH et al., 2006).

Por fim, a classificação proposta por Mickel (2016) estabeleceu a criação de três subgêneros em *Anemia*: *Mohria* (Sw.) Mickel, *Anemiorrhiza* Prantl e *Anemia* com 7, 13 e 95 espécies, respectivamente, corroborado no PPG I (2016).

3.2 Anatomia ecológica

As samambaias possuem grande importância ecológica, porém, pouco conhecida (PRADO, 1998; SHARPE et al., 2010) quando comparada com sua diversidade taxonômica. Suas notáveis adaptações para vários distúrbios em seus ambientes sugerem um papel importante para o grupo na conservação e restauração de áreas antropizadas (SHARPE et al., 2010). Algumas espécies também são importantes para o estudo de monitoramento ambiental pela capacidade de indicar tipos de solo e ambientes perturbados (DE LA SOTA, 1971).

As samambaias desempenham papel fundamental na conservação da microfauna e microflora do substrato (SMITH, 1972), consideradas como importantes indicadoras de qualidade ambiental, por estarem intimamente relacionadas aos fatores abióticos (FERRER-CASTÁN; VETAAS, 2005), apresentando adaptações a diversos distúrbios ambientais, incluindo habilidades em acumular toxinas (TU; MA, 2005; SHARPE et al., 2010). Porém, as atividades antrópicas vêm degradando os habitats naturais, representando grande ameaça à sobrevivência desses vegetais (PIMM; RAVEN, 2000), inclusive os que vivem sobre afloramentos rochosos, que são refúgios para espécies raras, endêmicas e berço de novas espécies (SILVA, 2016). O exemplo mais recente para *Anemia* é *A. paripinnata* Labiak & Mickel, descrita para os afloramentos rochosos da região central do Brasil (LABIAK et al., 2018).

Nas duas últimas décadas, o número de estudos ecológicos em samambaias foi crescente, com diversas finalidades, desde conhecer como estão distribuídas geograficamente no mundo, até compreender seu funcionamento, os aspectos ecológicos no ecossistema e as variações nas comunidades em resposta aos fatores biótico e abiótico (MEHLTRETER; PALACIOS-RIOS, 2003; ROBINSON, 2007; ROBINSON et al., 2010). Contudo, ainda há muitas lacunas a serem preenchidas (SHARPE et al., 2010), principalmente em comunidades rupícolas, onde trabalhos são escassos (SILVA, 2016), destacando a necessidade de estudos multidisciplinares em samambaias para a melhor compreensão da forma como esse grupo se estabelece nos diferentes habitats, especialmente em afloramentos rochosos, a fim de destacar a importância destes organismos e, conseqüentemente, a conservação de ambos em seus ambientes nativos.

Neste contexto, Sharpe et al. (2010) destacaram a escassez de informações ecológicas para as samambaias em detrimento das angiospermas. Segundo Page (1979), isto tem relação com a desvalorização econômica dos representantes deste grupo, em comparação às plantas com sementes, contudo, mesmo as samambaias que têm importância econômica apresentam poucos estudos ecológicos (LEHN, 2008), por isso, os dados apresentados também podem estar relacionados ao baixo número de especialistas em samambaias com experiência em ecologia (SILVA, 2016). Logo, tornam-se ainda mais críticos e urgentes estudos que busquem interpretar as características estruturais e ecológicas, principalmente em afloramentos rochosos, alvo de atividades antrópicas desordenadas (JACOBI et al., 2007) provocando o desaparecimento do ecossistema inteiro e conseqüente extinção de espécies endêmicas (SILVA, 2016).

Em um trabalho clássico de anatomia de órgãos vegetativos dedicado às licófitas e samambaias, Ogura (1972) realizou um estudo anatômico comparativo entre diversas famílias, destacando para Anemia a densidade e tamanho dos estômatos, presença ou não de tricomas e composição da cutícula. Algumas outras características, como: espessura e tipo de mesofilo, também foram destacadas como estruturas que variam em resposta às diferentes condições do ambiente (ARENS, 1997). Esta variação explica, por exemplo, a capacidade de adaptações morfológicas e/ou fisiológicas a ambientes xerofíticos que muitas espécies apresentam (LARCHER, 1995), destacando a plasticidade fenotípica como fundamental para a manutenção dos indivíduos em ambientes heterogêneos (THOMPSON, 1991).

ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

O presente trabalho encontra-se organizado sob a forma de artigo científico, como disposto nas normas de redação de dissertação da Universidade Federal Rural da Amazônia. O artigo segue as normas do periódico que será submetido.

Artigo:

ESTRATÉGIAS ADAPTATIVAS DE *Anemia Sw.* (ANEMIACEAE): ASPECTOS ESTRUTURAIS E HISTOQUÍMICOS

À ser enviado ao periódico American Fern Journal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEMIACEAE in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB90588>. Acesso em: 15 Set. 2018.

ARENS, N. C. Responses of Leaf Anatomy to Light Environment in the Tree Fern *Cyathea caracasana* (Cyatheaceae) and its Application to Some Ancient Seed Fern. **Society for Sedimentary Geology**, *Palaios*, v. 12, n. 1, p. 84-94, 1997.

FERRER-CASTÁN, D.; VETAAS, O. R. Pteridophyte richness, climate and topography in the Iberian Peninsula: comparing spatial and nonspatial models of richness patterns. **Global Ecology and Biogeography**, v. 14, p. 155-165, 2005.

GÓES-NETO, L. A. A.; PIETROBOM, M. R. Novos registros de samambaias para a Amazônia Brasileira. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 4, p. 1151-1155, 2012.

JACOBI, C. M.; CARMO, F. F.; VINCENT, R. C.; STEHMANN, J. R. Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 7, p. 2185-2200, 2007. DOI: 10.1007/s10531-007-9156-8

KRAMER, K. U. **Schizaeaceae**. Kramer, K.U. & Green, P.S. (Eds.vol.). **Pteridophytes and Gymnosperms**. In: Kubitzki, K. **The Families and Genera of Vascular Plants**. v. 1. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p. 258-263.

LABIAK, P. H.; MICKEL, J. T.; HANKS, J. G. Molecular phylogeny and character evolution of Anemiaceae (Schizaeales). **Taxon**, v. 64, n. 6, p. 1141-1158, 2015.

LABIAK, P. H.; MICKEL, J. T.; MATOS, F. B. *Anemia paripinnata* (Anemiaceae), a New Species from Central Brazil. **American Fern Journal**, v. 108, n. 1, p. 1-6, 2018.

LARCHER, W. **Physiological Plant ecology**. Berlin: Spring Verlag, 1995. 506 p.

LEHN, C. R. **Aspectos estruturais e fenológicos de uma população de *Danaea sellowiana* C. Presl. (Marattiaceae) em uma floresta estacional semidecidual no Brasil Central**. 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em biologia vegetal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2008.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. (Eds.). Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento. São Paulo, **Contexto**, p. 176, 2002.

LOPES, A. S. S. **Florística, influência altitudinal e aspectos ecológicos das samambaias ocorrentes na RPPN PEDRA D'ANTAS (LAGOA DOS GATOS, PERNAMBUCO, BRASIL)**. Orientadora: Iva Carneiro Leão Barros. 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2013.

MEHLTRETER, K.; PALACIOS-RIOS, M. Phenological studies of *Acrostichum danaeifolium* (Pteridaceae, Pteridophyta) at a mangrove site on the Gulf of Mexico. **Journal of Tropical Ecology**, v. 19, p. 155-62, 2003.

MEIRELLES, S.T.; PIVELLO, V.R.; JOLY, C.A. The vegetation of granite rock outcrops in Rio de Janeiro, Brazil, and the need for its protection. **Environmental Conservation**, v. 26, p. 10-20, 1999.

MICKEL, J. T. **Anemia (Anemiaceae)**. Flora Neotropica, New York, The New York Botanical Garden Press, v. 118, 2016. p. 181.

MORAN, R. C. **Géneros Neotropicales de Helechos y Licofitos - Um Guia para Estudiantes**. San José-Costa Rica: The New York Botanical Garden, 2009.

OGURA, Y. **Comparative anatomy of vegetative organs of the Pteridophytes**. 2. ed. Gebrüder Borntraeger, Berlin, 1972. 502 p.

PAGE, C. N. The diversity of ferns: An ecological perspective. In: Dyer, A. F. (Eds.). The experimental biology of ferns. **Academy Press**, London, p. 10-53, 1979.

PIMM, S. L.; RAVEN, P. **Extinction by numbers**. *Nature*. Londres-Inglaterra, v. 403, 2000. p. 5-845.

PPG I. A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 54, p. 563-603, 2016.

PRADO, J. **Pteridófitas do estado de São Paulo**. In: BICUDO, C. E. M.; SHEPHERD, G. J. (Org.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo**. 2 – Fungos macroscópicos e plantas. 1. ed. São Paulo: Fapesp, 1998. p. 47-61.

PRADO, J.; SYLVESTRE, L. S.; LABIAK, P. H.; WINDISCH, P. G.; SALINO, A.; BARROS, I. C. L.; HIRAI, R. Y.; ALMEIDA, T. E.; SANTIAGO, A. C. P.; KIELING-RUBIO, M. A.; PEREIRA, A. F. N.; ØLLGAARD, B.; RAMOS, C. G. V.; MICKEL, J. T.; DITTRICH, V. A. O.; MYNSEN, C. M.; SCHWARTSBURD, P. B.; CONDACK, J. P. S.; PEREIRA, J. B. S.; MATOS, F. B. Diversity of ferns and lycophytes in Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, p. 1073-1083, 2015.

PRYER, K. M.; SCHNEIDER, H.; SMITH, A. R.; CRANFILL, R.; WOLF, P. G.; HUNT, J. S.; SIPES, S. D. Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. **Nature**, v. 409, p. 618-622, 2001.

RIBEIRO, M. L. R. C.; SANTOS, M. G.; BARROS, C. F.; COSTA, C. G. Intraspecific Variation in Four Distinct Populations of *Anemia villosa* Humb. & Bonpl. ex Willd. (Anemiaceae) Occurring in Rio de Janeiro, Brazil. **American Fern Journal**, v. 101, n. 2, p. 70-80, 2011.

RIBEIRO, M. L. R. C.; SANTOS, M. G.; MORAES, M. G. Leaf anatomy of two *Anemia* Sw. species (Schizaeaceae-Pteridophyte) from a rocky outcrop in Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 695-702, 2007.

