



Influência do tamanho do genoma e do número cromossômico na
evolução de *Hymenophyllum* Sw. (Hymenophyllaceae Mart.,
Polypodiopsida) no domínio da Mata Atlântica brasileira

Fernanda Pessi de Abreu

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências, Departamento de Genética
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Influência do tamanho do genoma e do número cromossômico na evolução de
Hymenophyllum Sw. (Hymenophyllaceae Mart., Polypodiopsida) no domínio da Mata
Atlântica brasileira

Fernanda Pessi de Abreu

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do título de
**Mestre em Genética e Biologia
Molecular**

Orientadora: Prof. Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Felipe Gonzatti

Porto Alegre

Dezembro, 2023

Instituições e Fontes Financiadoras

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e na Universidade de Caxias do Sul (UCS), sendo realizado no Laboratório de Citogenética Vegetal do Departamento de Genética da UFRGS (Porto Alegre – Brasil) e no Herbário da Universidade de Caxias do Sul (Caxias do Sul – Brasil). O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil (CNPq – processo nº 130071/2022-6), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (FAPERGS – processo nº 21/2551-0000780-0) e pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS (PPGBM – UFRGS).

“...the Pteridophyta are difficult cytological materials. They keep a cytologist on his mettle the whole time to an extent that the student of the more familiar Flowering Plants only rarely experiences, and only by patience, skill and the application of the most modern methods can success be achieved.”

Manton 1950

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todas as pessoas que tornaram possível a conclusão deste trabalho. Primeiramente, quero agradecer à minha orientadora, Eliane Kaltchuk Dos Santos, pela sua orientação cuidadosa, paciência e apoio constante ao longo deste processo. Também sou imensamente grata ao meu co-orientador, Felipe Gonzatti, por sua orientação e incentivo ao longo desta jornada. Sua paixão pela botânica e pela pesquisa é contagiante, inspirando-me desde a graduação e mostrando-me o fantástico e fascinante mundo das plantas.

Agradeço a todos meus professores, cujo conhecimento e sabedoria contribuíram significativamente para a minha formação. Suas aulas e conselhos foram fundamentais para minha formação como bióloga e pesquisadora. Em especial, a minha orientadora de iniciação científica, Scheila de Avila e Silva.

Aos meus amigos e colegas de mestrado, agradeço pela amizade e pelo suporte emocional. Suas palavras de incentivo e alegria trouxeram leveza aos momentos mais intensos. Catherine Guzati, Julia Gabriele Dani, Taciane Schröder Jorge, Isabela Andrade Bahima, Fernando Fernandes de Oliveira Neto, Gustavo Pedroso de Moraes, Bruno Gomes de Souza, Diego Castellan Elias, Gabriele Zenato Lazzari, Nikael de Souza Oliveira, cada um de vocês contribuiu de maneira única para o meu crescimento e aprendizado, e esteve presente durante o mestrado de algo forma.

À pessoa que esteve ao meu lado durante todo esse período, meu companheiro Pedro Lenz Casa, agradeço por seu amor, compreensão e apoio incondicional. Sua paciência e encorajamento foram fundamentais para superar os desafios dessa jornada. Por último, mas definitivamente não menos importante, quero expressar minha gratidão à minha família. Agradeço por todos os sacrifícios, amor e pela fé inabalável que vocês sempre depositaram em mim. Este trabalho é tão meu, quanto é de vocês, sou imensamente grata por ter uma família tão incrível ao meu lado.

Não poderia deixar de agradecer ao café e aos docinhos por serem fontes inesgotáveis de energia e por me darem desculpa para procrastinar quando eu deveria estar escrevendo. À minha cama, que me recebeu calorosamente nos momentos em que eu precisava de uma pausa. E, é claro, aos memes e vídeos engraçados que me salvaram nos momentos de estresse, obrigado por proporcionarem risadas terapêuticas.

Sumário

1. Introdução Geral	9
1.1. As Samambaias e a Família Hymenophyllaceae	9
1.2. O gênero <i>Hymenophyllum</i>	11
<i>Características Gerais</i>	11
<i>Diversidade no domínio da Mata Atlântica</i>	13
<i>Aspectos Citogenéticos</i>	15
2. Objetivos	19
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos Específicos	19
Capítulo I - A global review on chromosome number and genome size for the filmy ferns family (Hymenophyllaceae Mart., Polypodiopsida)	20
Capítulo II - Chromosome Number for <i>Hymenophyllum</i> (Sw.) Sw. / IAPT chromosome data 40/1	63
<i>Print Version</i>	64
<i>Electronic Version</i>	65
Capítulo III - Chromosome number and genome size of <i>Hymenophyllum</i> subg. <i>Sphaerocionium</i> (Hymenophyllaceae): evolutionary implications for species in the Brazilian Atlantic Forest	70
6. Considerações Finais	125
7. Referências	126
Anexo I - Número Cromossômico e Tamanho de Genoma para espécies da subfamília Trichomanoideae	132
Anexo II - Chromosome Number for Iridaceae Juss./IAPT chromosome data 40/5	136
<i>Print Version</i>	137
<i>Electronic Version</i>	138