- ROBINSON, R. C. **Steps to more effective bracken management.** Aspects of Applied Biology, v. 82, 2007. p. 55-143.
- ROBINSON, R. C.; SHEFFIELD, E; SHARPE, J. M. **Problem fern: their impact and management.** In: MEHLTRETER, K.; WALKER, L.R.; SHARPE, J.M. (Eds.). **Fern Ecology.** 1. ed. New York: Cambridge University Press, 2010. p. 255-322.
- SANTOS, M. G.; ROCHA, L. M.; CARVALHO, E. S.; KELECOM, A. Isoafricanol, um sesquiterpeno incomum encontrado na pteridófito Anemia tomentosa var. anthriscifolia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu. v. 8, n. 4, p. 71-75, 2006.
- SANTOS, M. G.; SYLVESTRE, L. S. Aspectos florísticos e econômicos das pteridófitas de um afloramento rochoso do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 115-124, 2006.
- SHARPE, J. M.; MEHLTRETER, K.; WALKER, L. R. **Ecological importance of ferns.** In: MEHLTRETER, K.; WALKER, L. R.; SHARPE, J. M. (Eds.). **Fern Ecology.** 1. ed. New York: Cambridge University Press, 2010. p. 1-21.
- SILVA, J. B. Panorama sobre a vegetação em afloramentos rochosos do Brasil. **Oecologia Australis**, v. 20, n. 4, p. 451-463, 2016.
- SMITH, A. R. Comparison of Fern and Flowering Plant Distribution with Some Evolutionary Interpretations for Ferns. **Biotropica**, v. 4, n. 1, p. 4-9, 1972.
- SMITH, A. R.; PRYER, K. M.; SCHUETTPELZ, E.; KORALL, P.; SCHNEIDER, H.; WOLF, P. G. A classification for extant ferns. **Taxon**, v. 55, n. 3, p. 705-731, 2006.
- SOTA, E. R. DE LA. El epifitismo y las pteridofitas en Costa Rica (America Central). **Nova Hedwigia**, v. 21, p. 401-465, 1971.
- THOMPSON, J. D. Phenotypic plasticity as a component of evolutionary change. **Tree**, v. 6, n. 8, p. 246-249, 1991.
- TRYON, R. M.; TRYON, A. F. **Ferns and Allied Plants with Special Reference to Tropical America.** New York: Springer-Verlag, 1982. 868 p.
- TU, C.; MA, L. Q. Effects of arsenic on concentration and distribution of nutrients in the fronds of arsenic hyper accumulator *Pteris vittata* L. **Environmental pollution**, v. 135, n. 2, p. 330-340, 2005.

ARTIGO

**ESTRATÉGIAS ADAPTATIVAS DE ANEMIA SW. (ANEMIACEAE): ASPECTOS
ESTRUTURAIIS E HISTOQUÍMICOS**

**ESTRATÉGIAS ADAPTATIVAS DE ANEMIA SW. (ANEMIACEAE): ASPECTOS ESTRUTURAIS E
HISTOQUÍMICOS**

PEDRO GONÇALVES DE MORAES NETO¹

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Botânica Tropical, Universidade Federal Rural da Amazônia/Museu Paraense Emílio Goeldi. Avenida Perimetral, 1901, Terra Firme, CEP 66077-830, Belém, PA, Brazil, email: pedrogmneto@gmail.com

ANA CARLA FEIO²

²Postdoctoral fellow, Coordenação de Botânica, Museu Paraense Emílio Goeldi. Avenida Perimetral, 1901, Terra Firme, CEP 66077-830, Belém, PA, Brazil, email:

anacarlafeio@gmail.com

ABSTRACT.—Anemia occupies environments under extreme conditions, such as rocky outcrops, characterized by exposure to austere environmental conditions, determined by limiting abiotic factors, such as high temperatures and water stress, standing out as a refuge for rare species and the cradle of new species, however, in Brasil, are poorly studied. In order to partially fill this gap, this study describes the anatomy of sterile leaves of *Anemia buniifolia*, *A. elegans*, *A. oblongifolia*, *A. phyllitidis*, *A. presliana* and *A. trichorhiza* present in rocky outcrops interpreted in light of fern ecological information, the main adaptive characters, besides providing new data for the group taxonomy. Among the main structural characteristics are: stomatal distribution, presence of stegmates, type of mesophyll, sheath extension, among others. Histochemical tests were also performed on *A. buniifolia*, *A. oblongifolia*, *A. presliana* and *A. trichorhiza*, collected from natural populations, with positive results for phenolic compounds, alkaloids, polysaccharides and proteins in structures such as idioblasts, secretory tissues and trichomes glandular. The results showed that several structural and histochemical characteristics present in *Anemia* are directly related to the reduction of water loss, having adaptive value to extreme environments with high light intensity, such as rocky outcrops. Among these, there are multifunctional characteristics, also acting against herbivory, such as trichomes, stegmates, phenolic compounds, alkaloids and proteins. The anatomical characteristics described in this study, related to abiotic characteristics in which species occur, also increase the knowledge about *Anemia*, providing unprecedented data and interpretations for the genus.

KEY WORDS.—ADAPTATION; ECOLOGICAL ANATOMY; SECRETORY STRUCTURES; ROCK OUTCROPS

Anemiaceae Link compreende cerca de 115 espécies, todas circunscritas em *Anemia* Sw., apresentando distribuição neotropical, com ocorrência na África, Madagascar, Sul da

Índia e ilhas do Oceano Índico (Mickel, 2016). Com cerca de 60 espécies, o Brasil é considerado centro de diversidade para o gênero (Labiak, Mickel e Matos, 2018). No estado do Pará são registradas dez espécies (Góes-Neto e Pietrobon, 2012; Pallos, Góes-Neto e Salino, 2017; Flora do Brasil 2020, 2018).

Anemia possui excelente capacidade de ocupar ambientes sob condições extremas (Page, 2002), crescendo em ambientes xéricos, como florestas tropicais secas e savanas (Hietz, 2010). Os afloramentos rochosos se destacam em relação à presença de Anemia (Tryon e Tryon, 1982; Hietz, 2010; Mickel, 2016). Esses afloramentos são caracterizados pela exposição às condições ambientais austeras, determinadas por fatores abióticos limitantes, como intensa radiação solar, altas temperaturas, estresse hídrico e baixa disponibilidade de nutrientes (Biedinger, Porembski e Barthlott, 2000), destacando-se como refúgios para espécies endêmicas, geograficamente disjuntas e ameaçadas, além de fontes de descoberta de novas espécies (Oliveira e Godoy, 2007; Silva, 2016), contudo, são explorados desordenadamente e, particularmente no Brasil, são pouco estudados (Silva, 2016).

Nos últimos anos, foram realizados alguns estudos sobre samambaias associadas a afloramentos rochosos (Page, 2002; Xavier e Barros, 2003; Santos et al., 2006; Santos e Sylvestre, 2006; Ribeiro, Santos e Moraes, 2007; Ribeiro et al., 2011; Silva, 2016), com destaque para Santos et al. (2006) que analisaram *Anemia tomentosa* (Sav.) Sw. var. *anthriscifolia* (Schrad.) Mickel e constataram nas folhas um aroma, proporcionado pelo isoafrikanol (sesquiterpeno), sendo o primeiro registro deste metabólito para samambaias, além de Ribeiro, Santos e Moraes (2007) que analisaram a anatomia foliar de *A. tomentosa* var. *anthriscifolia* e *A. villosa* Humb. & Bonpl. ex Willd. avaliando estratégias adaptativas para o estresse hídrico nesses ambientes. Esses trabalhos indicam a importância de estudos anatômicos nas espécies de *Anemia*, revelando diferentes adaptações a ambientes sob condições hostis (Oliveira e Godoy, 2007).

No entanto, as características anatômicas adaptativas relacionadas a essas condições são subexploradas (Ribeiro, Santos e Moraes, 2007), com raras análises dos tipos de plasticidade relacionadas às características adaptativas (Bradshaw, 1965), o que não refletem a diversidade do grupo. Ademais, a diversidade de estruturas e a natureza química dos compostos podem evidenciar o potencial das espécies para trabalhos que visem descobrir novas fontes de produtos naturais de interesse econômico, bem como a recuperação da vegetação, manejo e conservação de habitats, já que exigem o conhecimento biológico das espécies nativas (Kageyama e Gandara, 2000).

Considerando a necessidade de incrementar a base de dados anatômicos relacionada às estratégias adaptativas, interpretados à luz das informações ecológicas para samambaias, este estudo objetivou analisar, comparativamente, dados estruturais e histoquímicos de seis espécies de *Anemia* ocorrentes em afloramentos rochosos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico.—O material analisado neste estudo foi coletado de populações naturais e complementado por amostras de folhas extraídas de espécimes herborizados. Sempre que possível, foram analisadas o mínimo de três espécimes por espécie. Todas as informações, incluindo nome das espécies, coletor e herbário com acrônimos seguindo Thiers (2018, continuamente atualizado), forma de vida e habitat estão sumarizadas na Tabela 1.

Análise estrutural.—As amostras extraídas de herbário foram reidratadas (Smith e Smith, 1942) e armazenadas em etanol a 70%. Posteriormente, fragmentos das porções medianas da lâmina foliar (nervura central e margem) e as porções medianas do pecíolo e raque foram desidratados em série crescente de etanol e embebidos em resina de 2-hidroxietil metacrilato (Historesin Leica®, soluções foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante), seguindo Meira e Martins (2003). As amostras foram seccionadas transversalmente (3-7 μm) usando micrótomo rotativo (RM 2245, Leica® Biosystems,

Heidelberg, Alemanha) com navalhas de tungstênio (Leica® Biosystems). As secções foram coradas com azul de toluidina pH 4,6 (O'Brien, Feder e McCully, 1965), e as lâminas montadas em resina (Permount®, Fisher Scientific, New Jersey, EUA).

Algumas amostras também foram despigmentadas com soluções de hidróxido de sódio a 5% e hipoclorito a 20%, coradas com fucsina básica 50% em etanol (Shobe e Lersten, 1967) e montadas em gelatina glicerinada (Kaiser, 1880).

Análise histoquímica.—As amostras coletadas em campo foram selecionadas para testes histoquímicos, utilizando-se três fixadores: FAA (formalina-ácido acético-etanol 50%, 1:1:18 v/v; Johansen, 1940) por 24 h, para caracterização estrutural e testes para compostos hidrofílicos, Formalina Neutra Tamponada por 48 h (Lillie, 1965), para detectar compostos lipofílicos e Sulfato Ferroso em Formalina por 48 h (Johansen, 1940), utilizado para demonstração de compostos fenólicos totais. As amostras foram desidratadas através de série crescente de álcool butílico terciário (Johansen, 1940), embebidas em parafina histológica com DMSO (Paraplast® Embedding Media, Oxford Lab., EUA), obtendo secções transversais seriadas (10-12 µm) com micrótomo rotativo e navalhas de aço.

Para detecção das principais classes de compostos secundários, foram realizados os seguintes testes: vermelho de rutênio para mucilagem ácida (Gregory e Bass, 1989); ácido tânico/cloreto férrico para mucilagem neutra (Pizzolato e Lillie, 1973); lugol (Johansen, 1940) para amido; Sudão preto B (Pearse, 1985) para lipídios totais em luz visível; cloreto férrico para compostos fenólicos totais (Johansen, 1940); vanilina clorídrica para taninos (Mace e Howell, 1974); Reagente de Dragendorff (Svedsen e Verpoorte, 1983) para alcalóides; Xilidine Ponceau para proteínas totais (O'Brien e McCully, 1981). Procedimentos de controle padrão foram realizados simultaneamente, conforme cada teste, e as lâminas foram montadas em gelatina glicerinada.