Resumo

Hymenophyllaceae compreende mais de 450 espécies de samambaias organizadas em duas subfamílias: Trichomanoideae e Hymenophylloideae. *Hymenophyllum*, único gênero da linhagem Hymenophylloideae, apresenta considerável diversidade morfológica, além de extrema variação no número de cromossomos. Além disso, o gênero apresenta distribuição dos trópicos até as regiões temperadas. Na Mata Atlântica, um centro de diversidade e endemismos para as samambaias, ocorrem 26 espécies de *Hymenophyllum*. Entre diversos fatores que influenciam a evolução das plantas estão as características citogenéticas. Na família, o tamanho de genoma e número cromossômico têm sido utilizados como critérios adicionais em estudos taxonômicos e evolutivos. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a influência do número cromossômico e do tamanho de genoma na evolução de *Hymenophyllum*. O trabalho está estruturado em três capítulos. O primeiro consiste em uma revisão dos dados citogenéticos previamente publicados para a família, abrangendo informações sobre número de cromossomos e o tamanho do genoma para 158 e 15 espécies, respectivamente. Essas características exibem uma notável variação entre as espécies, com números cromossômicos de $n = 11$ a 178 e tamanhos de genoma de $2C = 21,47$ a $73,2$ pg. Essa revisão identificou padrões na distribuição de números cromossômicos na família e aborda desafios metodológicos que permeiam a aquisição de dados citogenéticos. O segundo capítulo apresenta dados citogenéticos obtidos de sete populações de quatro espécies de *Hymenophyllum*. Os números de cromossômicos encontrados variaram de $n = 13$ até $n = 56$, enquanto o tamanho do genoma variou de $2C = 36,17$ pg até $129,49$ pg. Curiosamente, o maior tamanho do genoma encontrado em nossas análises é, não apenas o maior para *Hymenophyllum*, mas também o maior para toda a família. No terceiro capítulo, foram obtidos dados citogenéticos de 11 espécies de *Hymenophyllum* subg. *Sphaerocionium* da Mata Atlântica. Esses dados foram analisados sob uma perspectiva filogenética. Para isso, a filogenia de Hymenophyllaceae foi reconstruída para investigar a evolução do número de cromossomos e o tamanho do genoma. Enquanto as estimativas de tamanho do genoma mostraram uma variação em *Sphaerocionium*, de $2C = 31,32$ pg até $54,27$ pg, o número de cromossomos permaneceu constante ($n = 36$), com exceção *H. hirsutum* que apresentou dois citótipos ($n = 36$ e 72). A reconstrução do tamanho do genoma ancestral mostrou que eventos de aumento e reduções ocorreram ao longo da história evolutiva, sendo que espécies relacionadas não apresentam conteúdo de DNA semelhante. A evolução na família do número cromossômico envolveu eventos de dispoloidia, poliploidia e demi-poliploidia. Em *Sphaerocionium* são retratados apenas dois eventos de duplicação intraespecíficos, evidenciando que alterações no número cromossômico podem não ter influenciado diretamente sua evolução. Em Hymenophyllaceae, o número cromossômico haplóide 11 foi reconstruído como ancestral. Em *Hymenophyllum*, houve um ganho de um par de cromossomos, elevando o provável número ancestral para $n = 12$. Já no em *Sphaerocionium*, temos $n = 36$ como ancestral, que provavelmente foi resultado de eventos de poliploidia e demi-poliploidia. *Hymenophyllum* apresenta o maior número de eventos de transição de cromossomos quando comparado com os outros gêneros da família. Assim, a maior taxa de diversificação nesse clado pode estar associada com as mudanças cariológicas que ocorreram ao longo do tempo. Os novos dados integrados com a filogenia contribuem para o avanço do conhecimento sobre a evolução da família, além de estabelecer uma base para estudos futuros em samambaias.

Palavras-chave: Análises evolutivas; Características citogenéticas; conteúdo de DNA; samambaias; *Sphaerocionium*.

Abstract

Hymenophyllaceae comprises over 450 fern species organized into two subfamilies: Trichomanoideae and Hymenophylloideae. *Hymenophyllum*, the only genus of the Hymenophylloideae, displays considerable variation in morphology as well as in chromosome number. Furthermore, the genus has a distribution from the tropics to temperate regions. A total of 26 *Hymenophyllum* species occur in the Atlantic Forest, a center for diversity and endemism of ferns. Among the factors known to drive plant evolution are cytogenetic characteristics. Regarding this subject, Hymenophyllaceae chromosome number and genome size have been employed as additional criteria in taxonomic and evolutionary studies. In this context, our study aimed to investigate the influence of chromosome number and genome size in the evolution of *Hymenophyllum*. This document is structured in three chapters. The first consists in a review of previously published cytogenetic data for Hymenophyllaceae, encompassing information on chromosome number and genome size for 158 and 15 species, respectively. These characteristics exhibit noteworthy variation among species, having chromosome numbers ranging from $n = 11$ to 178 and genome sizes ranging from $2C = 21.47$ to 73.2pg. This review identified patterns in chromosome number distribution in the family and lays out several methodological challenges associated with cytogenetic data acquisition for the group. The second chapter is dedicated to new cytogenetic data obtained for seven populations of four *Hymenophyllum* species. While chromosome numbers ranged from $n = 13$ to 56, genome sizes ranged from 36.17 to 129.49 pg. Interestingly, the largest genome size estimated in our study is not only the largest size ever found for *Hymenophyllum*, but also the largest for the whole family. In the third chapter we report the cytogenetic data obtained for 11 *Sphaerocionium* species in the Atlantic Forest. These data were analyzed through a phylogenetic perspective. Accordingly, the Hymenophyllaceae phylogeny was reconstructed in order to base our investigations on chromosome number and genome size evolution. The *Sphaerocionium* genome sizes showed a variation ranging from $2C = 31.32$ pg to 54.27 pg. In contrast, the chromosome number of $n = 36$ remained constant for the subgenus, with exception of *H. hirsutum* which displayed two cytotypes ($n = 36$ and 72). Ancestral genome size reconstruction revealed increments and reductions throughout the evolutionary history of the group, resulting in dissimilar DNA content even across closely related species. Evolution of chromosome number in the family involves events of dysploidy, polyploidy and demi-polyploidy. Only two intraspecific transition events of duplication were predicted for *Sphaerocionium*, suggesting that chromosome number alterations might not have played a major role in the evolution of this genus. A haploid chromosome number of 11 was reconstructed as ancestral for Hymenophyllaceae. In genus *Hymenophyllum*, a chromosome pair is gained, elevating the most likely ancestral number of this clade to $n = 12$. As for subgenus *Sphaerocionium*, $n = 36$ is inferred as the ancestral state, likely resulting from polyploidy and demi-polyploidy events. Overall, genus *Hymenophyllum* has more chromosome transition events when compared to other genera within the family. Thus, the higher diversification rate for this clade may be associated by the karyological changes throughout time. In summary, the new data gathered in our research integrated in a robust phylogenetic framework has allowed significant contributions towards advancing the current understanding of Hymenophyllaceae evolution, establishing a solid foundation for future fern studies.

Key-words: Evolutionary analyses; cytogenetic traits; DNA content; ferns; *Sphaerocionium*

1. Introdução Geral

1.1. As Samambaias e a Família Hymenophyllaceae

Samambaias e licófitas evoluíram e se diversificaram em cerca de 12 mil espécies existentes em todo o mundo (PPG I, 2016, Mehltreter *et al.*, 2010). Ambos os grupos comumente são referidos artificialmente como pteridófitas e são conhecidos por apresentarem esporos livres, serem vasculares e possuírem ciclo reprodutivo marcado pela alternância de gerações, consistindo em uma fase multicelular haplóide (fase gametofítica) é uma fase multicelular diplóide (fase esporofítica). As samambaias, ou monilófitas, integram diferentes ecossistemas e possuem uma ampla diversidade ecológica e morfológica (Judd *et al.*, 2009; Mehltreter *et al.*, 2010). No Brasil, são reconhecidas mais de 1400 espécies de samambaias e licófitas distribuídas em 39 famílias (Flora e Funga do Brasil, 2023). Além disso, o domínio da Mata Atlântica é um dos centros de diversidade e endemismos do grupo na região neotropical (Tryon, 1972; Suissa & Sundue, 2020).

Hymenophyllaceae Mart. está entre os grupos de samambaias ocorrentes na Mata Atlântica e é a única família da ordem Hymenophyllales A.B.Frank, compreendendo cerca de 430 espécies distribuídas em duas subfamílias: Trichomanoideae C.Presl, e Hymenophylloideae Burnett (PPG I, 2016). Os integrantes desta família apresentam esporângios agrupados em soros marginais protegidos por um involúcro, sendo que em Trichomanoideae as espécies possuem involúcros tubulares (em formato de sino), enquanto em Hymenophylloideae os integrantes possuem, em geral, involúcros bivalvos (Ebihara *et al.*, 2006; PPG I, 2016). Apesar dessa distinção, há estados intermediários entre soros bivalvos e tubulares. Além disso, os involúcros de base cônica ou tubular apresentam estado de caráter plesiomórfico para a família e os involúcros bivalvos provavelmente derivaram de um único evento dentro de Hymenophylloideae (Prayer, 2001).

As espécies de Hymenophyllaceae são conhecidas comumente como *filmy ferns*, visto que apresentam aspecto translúcido devido ao tecido laminar ser, geralmente, constituído por somente uma camada de células (Iwatsuki, 1990). Além desses, outros aspectos também são importantes para caracterização do grupo, como esporângios com anel oblíquo em relação ao receptáculo, esporos clorofilados e triletos, rizomas finos e longo-reptantes (por vezes eretos e robustos), ausência de estômatos e cutícula (ou possuem cutícula muito reduzida) (Smith *et al.*, 2006).

Em geral, espécies de Hymenophyllaceae são encontradas em ambientes com baixa intensidade luminosa e alta umidade relativa (Parra *et al.*, 2009; Proctor, 2012), como florestas nebulares, áreas de respingo ao redor de cachoeiras, ou em rochas ao longo de corpos hídricos (Ebihara *et al.*, 2007). A ocorrência limitada dessas espécies em ecossistemas secos ou com pouca disponibilidade de água está diretamente associada à falta de mecanismos para prevenir a perda de água (Gessner, 1939; Zotz & Büche, 2000; Dubuisson *et al.*, 2003a). Ao longo do tempo existiu uma série de tentativas para classificação infrafamiliar de Hymenophyllaceae, tanto utilizando a taxonomia tradicional (*e.g.* Bosch, 1858; Morton, 1968; Pichi Sermolli, 1977; Iwatsuki, 1990), quanto por meio de técnicas moleculares (*e.g.* Dubuisson, 1997; Pryer *et al.*, 2001; Dubuisson *et al.*, 2003b; Hennequin *et al.*, 2003a; 2003b; Ebihara *et al.*, 2004; Ebihara *et al.*, 2006; Hennequin *et al.*, 2006). Atualmente, são reconhecidos nove gêneros monofiléticos para a família, sendo: *Abrodictyum* C. Presl, *Callistopteris* Copel., *Cephalomanes* C. Presl, *Crepidomanes* (C. Presl) C. Presl, *Didymoglossum* Desv., *Hymenophyllum* Sw., *Vandenboschia* Copel., *Polyphlebium* Copel. e *Trichomanes* L. (Ebihara *et al.*, 2006).