Documentação fotográfica.—Utilizou-se microscópio de luz (Axio Scope.A1, © Carl Zeiss, Microimaging GmbH, Göttingen, Alemanha) equipado com uma câmera digital (AxioCam HRc; © Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) do Laboratório Morfofuncional da Universidade Estadual do Pará. Macroimagens foram obtidas com estereomicroscópio (Stereo Discovery. V8, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemanha) acoplado a câmera digital (AxioCam ICc5®, © Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemanha) do Laboratório de Taxonomia do Museu Paraense Emílio Goeldi.

Descrição e análise de caracteres anatômicos.—As descrições anatômicas foram baseadas nos termos de Mickel e Lersten (1967) para tipologia de estômatos, Metcalfe e Chalk (1950), Ogura (1972) e Fahn (1990) para tricomas e Ogura (1972) para sistema vascular.

RESULTADOS

Lâmina foliar

As principais características observadas em *Anemia buniifolia* (Gardner) T.Moore, *A. elegans* (Gardner) C.Presl, *A. oblongifolia* (Cav.) Sw., *A. phyllitidis* (L.) Sw., *A. presliana* Prantl e *A. trichorhiza* Gardner ex Hooker, estão sumarizadas na Tabela 2.

Em vista frontal, todas as espécies apresentaram epiderme adaxial e abaxial com paredes anticlinais sinuosas (fig.1,2). Tricomas não glandulares (fig.3) e glandulares (fig.4) estão presentes em todas as espécies, exceto *A. buniifolia* que não apresenta o tipo glandular. Estômatos do tipo flutuante (fig.5) estão presentes apenas na superfície abaxial (folhas hipoestomáticas) de *A. buniifolia*, *A. oblongifolia*, *A. phyllitidis* e *A. presliana*, enquanto em *A. elegans* estão presentes somente na superfície adaxial (folhas epiestomáticas), e em *A. trichorhiza* em ambas as superfícies (folhas anfiestomáticas). Estômatos do tipo suspenso (fig.6) também foram observados na superfície abaxial de *A. buniifolia*.

Em secção transversal, todas as espécies possuem cutícula delgada e epiderme uniestratificada, com estômatos acima das células epidérmicas ordinárias (fig.7). Nas paredes periclinais das células epidérmicas ordinárias de *A. oblongifolia*, *A. phyllitidis*, *A. presliana* e *A. trichorhiza* ocorrem estegmatas cônicos (fig.8). O mesofilo de *A. elegans* é homogêneo com parênquima lacunoso (fig.9), *A. buniifolia*, *A. phyllitidis* e *A. trichorhiza* apresentam mesofilo ligeiramente dorsiventral (fig.10), enquanto que *A. oblongifolia* e *A. presliana* possuem mesofilo dorsiventral, com parênquima plicado e lacunoso nas faces adaxial e abaxial, respectivamente (fig.7).

A nervura principal é côncavo-convexa (fig.11) e apresenta sistema vascular constituído por feixes anficrivais (fig.12) em *A. buniifolia*, *A. phyllitidis* e *A. trichorhiza*. Apesar das espécies *A. elegans*, *A. oblongifolia* e *A. presliana* não apresentarem nervura principal, os feixes vasculares são também anficrivais (fig.13, 14). Apenas em *A. elegans*, *A. phyllitidis* e *A. trichorhiza*, observou-se extensão de bainha, composta por células parenquimáticas de paredes espessadas (fig.13), sendo que *A. phyllitidis* e *A. trichorhiza* também apresentam células esclerenquimáticas, próximo a epiderme (fig.14).

Raque

A raque é ausente em *A. buniifolia* e *A. elegans*. Em secção transversal, a raque apresentou formas do tipo cordiforme em *A. phyllitidis* (fig.15), do tipo cilindroide em *A. oblongifolia* e *A. trichorhiza* (fig.16), e do tipo trapezoide em *A. presliana* (fig.17), com as mesmas características epidérmicas da lâmina foliar, contudo, *A. trichorhiza* possui raque glabra. As espécies apresentam córtex composto por 1-7 camadas de esclerênquima, seguidas de 3-17 camadas de parênquima (fig. 18) e endoderme uniestratificada (fig.19). Em *A. oblongifolia* e *A. trichorhiza* o periciclo possui 1-2 camadas, enquanto em *A. phyllitidis* e *A. presliana* pode apresentar até 3 camadas. O sistema vascular é do tipo anficrival, arranjado em arco (fig.15, 16), exceto *A. trichorhiza* que apresenta arranjo em V (fig.20).

Pecíolo

O pecíolo, em secção transversal, apresenta formas do tipo cilindroide (fig.21) em *A. elegans* e *A. trichorhiza*, do tipo trapezoide (fig.22) em *A. oblongifolia* e *A. presliana* e do tipo cordiforme (fig.23) em *A. buniifolia* e *A. phyllitidis*. Em todas as espécies as características epidérmicas foram semelhantes à lâmina foliar, com estômatos observados, ocasionalmente, acima das células epidérmicas em *A. buniifolia*, *A. oblongifolia*, *A. phyllitidis* e *A. presliana* formando a linha respiratória (fig.24). Tricomas glandulares, foram observados em *A. elegans*, *A. phyllitidis* e *A. trichorhiza*, estando ausente em *A. buniifolia*, *A. oblongifolia* e *A. presliana*, já os tricomas não glandulares estão presentes em todas as espécies. *Anemia oblongifolia*, *A. presliana* e *A. trichorhiza* distinguem-se das demais, por serem as únicas a apresentar estegmatas cônicos nas paredes epidérmicas periclinais do pecíolo (fig.25).

Com exceção de *A. elegans*, que apresenta o córtex composto apenas por células parenquimáticas (fig.26), nas demais espécies o córtex foi semelhante à raque, constituído por 1-5 camadas de esclerênquima, seguidas de 5-13 camadas de parênquima, endoderme uniestratificada. O periciclo é formado por 1-2 camadas parenquimáticas, exceto *A. phyllitidis* que pode apresentar até 3 camadas. O sistema vascular é do tipo anficrival arranjado em arco em todas as espécies (fig.27).

Quantos às estruturas secretoras, as espécies analisadas possuem idioblastos, tecidos secretores (TS) e tricomas glandulares. Não foi observado à vista desarmada nenhuma secreção na superfície foliar, bem como nenhum visitante no momento da coleta em campo. Os resultados dos testes histoquímicos estão sumarizados na Tabela 3.

DISCUSSÃO

Assim como as angiospermas, as samambaias também podem apresentar padrões morfológicos ecologicamente indicativos de plasticidade a ambientes heterogêneos (Arens, 1997), o que pode explicar seu sucesso adaptativo em várias situações (Bradshaw, 1965).

As seis espécies de *Anemia* estudadas apresentam paredes anticlinais sinuosas, seguindo o padrão já descrito para espécies ocorrentes em afloramentos rochosos (Pant e Khare, 1972; Ribeiro, Santos e Moraes, 2007; Ribeiro et al., 2011). Além da radiação solar incidente (Wilkinson, 1979; Graçano, Azevedo e Prado, 2001), a sinuosidade das paredes anticlinais epidérmicas pode estar relacionada a outros fatores, dentre eles a disponibilidade hídrica, uma vez que a expansão e contração da folha pela entrada e saída de água, resultam em adaptações mecânicas para evitar colapso (Krauss, 1949), característica importante em espécies de ambiente sazonal (Atzingen, Scherer e Furtado, 2007) como *Anemia*. A presença das sinuosidades confirmam que os fatores ambientais atuam em conjunto (Valladares, Gianoli e Gómez, 2007; Barboza et al., 2006), influenciando na plasticidade do caráter, principal meio pelo qual as plantas lidam com a heterogeneidade ambiental (Bradshaw, 1965).

Anemia trichorhiza apresentou lâmina foliar anfiestomática, considerada uma característica rara em samambaias (Kramer, 1990), e ainda não descrita para o gênero. A distribuição anfiestomática possibilita maior condução de gás carbônico e capacidade fotossintetizante, o que teria valor adaptativo a ambientes com alta intensidade luminosa (Mott, Gibson e O'Leary, 1982). Enquanto *A. elegans* possui lâmina foliar epiestomática, uma característica também incomum para *Anemia*, conforme o padrão descrito de folhas hipostomáticas (Ogura, 1972; Ribeiro, Santos e Moraes, 2007), como observado em *A. buniifolia*, *A. oblongifolia*, *A. phyllitidis* e *A. presliana*. Outra característica analisada foram os estômatos do tipo flutuante observados em todas as espécies, caracterizados pela organização acima das células epidérmicas e alta exposição aos fatores abióticos (Mickel e Lersten, 1967). Os estômatos flutuantes foram originalmente ilustrados com base em *A. phyllitidis* (Link, 1841), apesar disso, este tipo não foi observado nas espécies *A. adiantifolia* (L.) Sw. e *A. villosa* Humb. & Bonpl. ex Willd. (Mickel e Lersten, 1967). Assim como não são exclusivos de *Anemia*, ocorrendo em gêneros de Polypodiaceae como *Drymoglossum* C.

Presl, *Lemmaphyllum* C. Presl (Kondo, 1962), *Pyrrosia* Mirb. (Mickel e Lersten, 1967), *Pleopeltis* Humb. e *Azolla* Lam. (Salviniaceae) (Inamdar, Patel e Bhatt, 1971). Possivelmente, esse tipo de estômato seja uma característica especializada do ponto de vista evolutivo (Mickel, 1962), contudo, nenhuma relação funcional ou ecológica diferenciada foi atribuída a eles (Mickel e Lestern, 1967; Inamdar, Patel e Bhatt, 1971; Sen e De, 1992).

Tricomas glandulares e tricomas não glandulares foram observados em todas as espécies de *Anemia* analisadas neste estudo, com exceção de *A. buniifolia* que apresentou apenas o tipo não glandular. Tricomas são comuns em *Anemia* (Roux, Walt e Merwe, 1992; Ribeiro, Santos e Moraes, 2007; Ribeiro et al., 2011) e considerados um caráter de plantas xerófitas, possuindo papel importante em relação ao estresse hídrico (Gibson, 1996), por influenciar na economia de água, através da regulação da temperatura e pela reflexão da radiação solar (Larcher, 2000), otimizando a absorção da umidade atmosférica por reter água por mais tempo na superfície foliar (Hietz e Briones, 1998). No entanto sua eficiência difere entre os tipos de tricomas e sua contribuição na captação total de água não é conhecida (Hietz, 2010). Quanto à relação planta-animal, os tricomas também contribuem para a redução da herbivoria (Dickson, 2000), contudo, nenhum visitante foi observado no momento da coleta, sendo necessário um estudo mais extenso destas possíveis relações interespecíficas.