No Brasil, encontram-se 83 espécies de Hymenophyllaceae, das quais 13 são endêmicas. Essas espécies estão distribuídas em sete gêneros, incluindo *Abrodictyum*, *Crepidomanes*, *Didymoglossum*, *Hymenophyllum*, *Vandenboschia*, *Polyphlebium* e *Trichomanes*. A Mata Atlântica se destaca como o domínio fitogeográfico mais rico em diversidade para esse grupo, abrigando todos os gêneros encontrados no Brasil, com um total de 55 espécies (Gonzatti e Windisch, 2023). Esse domínio fitogeográfico, não apenas para Hymenophyllaceae, mas também para todos os grupos de plantas, é o mais diverso do Brasil, com exceção apenas das gimnospermas (Flora e Funga do Brasil, 2023; BFG, 2022).

A Mata Atlântica é um dos 25 hotspots de biodiversidade do mundo (Myers *et al.*, 2000). Contudo, a fragmentação deste bioma aliado às mudanças climáticas torna-se fonte de ameaça às espécies (Gasper *et al.*, 2021; IPCC, 2014; Ribeiro *et al.*, 2009). Além disso, a diversidade de samambaias está fortemente relacionada com a disponibilidade de água, e modificações ambientais podem afetar a distribuição dos táxons (Gasper *et al.*, 2021; Kessler *et al.*, 2011). Como mencionado anteriormente, as Hymenophyllaceae não possuem mecanismos para evitar a perda de água, tornando-as altamente sensíveis às alterações no clima.

1.2. O gênero *Hymenophyllum*

Características Gerais

Além das características típicas de Hymenophyllaceae, *Hymenophyllum* é diferenciado por rizomas longo-reptantes quase glabros ou esparsamente cobertos com tricomas, e involúculos geralmente bivalvos (Ebihara *et al.*, 2006). Para a delimitação das espécies dentro do gênero são utilizadas, principalmente, características da morfologia das frondes, como o formato e a ausência ou presença de tricomas, padrões de segmentação da lâmina foliar, ausência ou presença de alas na raque e nos pecíolos, forma e padrão de recorte dos bordos da lâmina foliar e dos indúsios (Morton; 1947, Windisch, 2014; Ebihara *et al.*, 2006). Esse gênero apresenta a maior diversidade da família, sendo composto por cerca de 250 espécies classificadas em 10 subgêneros (Tab. 1).

Tabela 1. Subgêneros de *Hymenophyllum* com distribuição geográfica e número de espécies.

Subgêneros	Distribuição Geográfica	Nº espécies
<i>Cardiomanes</i> (C. Presl) Ebihara & K. Iwats.	Nova Zelândia	monotípico
<i>Diploöphyllum</i> (Bosch) Ebihara & K. Iwats.	Nova Zelândia	monotípico
<i>Fuciformia</i> Ebihara & K. Iwats.	Chile e Nova Zelândia	2
<i>Globosa</i> (Prantl) Ebihara & K. Iwats	Ásia e Pacífico (somente duas espécies na América)	ca. 25
<i>Hymenoglossum</i> (C. Presl) R.M. Tryon & A.F. Tryon	América e Madagascar	3
<i>Hymenophyllum</i>	cosmopolita	ca. 100
<i>Mecodium</i> C. Presl ex Copel.	cosmopolita	> 35
<i>Myrmecostylum</i> (C. Presl) Ebihara & K. Iwats.	América, Nova Zelândia e Nova Caledônia	ca. 8
<i>Pleuromanes</i> (C. Presl) Ebihara & K. Iwats.	Paleotrópicos, especialmente em regiões do pacífico	5
<i>Sphaerocionium</i> (C. Presl) C. Chr.	cosmopolita	ca. 70

Fonte: Adaptado de Ebihara *et al.*, 2006.

As relações evolutivas em *Hymenophyllum* utilizando marcadores moleculares têm sido exploradas em diferentes estudos. O primeiro estudo que utilizou marcadores moleculares de espécies de *Hymenophyllum* foi conduzido por Dubuisson em 1997. No entanto, o objetivo primordial dessa pesquisa era avaliar a eficácia do gene *rbcL* na

elucidação das relações intraespecíficas da atual subfamília Trichomanoideae (Dubuisson, 1997). Assim, apesar de três espécies de *Hymenophyllum* terem sido incorporadas à filogenia, o estudo não abrangeu a diversidade de espécies desse gênero. Apenas mais tarde no trabalho de Pryer *et al.* (2001) uma filogenia mais robusta que incluiu as duas linhagens de Hymenophyllaceae foi construída a fim de examinar os padrões evolutivos da morfologia dos soros e indúcio. Um achado deste trabalho foi o fato de que o gene *rbcL*, apesar de fornecer uma boa resolução dentro de Trichomanoideae, apresenta baixa resolução dentro de *Hymenophyllum*. Nesse caso, outros genes deveriam ser explorados para o desenvolvimento de hipóteses evolutivas em *Hymenophyllum* (Pryer *et al.*, 2001). Desse modo, o estudo de Hennequin *et al.* (2003a) teve o propósito de testar se o uso de marcadores adicionais, o gene *rps4* e o espaçador intergênico *rps4-trnS*, em conjunto com a inclusão de novas amostras teriam impacto na monofilia de *Hymenophyllum* proposta por Pryer *et al.* (2001). A nova reconstrução filogenética confirmou o monofiletismo de *Hymenophyllum* e mostrou que a região intergênica adicionada às análises era promissora para o grupo (Pryer *et al.*, 2001). Outros trabalhos utilizando abordagem de sistemática molecular que buscaram explorar as relações dentro de *Hymenophyllum* foram conduzidos posteriormente por Hennequin (2003b; 2006; 2010).

Hymenophyllum apresenta distribuição em toda a região tropical até as regiões temperadas (Ebihara *et al.*, 2006). A distribuição geográfica de *Hymenophyllum*, assim como para toda a família, está diretamente ligada às condições climáticas, restringindo a sua ocorrência a ambientes úmidos, embora algumas espécies sejam conhecidas por resistir à dessecação (Zotz & Büche, 2000). Dentre as quais estão *Hymenophyllum caudiculatum* e *Hymenophyllum dentatum* apresentam adaptação poiquilohídrica, sendo capazes de permanecerem em alto estágio de desidratação por longos períodos de tempo (dias ou semanas) e continuar viável após a reidratação (Cea *et al.*, 2014).

Inferências biogeográficas baseadas em dados filogenéticos reportados por Del Rio *et al.* (2017) sugerem que *Hymenophyllum* divergiu há 49,8 Milhões de anos (Ma), enquanto que para Hymenophyllaceae estima-se que esse evento tenha ocorrido a 176,2 Ma durante o Mesozóico. Os subgêneros *Hymenophyllum* e *Mecodium* apresentam divergência mais recente, com idades estimadas de 33,1 e 26,6 Ma, respectivamente. Acredita-se que a origem do gênero provavelmente ocorreu na Nova Zelândia, sendo também inferida como área ancestral para os subgêneros *Hymenophyllum*, *Globosa*,

Pleuromanetes, *Hymenoglossum*, *Fuciformia*, *Cardiomanes* e *Diploophyllum*. No caso do subgênero *Sphaerocionium*, possivelmente, também teve origem na Nova Zelândia, embora tenha sido inferida uma outra área ancestral que inclui tanto a Nova Zelândia quanto a África. O subgênero *Mecodium*, por outro lado, provavelmente teve origem na América do Sul, apesar de também ter sido inferida uma área ancestral que inclui tanto a Nova Zelândia quanto a América do Sul. Por fim, o subgênero *Myrmecostylum* pode ter se originado na América do Sul, Nova Zelândia ou Nova Caledônia, sendo o último cenário mais provável (Del Rio *et al.*, 2017).

Diversidade no domínio da Mata Atlântica

Na Mata Atlântica brasileira ocorrem 26 espécies de *Hymenophyllum* distribuídas nos subgêneros *Globosa*, *Hymenoglossum*, *Hymenophyllum*, *Mecodium*, *Myrmecostylum* e *Sphaerocionium* (Gonzatti e Windisch, 2023). O último subgênero apresenta a maior diversidade nesse domínio fitogeográfico com um total de 14 espécies, não apenas na Mata Atlântica, mas ao comparar as diferentes linhagens, *Sphaerocionium* também apresenta a mais elevada diversidade de espécies na região neotropical (Gonzatti *et al.*, 2020). Dentre os táxons desse subgênero ocorrentes na Mata Atlântica, quatro espécies são endêmicas e sete espécies são enquadradas em categorias de ameaça de extinção (criticamente em perigo, em perigo e vulnerável), de acordo com os critérios da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (IUCN, 2019; Gonzatti *et al.*, 2020). Além disso, *Hymenophyllum delicatulum* Sehnem também consta na lista dos táxons da flora nativa do Rio Grande do Sul ameaçados de extinção instituída pelo decreto 52.109, de 1º de dezembro de 2014 (Rio Grande do Sul, 2014).

As espécies de *Sphaerocionium* possuem hábito epifítico e apresentam sinapomorfia marcada pela presença de tricomas estrelados nas margens, nas nervuras ou na superfície laminar. Todavia, as espécies também podem possuir nas frondes e nos rizomas desde tricomas simples e unicelulares até ramificados e multicelulares (Morton 1947; Ebihara *et al.*, 2006; Gonzatti *et al.*, 2020). Assim, a disposição, a densidade e a variação morfológica dos tricomas foram critérios utilizados em diferentes classificações infra subgenérica de *Sphaerocionium* (e.g. Morton 1947; Morton, 1968). Análises filogenéticas de espécies da Mata Atlântica, utilizando os marcadores *rps4-trnS* e *trnG-trnR*, evidenciaram a natureza monofilética de *Sphaerocionium*. No entanto, o grupo

apresenta uma morfologia altamente variável, o que torna a delimitação taxonômica difícil em níveis mais específicos (Gonzatti *et al.*, 2020).

Além de *Sphaerocionium*, o subgênero *Mecodium* também apresenta representantes na Mata Atlântica (Gonzatti *et al.*, 2023a). As espécies desse grupo são caracterizadas por apresentarem hábito epífito, frondes com tecido laminar glabro e de margem inteira, rizomas longos reptantes, filiformes e glabrescentes (Ebihara *et al.*, 2006). Até então, todas as unidades taxonômicas de *Mecodium* encontradas na Mata Atlântica Brasileira eram tratadas como *Hymenophyllum polyanthos* (Sw.) Sw l.s., devido a falta de caracteres bem estabelecidos para o reconhecimento dos taxa (Gonzatti *et al.*, 2023a). Contudo, por meio de filogenia molecular foi confirmado que *H. polyanthos* l.s. compreende, na verdade, diferentes entidades taxonômicas e a aplicação do nome *H. polyanthos* estaria restrito a espécimes das regiões neotropicais (Vasques *et al.*, 2019). Assim, na Mata Atlântica, *H. polyanthos* s.s. é restrito à floresta de altitude da Serra dos Órgãos no estado do Rio de Janeiro. Outras cinco espécies passaram a ser reconhecidas nesse domínio fitogeográfico, incluindo *H. apiculatum* Mett. ex Kuhn, *H. schomburgkii* C. Presl ex J. W. Sturm., *H. undulatum* (Sw.) Sw., *H. viridissimum* Fée e *H. sturmii* Bosch (Gonzatti *et al.*, 2023a). As últimas duas espécies mencionadas são endêmicas da Mata Atlântica brasileira (Flora e Funga do Brasil, 2023; Gonzatti *et al.*, 2023a). Além disso, as espécies *H. apiculatum*, *H. polyanthos* e *H. viridissimum* são classificadas como vulneráveis de acordo com os critérios da IUCN (Gonzatti *et al.*, 2023a).