Estegmatas cônicos estavam presentes na parede epidérmica periclinal externa da lâmina foliar de *A. oblongifolia*, *A. phyllitidis*, *A. presliana* e *A. trichorhiza* e na parede epidérmica periclinal externa do pecíolo de *A. oblongifolia* e *A. trichorhiza*. Estegmatas apresentam formas variadas (cônicos, elípticos e esféricos) e são determinados geneticamente, pouco influenciados por fatores ambientais (Moller e Rasmussen, 1984), e restritos a certos grupos de plantas, entre eles *Anemia* (Ribeiro, Santos e Moraes, 2007). Quando presentes na epiderme da lâmina foliar, os estegmatas podem reduzir a transpiração (Ribeiro, Santos e Moraes, 2007), além de auxiliar nas trocas hídricas e térmicas com a atmosfera (Campos e

Labouriau, 1969), caracterizando-se como uma característica xeromórfica responsável pela eficiência no uso da água (Zanenga-Godoy e Costa, 2003). Quanto à relação planta-animal, os estegmatas também contribuem na defesa contra microrganismos e redução da herbivoria, pelo bloqueio do trato urinário dos predadores (Vicari e Bazely, 1993).

O tipo de mesofilo é um caráter que responde diferentemente às variações ambientais (Erbano e Duarte, 2010), e sua arquitetura é mais confiavelmente atribuída à intensidade da luminosidade no ambiente, sendo uma característica altamente plástica (Arens, 1997). Mesofilo do tipo homogêneo com parênquima lacunoso, observado em *A. elegans*, é comumente encontrado em espécies de ambientes sombreados (Graçano, Azevedo e Prado, 2001), pois permite a elas refletir melhor a radiação solar (Larcher, 2000), aumentando a eficiência fotossintética (DeLucia et al., 1996). Mesofilo ligeiramente dorsiventral está presente em *A. buniifolia*, *A. phyllitidis* e *A. trichorhiza*, enquanto que *A. oblongifolia* e *A. presliana* apresentam mesofilo dorsiventral, que também foi observado em outras espécies de *Anemia* ocorrentes em afloramentos rochosos (Ribeiro, Santos e Moraes, 2007; Ribeiro et al., 2011). As espécies *A. oblongifolia*, *A. phyllitidis* e *A. presliana* compõem um grupo de espécies mais generalistas como sumarizado na Tabela 1. Mesofilo dorsiventral está bem correlacionado com samambaias de ambiente luminoso (Arens, 1997), e o parênquima plicado observado no mesofilo destas espécies favorece maior taxa fotossintética, por apresentar grande concentração de cloroplastos (Queiroz-Voltan et al., 2011).

Os metabólitos secundários ocorrem em plantas de alta diversidade estrutural atuando como estratégias importantes contra herbívoros e micróbios, já que algumas vezes apresentam natureza mista, interferindo, frequentemente, em mais de um alvo e dificultando, para herbívoros e parasitas, desenvolver resistência a vários alvos simultaneamente. Acredita-se que essas misturas apresentam substâncias que facilitam sua absorção através das biomembranas, para as quais normalmente são impermeáveis (Wink, 2010). Estas

propriedades tornam essas misturas ainda mais eficientes como estratégia de defesa e proteção (Wink, 2008). Sendo assim, a maioria das plantas, inclusive Anemia, são capazes de resistir a várias ameaças de herbívoros, micróbios e do ambiente físico (Wink, 2010), utilizando mecanismos bioquímicos de tolerância à dessecação que inclui a síntese de compostos fenólicos totais, alcaloides, mucilagens ácidas, amido e proteínas totais (Tabela 3).

Compostos fenólicos são compostos relacionados à diferentes estratégias de adaptação defensiva (Feio, Aguiar-Dias e Potiguara, 2013), comumente encontrados em samambaias (Ogura, 1972) e observados com frequência em plantas xerófitas (Pyykko, 1966), nas quais sua produção é aumentada em condições desfavoráveis, atuando como bioindicador de estresse (Siddiqui e Arif-uz-Zama, 2004; Achakzai et al., 2009). Esses compostos são importantes para adaptação das plantas ao ambiente terrestre, atuando na defesa contra o parasitismo, a proliferação de fungos e a herbivoria (Croteau, Kutchan e Lewis, 2000; Taiz e Zeiger, 2006) por produzirem sabor e cheiro específicos que inibem a herbivoria (Strack, 1997) protegendo também contra a seca e alta intensidade de luz (Waterman e Mole, 1994). Os fenólicos também desempenham papéis fisiológicos, incluindo reprodução e crescimento (Achakzai et al., 2009), fotossíntese, síntese de proteínas, atividade enzimática, absorção de nutrientes (Sharma et al., 2012), atividade alelopática (Taiz e Zeiger, 2006) e antioxidante (Huang, Cai e Zhang, 2010; Naghiloo et al., 2012).

A presença de alcaloides em todas as espécies analisadas é um dado incomum para plantas sem sementes, contudo, presume-se que seja devido aos poucos estudos com análises histoquímicas para esta classe de metabólito em samambaias (Evans, 1996; Watson et al., 2001 e Feio, Aguiar-Dias e Potiguara, 2013). Alcaloides também são relacionados à defesa contra herbívoros e parasitas (Vicari e Bazely, 1993; Facchini, 2001), reduzindo a palatabilidade. Además, desempenham papel alelopático (Robinson, 1974) e, frequentemente, são mais abundantes em plantas sob estresse (Vicari e Bazely, 1993), sendo uma estratégia

mais econômica, se comparada à desfolhação, quando a disponibilidade de nutrientes é baixa (Gershezon, 1983).

A mucilagem é um constituinte natural do vegetal e de natureza mista, sendo mais comum em órgãos com função de retenção de água (Simões et al., 2000). São importantes para a proteção de órgãos em desenvolvimento, atuam na defesa contra herbívoros e na tolerância à desidratação (Gregory e Baas, 1989). De forma complementar, as proteínas também são importantes para a proteção contra herbívoros e patógenos (Klein et al., 2004; Markham, Chalk e Stewart, 2006; Miguel et al., 2006).

Apesar do amido ser naturalmente encontrado no protoplasto de células vegetais, para *A. villosa* foi sugerida a função de armazenamento para as folhas (Ribeiro, Santos e Moraes, 2007) e podem estar associados à prevenção de danos mecânicos na plasmalema durante estresse hídrico, como sugerido por Vicré et al. (1999) para tecidos de sementes tolerantes à dessecação. De forma similar, em espécies de *Elaphoglossum* Schott ex Smith, foi sugerido que os grãos de amido, observados na lâmina foliar, seriam transitoriamente estocados no cloroplasto durante o dia e degradados à noite para manter o metabolismo da planta sob estresse (Feio, Aguiar-Dias e Potiguara, 2013).

CONCLUSÕES

Neste estudo, foi possível observar que diversas características estruturais e histoquímicas presentes em *Anemia* estão diretamente relacionadas à redução da perda de água, possuindo valor adaptativo a ambientes com alta intensidade luminosa e déficit hídrico, como os afloramentos rochosos. Entre essas, há características com dupla função, atuando também contra a herbivoria, como tricomas, estegmatas, compostos fenólicos, alcaloides e proteínas totais. As características anatômicas descritas neste estudo, relacionadas aos fatores abióticos, também ampliam o conhecimento sobre *Anemia*, fornecendo dados inéditos para o gênero.

LITERATURA CITADA

- ACHAKZAI, A. K. K., P. ACHAKZAI, A. MASOOD, S. A. KAYANI, AND R. B. TAREEN. 2009. Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in quetta. *Pakistan Journal of Botany* 41:2129–2135.
- ANEMIACEAE IN FLORA DO BRASIL EM CONSTRUÇÃO 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB90588>. Acesso em: 15 Set. 2018.
- ARENS, N. C. 1997. Responses of leaf anatomy to light environment in the tree fern *Cyatheta caracasana* (Cyatheaceae) and its application to some ancient seed fern. *Society for Sedimentary Geology Palaios* 12:84–94.
- ATZINGEN, N. V., R. S. SCHERER, AND M. B. F. FURTADO. 2007. Parque Estadual Serra dos Martírios/Andorinhas, no estado do Pará e sua importância espeleológica. *Anais do XXIX congresso brasileiro de Espeleologia, Ouro Preto* 23–30.
- BARBOZA, S. B. S. C., D. GRACIANO-RIBEIRO, J. B. TEIXEIRA, T. A. PORTES, AND L. A. C. SOUZA. 2006. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41:185–194.
- BIEDINGER, N., S. POREMBSKI, AND W. BARTHLOTT. 2000. Vascular plants on inselbergs: vegetative and reproductive strategies. Pp. 117–142, in S. Porembski and W. Barthlott (eds.), *Inselbergs: biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions*. Springer-Verlag, Berlin.
- BRADSHAW, A. D. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Phenotypic Plasticity* 115–151.
- CAMPOS, A. C. AND L. G. LABOURIAU. 1969. Corpos silicosos de gramíneas dos cerrados. II. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 4:143–151.

- CHARRIÈRE-LADREIX, Y. 1976. Répartition intracellulaire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L. *Planta* 129:167–174.
- CROTEAU, R., T.M. KUTCHAN, AND N.G. LEWIS. 2000. Natural products (secondary metabolites). Pp. 1250–1318, in B. Buchanan, W. Gruissem and R. Sones (eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville.
- DELUCIA, E. H., K. NELSON, T. C. VOGELMANN, AND W. K. SMITH. 1996. Contribution of intercellular reflectance to photosynthesis in shade leaves. *Plant Cell Environment* 19:159–170.
- DICKISON, W. C. 2000. *Integrative Plant Anatomy*. Pp. 2–497, Academic Press, Florida.
- ERBANO, M. AND R. D. DUARTE. 2010. Morfoanatomia de folha e caule de *Genipa americana* L., Rubiaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20:825–832.
- EVANS, C. 1996. *Trease and Evans' pharmacognosy*. WB Saunders, London.
- FACCHINI, P. J. 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:29–66.
- FAHN, A. 1990. *Plant anatomy*. Pp. 1–479, (eds.), Pergamon Press, New York.
- FEIO, A. C., A. C. A. AGUIAR-DIAS, AND R. C. V. POTIGUARA. 2013. *Elaphoglossum* (Dryopteridaceae-Fern) of Amazon Rainforest in Brazil: Anatomic Characterization and Adaptative VFGG Strategies. *American Journal of Plant Sciences* 4:1863–1871.
- GERSHEZON, J. 1983. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. *Recent Advances in Phytochemistry* 18:273–320.
- GIBSON, A.C. 1996. *Structure-function relations of warm desert plants*. Springer 215.
- GÓES-NETO, L.A.A. AND M.R. PIETROBOM. 2012. Novos registros de samambaias para a Amazônia Brasileira. *Rodriguésia* 63:1151–1155.