O subgênero *Hymenophyllum* apesar de apresentar quase metade da diversidade de espécies do gênero *Hymenophyllum* (Ebihara *et al.*, 2006), na Mata Atlântica, é representado por apenas três espécies (Gonzatti *et al.*, 2023b). O subgênero é caracterizado por apresentar margem dos segmentos foliares e dos involúculos denteadas, e soros dispostos do lado acroscópicos das pinas (Ebihara *et al.*, 2006). As espécies existentes na Mata Atlântica são *Hymenophyllum bradeanum* Gonzatti & Windisch, *Hymenophyllum fucoides* (Sw.) Sw. e *Hymenophyllum megachilum* C.Presl. A espécie *H. fucoides* apresenta distribuição disjunta entre o norte da América do Sul e América Central, e o Sul do Brasil. Apesar disso, análises filogenéticas, utilizando os marcadores *rbcL*, *rbcL-accD*, *rps4-trnS* e *trnG-trnR*, recuperaram amostras da Mata Atlântica brasileira de *H. fucoides* como irmãs de um espécime da Bolívia (Gonzatti *et al.*, 2023b). As outras duas espécies do subgênero, *H. megachilum* e *H. bradeanum*, são endêmicas da Mata Atlântica, sendo a última espécie

categorizada como criticamente em perigo conforme os critérios da IUCN devido ao seu micro endemismo (IUCN, 2019; Gonzatti e Windisch, 2023; Gonzatti *et al.*, 2023b).

Os outros três subgêneros de *Hymenophyllum* com representantes na Mata Atlântica apresentam apenas uma única espécie, sendo *Hymenophyllum asplenioides* (Sw.) Sw. (subg. *Hymenoglossum*), *Hymenophyllum caudiculatum* Mart. (subg. *Globosa*), e *Hymenophyllum magellanicum* (Desv.) Willd. ex Kunze (subg. *Myrmecostylum*). *H. asplenioides* possui ocorrência geográfica que se estende do México ao sudeste do Brasil (Windisch, 2014; Gonzatti & Windisch, 2018). Por outro lado, *H. caudiculatum* tem sido reconhecida como endêmica do Brasil, após análises filogenéticas demonstrarem a separação de *H. caudatum* Bosch., que ocorre no Sul do Chile e da Argentina (Larsen *et al.*, 2020).

Aspectos Citogenéticos

Atualmente, diversos estudos têm buscado dados de número cromossômico e de tamanho de genoma para a compreensão de aspectos evolutivos e biogeográficos em plantas das mais diversas famílias, uma vez que, quando utilizados conjuntamente com outras informações, como morfológicas e moleculares, possibilitam uma análise integrativa das espécies (Guerra, 2008; Pellicer *et al.*, 2018).

As mudanças cromossômicas desempenham um papel importante na evolução de plantas e, portanto, são fundamentais para eventos de diversificação e especiação (Storme & Mason, 2014; Vimala *et al.*, 2021). Isso acontece porque o cariótipo é o produto final de múltiplas forças que operam no genoma em termos de sua estrutura, organização e função (Guerra, 2008). A utilização de características cariológicas ajuda a avaliar as relações entre espécies ou populações e também a compreender os mecanismos que levaram à divergência das diferentes linhagens (Guerra, 2008; Choi *et al.*, 2020).

O número cromossômico é a característica cariotípica mais comumente utilizada em análises citogenéticas (Guerra, 2008). Em *Hymenophyllum* essa foi a principal característica citogenética explorada até o momento. As primeiras contagens para o grupo foram registradas no trabalho de Manton (1950) para *Hymenophyllum tunbrigense* (L.) Sm. ($n = 13$) e *Hymenophyllum unilaterale* Bory ex Willd. ($n = 18$). A obra de Irene Manton não apenas se destacou como um ponto de partida crucial para estudos citogenéticos em Hymenophyllaceae, mas desempenhou um papel fundamental na evolução da pesquisa

dessa natureza para todos os grupos de samambaia (Britton, 1974). Ao longo dos anos, o número cromossômico tem sido extensivamente explorado em estudos taxonômicos, sistemáticos e evolutivos na família, resultando na aquisição de dados para uma ampla diversidade de espécies e regiões geográficas (e.g. Vessey & Barlow, 1963; Walker 1966; Braithwaite, 1975; Tryon *et al.*, 1975; Mitui, 1976; Irudayaraj, 1996; Ebihara *et al.*, 2002; Hennequin *et al.*, 2010).

A reconstrução do número cromossômico ancestral utilizando abordagens filogenéticas propõem para Hymenophyllaceae $n = 36$ e supõe-se que esse número surgiu por poliploidia de 9 (Hennequin *et al.*, 2010). No gênero *Hymenophyllum*, o número cromossômico $n = 36$ também é reconstruído como ancestral e conservado em diferentes linhas evolutivas, como nos subgêneros *Pleuromanes*, *Myrmecostylum*, *Hymenoglossum*, *Cardiomanes*, *Fuciformia*, *Diploophyllum*, *Globosa* e *Sphaerocionium*. Contudo, números cromossômicos mais baixos, como $n = 28$, 18, 14, 13, 12 e 11, são encontrados nos subgêneros *Mecodium* e *Hymenophyllum*, sendo provavelmente resultantes de eventos reducionais (Hennequin *et al.*, 2006; Hennequin *et al.*, 2010).