- GRAÇANO, D., A. A. AZEVEDO, AND PRADO, J. 2001. Anatomia foliar das espécies de Pteridaceae do Parque Estadual do Rio Doce (PERD) – MG. *Brazilian Journal of Botany* 24:333–347.
- GREGORY, M. AND P. BAAS. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel Journal of Botany* 38:125–174.
- HIETZ, P. 2010. Fern adaptations to xeric environments. Pp. 140 –170, in K. Mehltrreter, L. Walker and J. M. Sharpe (eds.), *Fern ecology*. Cambridge University Press, New York.
- HIETZ, P. AND O. BRIONES. 1998. Correlation between water relations and within canopy distribution of epiphytic ferns in a Mexican cloud forest. *Oecologia* 114:305–316.
- HUANG, W. Y., Y. Z. CAI, AND Y. ZHANG. 2010. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer* 62:1–20.
- INAMDAR, J. A., R. C. PATEL, AND D. C. BHATT. 1971. Structure and development of stomata in some Leptosporangiate Ferns. *Annals of Botany* 35:643–51.
- JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill 523.
- KAGEYAMA, P. Y. AND F.B. GANDARA. 2000. Recuperação de áreas ciliares. Pp. 249–269, in R. R. Rodrigues and H. F. Leitão Filho (eds.), *Mata ciliares: conservação e recuperação*. Fapesp, São Paulo.
- KAISER, E. 1880. Verfahren zur herstellung einer tadellosen glycerin-gelatine. *Botanisch Zentralb, Stuttgart* 180:25–26.
- KLEIN, D. E., V. M. GOMES, S. J. SILVA-NETO, M. DA CUNHA. 2004. The structure of colleters in several species of Simira (Rubiaceae). *Annals of Botany* 94:733–740.
- KONDO, T. 1962. A contribution to the study of the fern stomata. *Shizuoka University, Japan* 13:239–269.

- KRAMER, K. U. 1990. DAVALLIACEAE. Pp. 74–80, in K.U. KRAMER AND P.S. GREEN (eds.),
The Families and Genera of Vascular Plants. Volume I. Pteridophytes and
Gymnosperms. Springer-Verlag, Berlin.
- KRAUSS, B.H. 1949. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple *Ananas comosus* (L.)
Merr.: II The leaf. *Botanical Gazette* 110:333–404.
- LABIAK, P. H., J. T. MICKEL, AND F. B. MATOS. 2018. *Anemia paripinnata* (Anemiaceae), a
new species from Central Brazil. *American Fern Journal* 108:1–6.
- LARCHER, W. 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. Rima 531.
- LILLIE, R. D. 1965. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. 3^a ed. McGraw-Hill
Book Company, New York.
- LINK, H. F. 1841. *Icones selectae anatomico-botanicae*. Ausgewahlte anatomisch-botanische
abbildungen. Heft III, Taf. IV, Fig. 8. Haude and Spencersche, Berlin.
- MACE, M. E. AND C. R. HOWELL. 1974. Histochemistry and identification of condensed tannin
precursors in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany* 52:2423–2426.
- MARKHAM, K., T. CHALK, AND C. N., JR. STEWART. 2006. Evaluation of fern and moss protein
based defenses against phytophagous insects. *International Journal of Plant Sciences*
167:111–17.
- MEIRA, R.M.S.A. AND F.M. MARTINS. 2003. Inclusão de material herborizado em metacrilato
para estudos de anatomia vegetal. *Revista Árvore* 27:109–112.
- MEIRELLES, S.T., V.R. PIVELLO, AND C.A. JOLY. 1999. The vegetation of granite rock
outcrops in Rio de Janeiro, Brazil, and the need for its protection. *Environmental
Conservation* 26:10–20.
- METCALFE, C. R. AND L. CHALK. 1950. *Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, Stems and
Wood in Relation to Taxonomy with Notes on Economic Uses*. Pp. 11–724. Volume II.
Clarendon Press, Oxford.

- MICKEL, J. T. 1962. A monographic study of the fern genus *Anemia*, subgenus *Coptophyllum*. Iowa State Journal of Research 36:349–482.
- MICKEL, J. T. 2016. *Anemia* (Anemiaceae). Flora Neotropica Monograph 118:1–181.
- MICKEL, J. T., AND N. R. LERSTEN. 1967. Floating stomates (adetostomy) in ferns: distribution and ontogeny. American Journal of Botany 54:1181–1185.
- MICKEL, J.T. 1967. The Phylogenetic Position of *Anemia colimensis*. American Journal of Botany 54:432–437.
- MIGUEL, E. C., V. M. GOMES, M. A. OLIVEIRA, AND M. CUNHA. 2006. Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): ultrastructure, secretion protein composition, and antifungal activity. Plant Biology 8:715–722.
- MØLLER, J.D. AND H. RASMUSSEN. 1984. Stegmata in Orchidales: character state distribution and polarity. Botanical Journal of the Linnean Society 80:53–76.
- MOTT, K. A., GIBSON, A. C., AND J. W. O'LEARY. 1982. The adaptive significance of amphistomatic leaves. Plant, Cell and Environment 5:455–460.
- NAGHILOO, S., A. MOVAFEGHI, A. DELAZAR, H. NAZEMIYEH, S. ASNAASHARI, AND M. R. DADPOUR. 2012. Ontogenetic variation of total phenolics and antioxidant activity in roots: leaves and flowers of *Astragalus compactus* Lam. (Fabaceae). BioImpacts 2:105–109.
- O'BRIEN, T. P., N. FEDER, AND M. E. MCCULLY. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma 59:368–373.
- O'BRIEN, T. P. AND M. E. MCCULLY. 1981. The study of plant structure: principles and selected methods. Termarcarphi Pty Limited.
- OGURA, Y. 1972. Comparative anatomy of vegetative organs of the Pteridophytes. Gebrüder Borntraeger, Berlin.

- OLIVEIRA, R. B. AND S. A. P. Godoy. 2007. Composição florística dos afloramentos rochosos do Morro do Forno, Altinópolis, São Paulo. *Biota Neotropica* 7:37–47.
- PAGE, C. N. 2002. Ecological strategies in fern evolution: a neopteridological overview. *Review of Palaeobotany and Palynology* 119:1–33.
- PALLOS, J., L. A. A. GÓES-NETO, AND A. SALINO. 2017. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Anemiaceae. *Rio de Janeiro, Rodriguésia* 8:829–832.
- PANT, D. D. AND P. K. KHARE. 1972. Epidermal Structure and Stomatal Ontogeny of *Anemia* Spp. *Annals of Botany* 36:21–809.
- PANTERIS, E. AND B. GALATIS. 2005. The morphogenesis of lobed plant cells in the mesophyll and epidermis: organization and distinct. *New Phytologist*. 3:721–732.
- PAVIANI, T. I. 1972. Estudos morfológico e anatômico de *Brasilia sickii* G. M. Barroso: I. *Revista Brasileira de Biologia* 32:451–472.
- PEARSE, A. G. E. 1985. *Histochemistry theoretical and applied* (eds.), Livingstone.
- PIZZOLATO, T. D. AND R. D. LILLIE. 1973. Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 21:56–64.
- POREMBSKI, S. AND W. BARTHLOTT. 2000. Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. *Plant Ecology* 151:19–28.
- PPG I. 2016. A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. *Journal of Systematics and Evolution* 54:563–603.
- PYYKKO, M. 1966. The leaf anatomy of East Patagonian xeromorphic plants. *Annales Botanici Fennici* 3:453–622.
- QUEIROZ-VOLTAN, R. B., R. S. ROLIM, M. J. PEDRO-JÚNIOR, AND J. L. HERNANDES. 2011. Variações na anatomia foliar de videira Niagara em diferentes sistemas de condução. *Bragantia* 70:488–493.

- RIBEIRO, M. L. R. C., M. G. SANTOS, AND MORAES, M. G. 2007. Leaf anatomy of two *Anemia* Sw. species (Schizaeaceae-Pteridophyte) from a rocky outcrop in Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 30:695–702.
- RIBEIRO, M. L. R. C., M. G. SANTOS, C. F. BARROS, AND C. G. COSTA. 2011. Intraspecific Variation in Four Distinct Populations of *Anemia villosa* Humb. & Bonpl. ex Willd. (Anemiaceae) Occurring in Rio de Janeiro, Brazil. *American Fern Journal* 101:70–80.
- ROBINSON, T. 1974. Metabolism and function of alkaloids in plants. *Science* 184:430–435.
- ROUX, J. P., J. J. A. VAN DER WALT, AND A. B. VAN DER MERWE. 1992. Systematic studies in the genus *Mohria* (Pteridophyta: Anemiaceae) I. Comparative morphology and anatomy of the rhizome and frond. *South African Journal of Botany* 58:83–89.
- SANTOS, M. G., L. M. ROCHA, E. S. CARVALHO, AND A. KELECOM. 2006. Isoafricanol, um sesquiterpeno incomum encontrado na pteridófito *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu* 8:71–75.
- SANTOS, M. G. AND L. S. SYLVESTRE. 2006. Aspectos florísticos e econômicos das pteridófitas de um afloramento rochoso do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 20:115–124.
- SEN, U. AND B. DE. 1992. Structure and ontogeny of stomata in ferns. *Blumea* 37:239–261.
- SHARMA, A. K., M. GANGWAR, A. P. CHTAURVEDI, A. S. K. SINHA, AND Y. B. TRIPATHI. 2012. Comparative analysis of phenolic and flavonoid content of *Jatropha curcas* L. *Plant Arch* 12:823–826.
- SHOBE, W. R. AND N. R. LERSTEN. 1967. A technique for clearing and staining Gymnosperm leaves. *Botanical Gazette* 128:150–152.
- SIDDIQUI, Z. AND S. ARIF-UZ-ZAMA. 2004. Effects of benlate systemic fungicide on seed germination, seedling growth, biomass and phenolic contents in two cultivars of *Zea mays* L. *Pakistan Journal of Botany* 36:577–582.

- SILVA, J. B. 2016. Panorama sobre a vegetação em afloramentos rochosos do Brasil. *Oecologia Australis* 20:451–463.
- SMITH, F. H. AND E. C. SMITH. 1942. Anatomy of the inferior ovary of *Darbya*. *American Journal of Botany* 29:464–471.
- STRACK, D. 1997. Phenolic Metabolism. Pp. 387–390, in P. M. DEY AND J. B. HARBONE (eds.), *Plant Biochemistry*, Harcourt Private Limited, India.
- SVENDSEN, A. B. AND R. VERPOORTE. 1983. *Chromatography of alkaloids*. Elsevier Scientific Publish Company.
- TAIZ, L. AND E. ZEIGER. 2006. Secondary Metabolites and Plant Defense. Pp. 283–308, in L. TAIZ AND E. ZEIGER (eds.), *Plant Physiol* Sinauer Associates, Sunderland.
- THIERS, B. (continuously updated). *Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff*. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Disponível em: <http://sweetgum.nybg.org/ih/>.
- TRYON, R. M. AND A. F. TRYON. 1982. *Ferns and Allied Plants with Special Reference to Tropical America*. Pp. 1–834, Springer-Verlag, New York.
- VALLADARES, F., E. GIANOLI, AND J. M. GÓMEZ. 2007. Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytologist* 176:749–763.
- VICARI, M. AND D. R. BAZELY. 1993. Do grasses fight back? The case for antiherbivore defences. *Tree* 8:137–141.
- VICRÉ, M., H.W. SHERWIN, A. DRIOUICH, M.A. JAFFER, AND J.M. FARRANT. 1999. Cell wall characteristics and structure of hydrated and dry leaves of the resurrection plant *Craterostigma wilmsii*, a microscopical study. *Journal of Plant Physiology* 155:719–726.
- WATERMAN, P.G. AND S. MOLE. 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- WATSON, A. A., G. W. J. FLEET, N. ASANO, R. J. MOLYNEUX, AND R. J. NASH. 2001. Polyhydroxylated alkaloids – natural occurrence and therapeutic applications. *Phytochemistry* 56:265–295.
- WILKINSON, H. P. 1979. The plant surface (mainly leaf). Pp. 97–162, in C. R. METCALFE AND L. CHALK (eds.), *Anatomy of the dicotyledons*. Oxford, Clarendon.
- WINK, M. 2008. Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. *Natural Product Communications* 3:16–1205.
- WINK, M. 2010. Introduction: Biochemistry, Physiology and Ecological functions of secondary metabolism. Pp. 1–19, in M. WINK (eds.), *Biochemistry of plant secondary metabolism*. Blackwell Publishing Limited.
- XAVIER, S. R. S. AND I. C. L. BARROS. 2003. Pteridófitas ocorrentes em fragmentos de Floresta Serrana no estado de Pernambuco, Brasil. *Rodriguésia* 54:13–21.
- ZANENGA-GODOY, R. AND C. G. COSTA. 2003. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do planalto central brasileiro. *Acta botanica brasílica* 17:101–118.

TABELA 1. Taxa selecionados e vouchers analisados na pesquisa. Acrônimos dos herbários entre parênteses de acordo com Thiers (2018)

Espécies	Coletor (Herbário)	Forma de vida	Habitat
A. buniifolia	Pereira 1067 (MG)	RU	Nas rachaduras das rochas, paredão rochoso a pleno sol, solo pedregoso
	Moraes Neto & Feio 02, 05, 06 (MG)		
A. elegans	Pereira 1065 (MG)	RU	Em local sombreado
	Salino 11733 (MG) Glaziou 20163 (MG)		
A. oblongifolia	Pereira 1066, 1072 (MG) Heringer 3534, 6317, 17702 (MG)	RU	Sobre arenito, em ambiente sombreado, em local aberto a pleno sol, em paredão rochoso, savana, solo pedregoso, brejo seco e vegetação com árvores e arbustos esparsos
	Moraes Neto & Feio 07 (MG)		
	Sobral 3824 (MG)		
A. phyllitidis	Oliveira 6333 (MG) Jangoux 1544 (MG) Heringer 1025, 3216, 6210 (MG)	RU/TE	Margem de estrada em solo encharcado, mata de terra firme, mata ciliar, mata baixa sobre lajeados rochosos, blocos rochosos, mata abaixo de cachoeira sobre blocos de rocha e córregos
	Plowman 8514 (MG)		
	Pereira 1029 (MG)		
A. presliana	Moraes Neto & Feio 01, 03, 04 (MG)	RU	Em ambiente sombreado e a pleno sol
A. trichorhiza	Pereira 1071 (MG)	RU	Em paredão rochoso a beira de estrada a pleno sol

Legenda: Formas de vida: TE (Terrícola); RU (Rupícola).

TABELA 2. Caracteres anatômicos observados nas espécies de Anemia

Características	A. buniifolia	A. elegans	A. oblongifolia	A. phyllitidis	A. presliana	A. trichorhiza
Lâmina foliar						
Folha hipostomática	+	-	+	+	+	-
Folha epiestomática	-	+	-	-	-	-
Folha anfiestomática	-	-	-	-	-	+
Tricoma glandular	-	+	+	+	+	+
Tricoma não glandular	+	+	+	+	+	+
Estegmata cônicos	-	-	+	+	+	+
Mesofilo homogêneo	-	+	-	-	-	-
Mesofilo ligeiramente dorsiventral	+	-	-	+	-	+
Mesofilo dorsiventral	-	-	+	-	+	-
Extensão de bainha	-	+	-	+	-	+
Raque						
Tricoma glandular			+	+	+	-
Tricoma não glandular			+	+	+	-
Feixe vascular com xilema em V			-	-	-	+
Feixe vascular com xilema em arco			+	+	+	-
Pecíolo						
Estômatos	+	-	+	+	+	-
Tricoma glandular	-	+	-	+	-	+
Tricoma não glandular	+	+	+	+	+	+

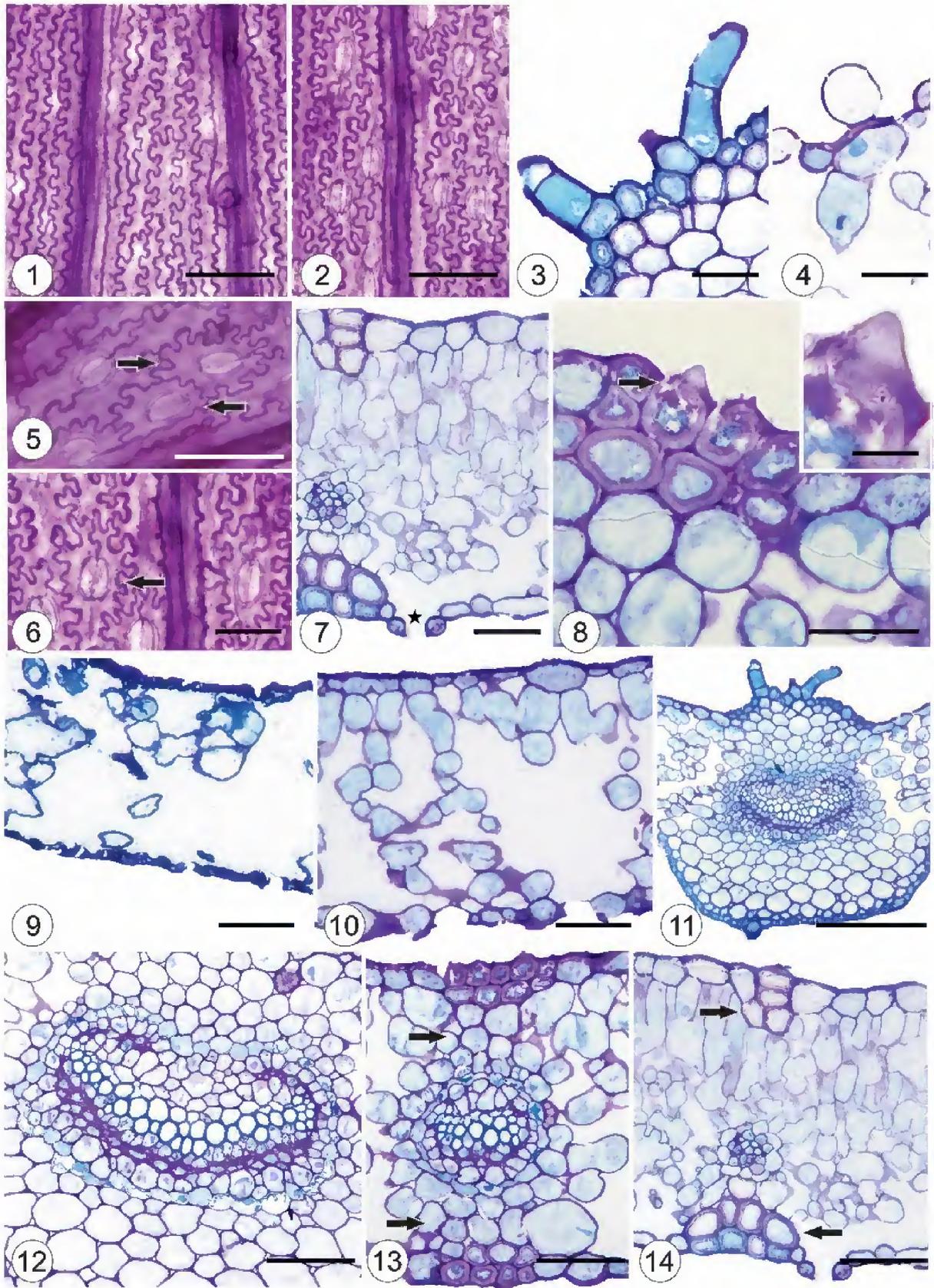
TABELA 3. Resultados de testes histoquímicos na secreção de Anemia

Legenda: resultado positivo (+); resultado negativo (-)

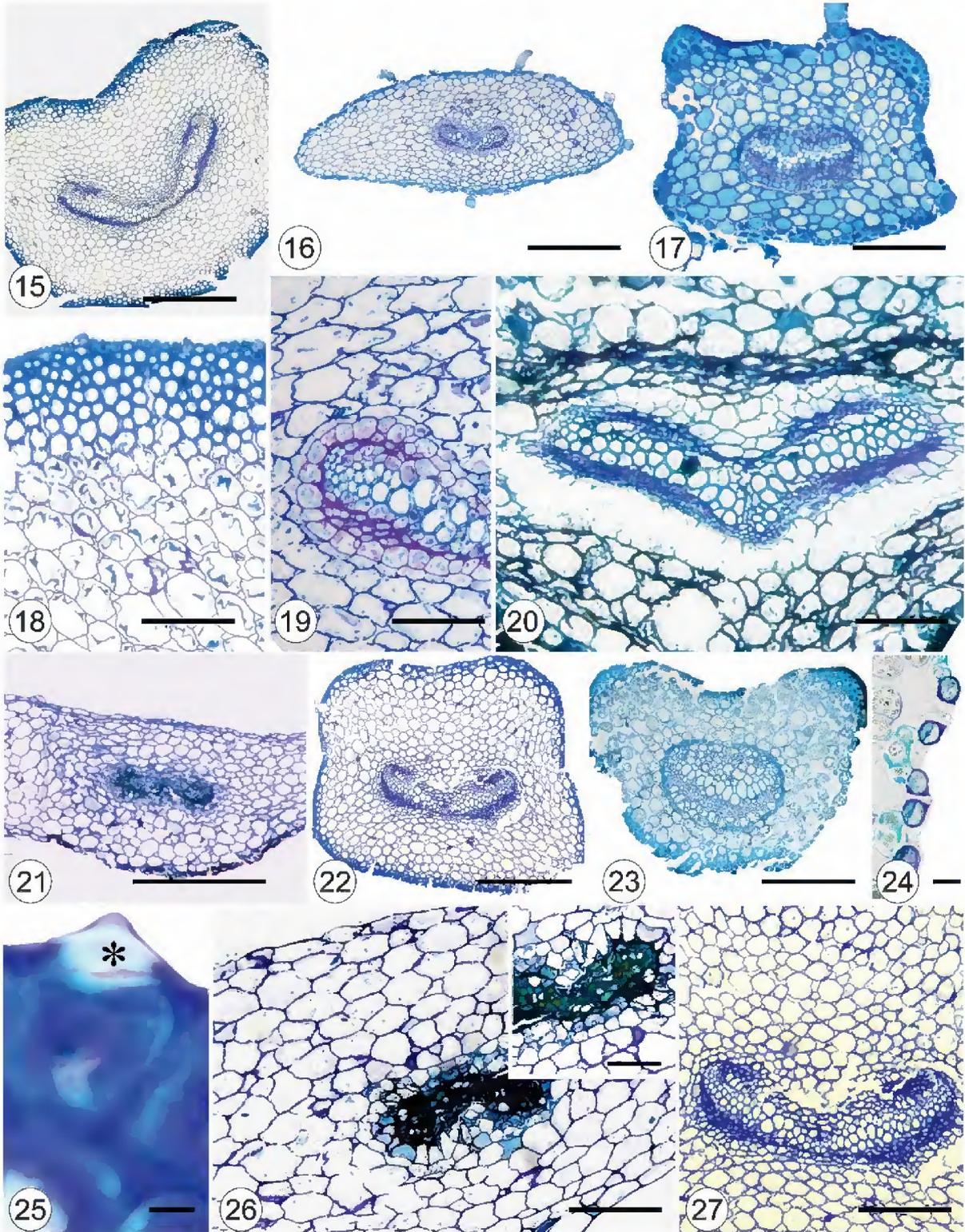
Testes		Espécies			
		<i>A. buniifolia</i>	<i>A. oblongifolia</i>	<i>A. presliana</i>	<i>A. trichorhiza</i>
Lipídios totais	Preto de Sudan B	-	-	-	-
Compostos fenólicos totais	SFF (fig.28-30)	+	+	+	+
Taninos	Vanilina clorídrica	-	-	-	-
Alcaloide	Reagente de Dragendorff (fig.31-32)	+	+	+	+
Mucilagem ácida	Vermelho de rutênio (fig.33-35)	+	+	+	+
Mucilagem neutra	Ácido tânico/cloreto férico	-	-	-	-
Amido	Lugol (fig.36-37)	+	+	+	+
Proteínas totais	Xilidine Ponceau (fig.38-39)	+	+	+	+