A reconstrução do número cromossômico ancestral apresentado no trabalho de Hennequin *et al.* (2010) utilizou o programa Mesquite (Maddison and Maddison, 2023). A máxima parcimônia está entre os critérios filogenéticos implementados no programa para reconstrução de carácter ancestral. Apesar do uso da parcimônia permitir a inferência dos números de cromossomos em nós ancestrais, não faz uso de um modelo evolutivo específico para evolução cromossômica e ignora, por exemplo, a possibilidade de transições múltiplas (poliploidia) (Mayrose & Lysak, 2020). Ou seja, o algoritmo utilizado não é especificamente destinado à avaliação de dados cromossômicos. Para ilustrar, ele trata uma mudança de $n = 10$ para $n = 20$ como o resultado de dez alterações sucessivas, em vez de atribuir essa mudança a um único evento de poliploidia (Sader *et al.*, 2019). Assim, considerando as particularidades envolvidas na evolução dos cromossomos, foram desenvolvidos modelos que utilizam princípios matemáticos mais robustos, ao mesmo tempo que consideram os mecanismos pelos quais os cromossomos mudam (Mayrose & Lysak, 2020).

Apesar de *Sphaerocionium* ser o subgênero mais diverso na Mata Atlântica, o mesmo possui dados de número cromossômico disponíveis apenas para a espécie *Hymenophyllum hirsutum* (L.) Sw. ($n = 36$). Essas contagens foram realizadas para

espécimes da Jamaica e Trinidad (Walker, 1966;1985). Os subgêneros *Hymenophyllum*, *Hymenoglossum* e *Mecodium* também apresentam número cromossômico reportado para espécies que ocorrem na Mata Atlântica, sendo *H. fucooides* ($n = 56$), *H. asplenioides* (Sw.) Sw. ($n = 36$), *H. undulatum* ($n = 28$) e *H. polyanthos* ($n = 28 \pm 2$) (Mehra & Singh, 1957; Walker, 1966; 1985; Tatuno & Takei, 1969; Braithwaite, 1975; Löve, 1976). Para as três primeiras espécies, todas as contagens foram realizadas em populações da Jamaica, enquanto *H. polyanthos*, devido à sua ampla distribuição, teve as contagens realizadas em diferentes regiões, incluindo uma população do Brasil.

O tamanho do genoma também desempenha um papel fundamental na compreensão da história evolutiva das espécies. A dinâmica na evolução do genoma moldada pela duplicação do genoma inteiro, amplificação de DNA repetitivo e outros processos, moldam a diversificação das plantas e contribuem para a surpreendente diversidade de espécies de plantas terrestres (Trávníček *et al.*, 2019; Samad *et al.*, 2020; Fujiwara *et al.*, 2023). As consideráveis diferenças no conteúdo de DNA nuclear entre espécies podem estar relacionadas a características adaptativas, o que mostra que o tamanho do genoma pode estar sujeito a pressões seletivas e suas variações associadas à história evolutiva de um grupo (Ohri, 1998).

Em samambaias, estudos sugerem que o tamanho do genoma pode estar relacionado com diferentes fatores. Henry e colaboradores (2014) exploraram a relação entre o tamanho do genoma e onze características morfológicas e ecológicas, sendo significativamente associado ao tamanho de células, tamanho de esporo, tipo de esporo e tipo de habitat (Henry *et al.*, 2014). Outros trabalhos também correlacionaram o tamanho do genoma com número de cromossomos (Clark *et al.*, 2016) e preferência por tipo de hábitat (Wang *et al.*, 2022).

Contudo, apesar da relevância para o estabelecimento de novos *insights*, no gênero *Hymenophyllum* são conhecidos os tamanhos do genoma somente para os subgêneros *Globosa*, *Hymenophyllum* e *Mecodium*, num total de apenas cinco espécies: *Hymenophyllum badium* Hook. & Grev. ($2C = 33,02$ pg), *H. sibthorpioides* Bory ex Willd. ($2C = 36,10$ pg), *H. barbatum* Bosch ($2C = 45,68$ pg), *H. polyanthos* Sw. ($1C = 32,32$ pg), e *H. coreanum* Nakai ($1C = 29,7$ pg) (Clark *et al.*, 2016; Kim & Kim, 2020; Fujiwara *et al.*, 2023). Nenhuma das estimativas realizadas incluiu populações brasileiras. Portanto,

apesar dos avanços em metodologias, em geral, as samambaias ainda carecem de informações acerca do tamanho do genoma (Lima *et al.*, 2021).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho possui como objetivo investigar a influência do número cromossômico e do tamanho de genoma na evolução no gênero *Hymenophyllum* no domínio da Mata Atlântica brasileira.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Identificar, em escala global, os grupos taxonômicos dentro da família Hymenophyllaceae que carecem de informações citogenéticas;
- b) Detectar os desafios metodológicos associados à aquisição de dados citológicos para a família Hymenophyllaceae;
- c) Determinar os números cromossômicos e estimar o tamanho de genoma para as espécies de *Hymenophyllum* ocorrentes nas formações da Mata Atlântica do Sul do Brasil;
- d) Combinar dados de número de cromossomos, tamanho do genoma e filogenéticos a fim de fornecer *insights* sobre a história evolutiva do gênero *Hymenophyllum* tendo como modelo o subgênero *Sphaerocionium*;
- e) Inferir o número cromossômico e tamanho de genoma ancestral para o gênero *Hymenophyllum* e subgênero *Sphaerocionium*;
- f) Identificar quais são os principais mecanismos evolutivos que moldaram o cariótipo e o tamanho do genoma no gênero *Hymenophyllum*, com ênfase no subgênero *Sphaerocionium*.