LEGENDAS E FIGURAS

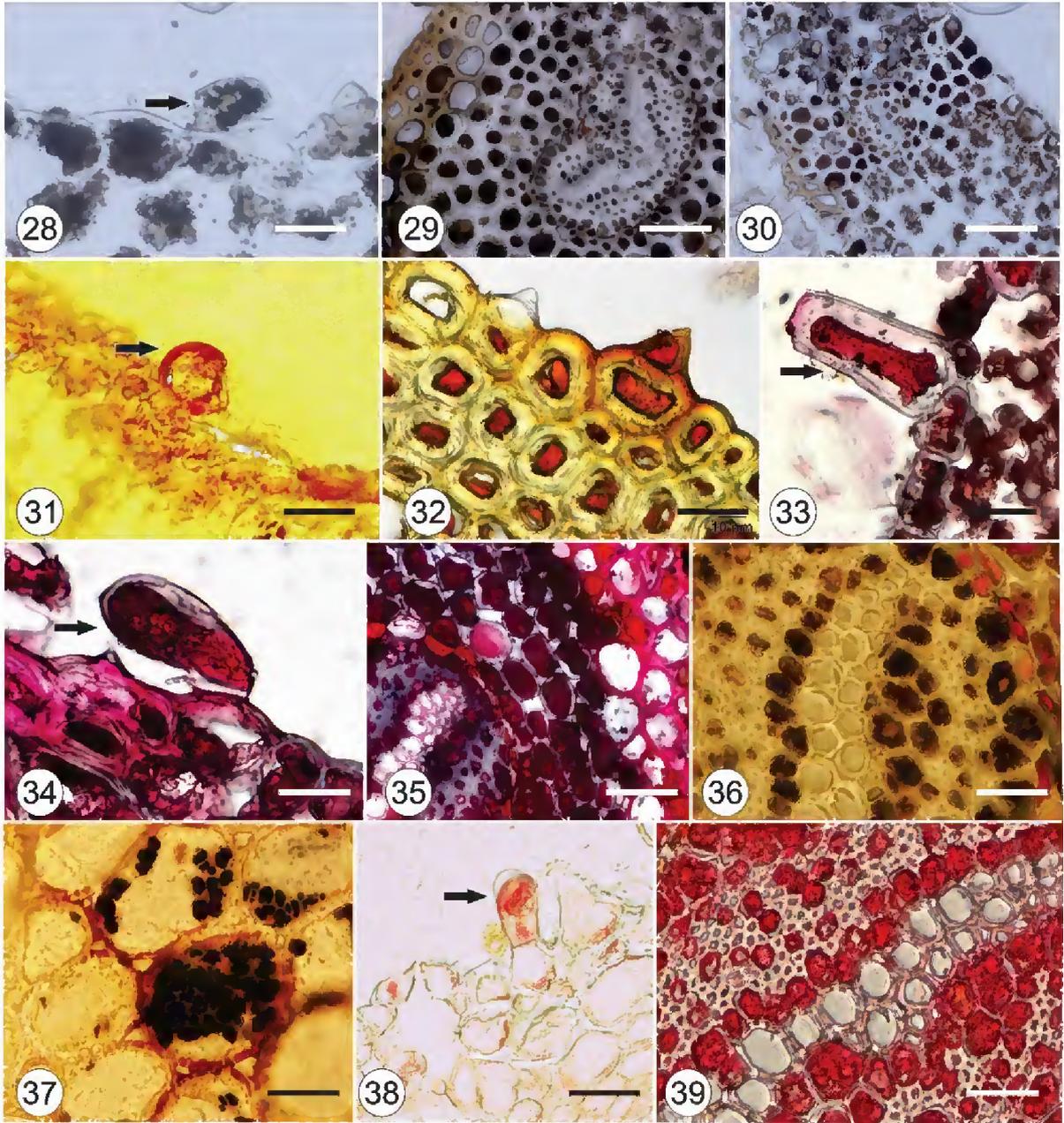
FIGURAS 1-14. **1.** Vista frontal da epiderme adaxial. **2, 5, 6.** Vista frontal da epiderme abaxial. **5.** Estômatos do tipo flutuante (setas); **6.** Estômatos do tipo suspenso (seta). **3, 4, 7-14.** Secções transversais da lâmina foliar. **3.** Tricoma não glandular; **4.** Tricoma glandular. **7.** Mesofilo dorsiventral, notar epiderme uniestratificada e estômatos acima das células epidérmicas ordinárias (estrela). **8.** Epiderme com estegmata cônico (seta). **9.** Mesofilo homogêneo. **10.** Mesofilo ligeiramente dorsiventral; **11.** Nervura principal côncavo-convexa. **12.** Nervura principal com sistema vascular anficrival. **13.** Extensão de bainha parenquimática (setas). **14.** Células esclerenquimáticas (setas) sobre os feixes vasculares anficrivais. Barras = 20 μm (3, 4, 8); 50 μm (1, 2, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14).



Figuras 15-27. **15-20.** Secções transversais da raque de Anemia. **21-27.** Secções transversais do pecíolo de Anemia. **15-17.** **15.** Forma cordiforme. **16.** Forma cilindroide. **17.** Forma trapezoide. **18.** Região cortical composta por esclerênquima e parênquima. **19.** Endoderme uniestratificada **15, 16.** Sistema vascular anficrival arranjado em arco. **20.** Sistema vascular anficrival arranjado em V. **21.** Forma cilindroide. **22.** Forma trapezoide. **23.** Forma cordiforme. **24.** Estômatos formando a linha respiratória. **25.** Estegmata cônico na epiderme (asterísco). **26.** Sistema vascular com inset da endoderme. **27.** Sistema vascular arranjado em arco. Barras = 20 μm (25); 50 μm (18, 19, 20, 24, 26, 27); 300 μm (15, 16, 17, 21, 22, 23).



Figuras 28-39. Resultados positivos dos testes histoquímicos aplicados na secreção das estruturas secretoras foliares de Anemia. **28-30.** SFF: compostos fenólicos totais, notar a secreção no tricoma glandular (seta). **31, 32.** Reagente de Dragendorff: alcalóides (seta). **33-35.** Vermelho de rutênio: mucilagem ácida, observar a secreção no tricoma glandular (seta). **36, 37.** Lugol: grãos de amido. **38-39.** Xilidine Ponceau: proteínas totais, notar a secreção no tricoma glandular. Barras = 30 μm (28, 31-34, 37, 38); = 50 μm (29, 30, 35, 36, 39).



Anexo

Normas para publicação no Periódico:

American Fern Journal

CHECKLIST FOR AUTHORS: FORMATTING MANUSCRIPTS FOR
THE AMERICAN FERN JOURNAL UPDATED JANUARY 2018

(There is a short tutorial to help with formatting manuscripts using Microsoft Word posted on the American Fern Journal website [<http://amerfernsoc.org/journal.html>]).

Page charges of ca. \$60-\$110 USD per printed page will be charged to the authors of each accepted manuscript after publication.

If at least one author is a member of the American Fern Society, page charges will be considered optional except for mandatory charges for color figures (see Page 8 below).

Non-members must agree to accept page charges before a manuscript will be considered for review.

AFS membership information may be found online at
<https://www.amerfernsoc.org/take-action/>.

Click the checkbox () before each item to confirm that your manuscript conforms to the formatting described by that item ().

Please submit the completed checklist along with your manuscript.

Necessary Components of Regular Manuscripts (see specific instructions for Taxonomic Treatments and Shorter Notes below):

Manuscripts must be submitted in formats readable by Microsoft Word.

Assemble manuscript in this order: 1) Title page, 2) Abstract page, with key words, 3) Text, 4) Acknowledgments, 5) Literature Cited, 6) Tables, 7) Appendices, if any, 8) Figure legends. Each figure must be submitted as a separate file, not embedded in the manuscript file.

Title page: include title and author's name (or authors' names) and full address(es) including country, and email. For multi-authored manuscripts, indicate the corresponding author, and include his or her email address. Titles should be in bold letters, with all but connecting words capitalized and the title centered on the page. Author names should be in LARGE AND SMALL CAPS and centered. Addresses, both physical and e-mail, should accompany each author's name and should be centered.

If a species name is included in the title, the binomial must be provided but not the authority name. The authority name must be included in the text of the paper at the first mention of the species name (or in a Table). Do not abbreviate genus names that begin sentences.

Informative, one-paragraph abstract (fewer than 250 words) that begins with the word Abstract (in small caps) followed by period and em dash (e.g., ABSTRACT.—).

Structure abstract content to summarize (1) rationale for work, (2) methods applied, (3) results obtained, and (4) conclusions reached. If species names are mentioned in the abstract, the authority need not be included.

Key words (up to 5), followed by a period and an em dash (KEY WORDS.—). Do not include words present in the article title.

Text, including headers and keys if appropriate. The sections should be titled with LARGE AND SMALL CAPITALS (e.g., MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION) and centered on page. Do not use the title INTRODUCTION.

ACKNOWLEDGMENTS (if desired). It may be appropriate to thank editors and anonymous reviewers for their contributions to the manuscript.

LITERATURE CITED—see below for formatting instructions.

Place TABLES after Literature Cited, and numbered in the order they first appear in the text, TABLE 1, TABLE 2, etc. in small caps. Tables must be constructed using the table feature in a word processor, not using an external program such as Excel. Accompany each table must with a short descriptive caption.

PLACE figure captions after Tables. Group captions as a series of paragraphs. Label figures consecutively in the order they first appear in the text, FIG. 1, FIG. 2, etc. in small caps. In text, use ‘Figure’ only at beginning of sentence, otherwise use ‘Fig.’ or ‘Figs.’ Do not use small caps in the text of the manuscript.

For shorter notes and reviews, see checklist at end of this document.

Manuscript Formatting:

Double-space manuscripts throughout.

Set margins (upper, lower, left, right) at 1 inch (2.54 cm), and set Headers and Footers at 0.5 inches (1.27 cm) from top and bottom of page, respectively.

Use 12 point for all text; Cambria or Times New Roman preferred.

In the upper right corner of each page, place the first author's surname with an abbreviated running title and page number (e.g., DIAMOND ET AL.: AQUAPORINS IN CHEILANTHES LANOSA 1)

Left-justify all text except section headers—do not submit center-justified or right justified text.

Do not use footnotes.

Do not break words at end of lines.

Format second level headings in Italics followed by a period and an em dash with no spaces (e.g., *Taxon sampling.—A total of 92 accessions...*). Third level headings are LARGE AND SMALL CAPITALS followed by an em-dash (—), with normal indentation.

Use S.I. (metric) units for all measures (e.g., distance, elevation, weight) unless quoted or cited from another source (e.g., specimen citations). Imperial units may be presented but only if S.I. unit equivalents are also shown.

Use periods (not commas) to designate decimal points in text, tables, and figures. To indicate a range, use an en dash (e.g., 18–22 cm), not a hyphen (-).

Use hyphens (-) for words (e.g., linear-lanceolate) or names (e.g. Jian-Xing Wang). Do not hyphenate words at the end of lines in the manuscript.

For within-text citations, Latin words such as *sensu lato* or *et al.* must be italicized.

Abbreviate subspecies as ‘*subsp.*’

Italicize all scientific (Latin) names at the generic and lower levels. Do not italicize plant family names or families, subfamilies, tribes, etc. This rule applies to all occurrences of such names—in the main text, the literature cited, figures and figure caption, appendices, etc.

If a sentence begins with a genus name, spell it out, do not abbreviate it.

Authority data (authors) must be given the first time a taxon (at the rank of species or below) is mentioned, or alternately in a table where all relevant names are listed (e.g., table of voucher specimens). Use authors of plant names as posted on The International Plant Names Index (<http://www.ipni.org/>).

Italicize names of DNA loci (e.g., *rbcL*, *ndhF*, *rpL16*, *trnL-trnF*). This rule applies to all occurrences of such names—in the main text, literature cited, figures and figure captions, appendices, etc.

All references cited within the text, appendices, or captions must be included in the Literature Cited (and vice-versa).

For within-text citations, references with more than three authors, list the first author, followed by “*et al.*”. In the Literature Cited section, the reference must list the names of all authors.

For multiple parenthetical citations, list references alphabetically by surname of

primary author and separate each author citation by a semi-colon (Anderson et al.,2010; Billings, 1998, 2001; Carlisle and Diamond, 1962).

Use Index Herbariorum (Regnum Veg. 120:1-693. 1990; or <http://sweetgum.nybg.org/ih/>) for designations/acronyms of herbaria.

Data [Skip parts of this section if not applicable to your manuscript.]

Voucher specimens must be cited in a table or an appendix to document sources of morphological and molecular data. Vouchers are herbarium specimens, not living plant accession numbers from botanical gardens or DNA tube numbers, etc.

All molecular sequences used as data must be deposited in one of the international nucleotide sequence databases, preferably GenBank. Post-review final manuscript will not be accepted until sequence database accession numbers are included.

Newly reported sequences must be documented by an herbarium specimen. Previously published sequences may cite the voucher or a literature citation with voucher information.

All data sets for phylogenetic analyses must be submitted to TreeBASE (<http://www.treeBASE.org>). A TreeBASE accession number (study number alone is acceptable) must be cited in the Materials and Methods section in the final version of the manuscript. For manuscript review, either submit the data file together with the manuscript (if data are not yet in TreeBASE) or provide the name and P.I.N. of the author who submitted the data to TreeBASE. Referees will need this information to gain access to the submitted data sets.

Citations for primers or sequences for new primers must be given.

Statistics [Skip parts of this section if not applicable to your manuscript.]

Key descriptive statistics of all samples must be either numerically (mean \pm standard deviation) or graphically reported.

Reporting of all statistical tests of hypothesis must include the test statistic (e.g., F, T, or R²), sample size(s), and associated p-value.

The methods by which parametric assumptions of parametric tests of hypothesis were tested and the results of those tests must be reported, e.g., “Assumption of homoscedasticity was met per Levene’s test using a critical value of 0.05”).

When parametric assumptions are not met, appropriate non-parametric tests of hypothesis must be used.

Post-hoc tests must be reported for all significant multi-sample tests of hypothesis; e.g., ANOVA or Kruskal-Wallis tests.

The program(s) used to conduct each statistical test must be reported.

Rationale for using a critical value other than the standard of 0.05 must be justified.

Taxonomic Treatments [Skip this section if not applicable to your manuscript.]

If a new taxonomic name or combination is included in the title of the manuscript, do NOT include the name of the taxonomic authority associated with the new name.

For nomenclatural matter (i.e., synonymy, typification) use one paragraph per homotypic basionym (see *Regnum Vegetabile* 58:39-40. 1968). Heterotypic basionyms are in separate paragraphs.

New names and combinations must always be included in the Abstract.

New names and new combinations must be in bold and italicized. All other names of accepted taxa and synonyms must be italicized but not in bold.

If specimens are cited, use the following forms:
TYPE: MEXICO. Nuevo León: 24 km S of San Roberto Jct., 26 Sep 1970, Turner 6214 (holotype: TEX!; isotype: UC!).

Additional Specimens Examined. U.S.A. Michigan: Lapeer Co., along Flint River, 1.5 mi NE Columbiaville, 5 Jul 1955, Beal s.n. (NCSC). Ohio: Wood Co., just W Scotch ridge, 7 Jun 1955, Elev. 350m, Beal 1073 (US).

Note that specimens in the nomenclatural section directly examined by the authors must be followed by an exclamation point (e.g., US!).

Images of specimens seen by the author must be noted (e.g., Holotype K, image seen).

Each country begins a new paragraph.

Descriptions of new taxa (species and below) must include the following: 1) an illustration (line drawing) clearly showing the diagnostic characters, 2) a comparison with related (or sympatric, or similar) taxa in a dichotomous key or table, and 3) a discussion of the characteristics, ecology, geography, or reproductive biology, etc. that are the basis for its distinctiveness.

When designating a lectotype (or neotype) in your manuscript, use the following format after the specimen citation: (lectotype, here designated: NY). If citing a lectotype (or neotype) previously designated, use the following format: (lectotype, designated by Mori, 1991: NY) and add this citation to the Literature Cited.

Formatting Literature Cited:

List references in alphabetical order according to first author's surname (last name). List the references by a given first author in chronological order, regardless of the number of additional authors. For references that would otherwise have the same in-text citation (e.g., the same authors and year of publication for those references with three or fewer authors, or the same first author and year of publication for those references with more than three authors), follow the date by the character "a", "b", etc.

Each reference cited in the text, appendices, or captions must be provided in the LITERATURE CITED, and vice versa.

Names of all authors must be in SMALL CAPS format, including the "AND" in multiple author citations (e.g., RODRIQUES AND SMITH).

Abbreviate authors first or middle names (e.g., R. T. SMITH).

For multiple author works, use 'AND' in SMALL CAP letters and preceded by a comma before name of last author (e.g., R. T. SMITH, Y.-L. WANG, AND A. J. RAMIREZ).

For multi-authored works, the names of all authors must be provided.

Provide complete titles for all journals. Do not abbreviate.

Volume and page numbers must be separated by a colon only, not a colon followed by a space, with a period after the last page number (e.g., 107:85–96.).

Do not cite the issue of a volume if the journal is paginated continuously across the issues. If citing number or issue of volume, do so parenthetically after the volume (e.g., 107(1):85–96.).

To separate page numbers use an en dash (e.g., 45–78) not a hyphen (-).

For chapters within a book, cite these using the following format: Wagner, W. H., Jr. 1990. Ophioglossaceae. Pp. 193–197, in K. U. Kramer and P. S. Green (eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants. Volume I. Pteridophytes and Gymnosperms*. Springer-Verlag, New York.

For other matters of form or style, consult recent issues of the *American Fern Journal* and *The Chicago Manual of Style*, 14th ed. (1993, Univ. of Chicago Press, Chicago).

Figures and Illustrations:

Authors must pay charges for the use of color figures. The mandatory charge for color in the pdf version only and grayscale in print is \$60 per figure. The mandatory charge for color in both pdf and print is approximately \$90 per figure.

Illustrations must be proportioned to fit the page width (5 inches or 12.5 cm) with caption ultimately to be included on the same page.

High-resolution files are required for final publication.

Grayscale or color images with no text must be submitted at 300 dpi or higher. Combination, color, or grayscale with text must be at 600 dpi or higher.

Line/bitmap, text, and line images (black and white) must be submitted at 1200 pixels per inch (dpi). Image files must be saved with LZW compression and with grayscale.

Minimum thickness for lines is 0.25 points.

Submit image files in TIFF (.tif), JPEG (.jpg), PDF (.pdf), Photoshop (.psd) or EPS (.eps) format.

In composite blocks, abut edges of adjacent photographs.

Avoid combining continuous-tone and line-copy in single illustrations.

Include a scale and indication of latitude and longitude in each map.

Please note that nearly all images that are downloaded from the Internet or that are in JPEG or GIF format will be 72 dpi and not acceptable for the printing process.

For additional information, please refer to the Allen Press online “Guide to Art Preparation” and “Guide to Allen veriFig” at: <http://allenpress.com/resources/library>

Formatting Shorter Notes:

Place the heading SHORTER NOTE at the top of the first page in bold, small caps.

Shorter Notes do not have Abstracts or Key Words.

Begin manuscript with descriptive title in bold, followed by a period and an em dash. (e.g., First record of *Pellaea ovata* (Pteridaceae) from Brazil.—).

Immediately (no spaces) after title, place text, double spaced.

Citations must be provided parenthetically (e.g., Reed, *American Fern Journal* 42:53–56. 1952). Spell out journal titles (do not abbreviate) and do not include title of journal articles.

Once a source has been cited, a second citation of the same source need only refer to the

author(s) and year of publication. Volume and page numbers must be separated by a colon only, not a colon followed by a space, with a period after the last page number (e.g., 107:85–96.).

Do not cite the issue of a volume if the journal is paginated continuously across the issues. If citing number or issue of volume, do so parenthetically after the volume (e.g., 107(1):85–96.)

To separate page numbers use an en dash (e.g., 45–78) not a hyphen (-).

Names of authors must follow acknowledgements in final paragraph of manuscript. Last sentence of acknowledgements must end with a period followed by an em dash (e.g., ...for improvements to the manuscript.—). Author names must be formatted in small caps (e.g., C. J. ROTHFELS, E. M. SIGEL, AND M. D. WINDHAM) followed by address.

Figures and Illustrations must be formatted per instructions for full-length manuscripts; see above.

Additional stipulations for preparation of manuscripts can be found at <http://amerfernsoc.org/journal.html> by clicking on AFS Fern Journal in the list to the right.