Capítulo I

A global review on chromosome number and genome size for the filmy ferns family (Hymenophyllaceae Mart., Polypodiopsida)

*Manuscrito submetido para publicação na revista *Rodriguésia* (Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro) em uma edição especial (*Ferns and Lycophytes as new challenges and perspectives*).

Capítulo II

Chromosome Number for *Hymenophyllum* (Sw.) Sw. IAPT chromosome data 40/1

*Manuscrito aceito para publicação na revista
TAXON - IAPT/IOPB Chromosome Number
Data.

Capítulo III

Chromosome number and genome size of *Hymenophyllum* subg. *Sphaerocionium* (Hymenophyllaceae): evolutionary implications for species in the Brazilian Atlantic Forest

*Manuscrito em preparação, para ser submetido ao periódico Botanical Journal of the Linnean Society.

6. Considerações Finais

Neste trabalho, almejou-se explorar a influência do número cromossômico e do tamanho do genoma na evolução do gênero *Hymenophyllum*, em especial do subgênero *Sphaerocionium*. Anteriormente a este estudo, as espécies presentes nas formações da Mata Atlântica careciam de dados citogenéticos. A revisão da literatura, os novos dados citogenéticos adquiridos e as análises macroevolutivas permitem as seguintes considerações:

- A construção de um panorama acerca do conhecimento citogenético disponível para Hymenophyllaceae evidencia a existência de lacunas que, não só nortearam a pesquisa desenvolvida durante este mestrado, mas também abre perspectivas para diversos outros estudos envolvendo a família;
- A ampla variação em termos de número cromossômico em *Hymenophyllum* é decorrente tanto de eventos de poliploidia, quanto de disploidia (praticamente exclusivos desse grupo). A partir de nossas análises, inferimos que a maior ocorrência desses mecanismos de mudança nesse gênero pode estar associada a sua ampla diversidade de espécies, em comparação com outros gêneros em Hymenophyllaceae;
- No subgênero *Sphaerocionium*, o número cromossômico foi constante, ao contrário do tamanho de genoma que variou entre as espécies avaliadas. Isso nos traz indícios que mesmo em táxons de Hymenophyllaceae nos quais o número cromossômico é constante, , como as espécies de *Sphaerocionium*, o tamanho de genoma pode estar envolvido em processos mais complexos como diversificação.

Os esforços de amostragem possibilitaram a cobertura de 40% da diversidade de espécies da Floresta Atlântica para Hymenophyllaceae, incluindo análises citogenéticas para outras espécies que estão em andamento. Assim, entre os próximos passos desta pesquisa estão concluir a aquisição de contagens de números cromossômicos para espécies da subfamília Trichomanoideae e utilizar os dados citogenéticos em outras investigações relacionadas a esse grupo. Outra perspectiva futura para esta linha de pesquisa é investigar os aspectos citogenéticos de *Mecodium*, segundo subgênero mais diverso de *Hymenophyllum* na Floresta Atlântica.

7. Referências

- BFG [The Brazil Flora Group] (2021) Brazilian Flora 2020: Leveraging the power of a collaborative scientific network. *Taxon* 71(1):178–198.
- Bosch RB (1858) Synopsis Hymenophyllacearum. *Nederlandsch kruidkundig archief* 3: 341–419.
- Braithwaite AF (1975) Cytotaxonomic observations on some Hymenophyllaceae from the Vanuatu, Fiji and New Caledonia. *Botanical Journal of the Linnean Society* 71:167–189.
- Britton DM (1974) The significance of chromosome numbers in ferns. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61:310-317.
- Cea MG, Claverol S, Castillo CA, Pinilla CR & Ramírez LB (2014) Desiccation tolerance of Hymenophyllaceae filmy ferns is mediated by constitutive and non-inducible cellular mechanisms. *Comptes Rendus Biologies* 337(4):235–243.
- Choi B, Weiss-Schneeweiss H, Temsch EV, So S, Myeong H-H & Jang T-S (2020) Genome Size and Chromosome Number Evolution in Korean *Iris* L. Species (Iridaceae Juss.). *Plants* 9(10):1284
- Clark J, Hidalgo O, Pellicer J, Liu H, Marquardt J, Robert Y, Christenhusz M, Zhang S, Gibby M, Leitch IJ & Schneider H (2016) Genome evolution of ferns: evidence for relative stasis of genome size across the fern phylogeny. *New Phytologist* 210:1072–1082
- Del Rio C, Hennequin S, Rouhan G, Ebihara A, Lowry PP, Dubuisson JY, Gaudeau M (2017) Origins of the fern genus *Hymenophyllum* (Hymenophyllaceae) in New Caledonia: Multiple independent colonizations from surrounding territories and limited in situ diversification. *Taxon* 66:1041–1064.
- Dubuisson JY, Hennequin S, Douzery EJP, Cranfill RB, Smith AR & Pryer KM (2003b) rbcL Phylogeny of the Fern Genus *Trichomanes* (Hymenophyllaceae), with Special Reference to Neotropical Taxa. *International Journal of Plant Sciences* 164: 753–761.
- Dubuisson JY, Hennequin S, Rakotondrainibe F & Schneider H (2003a) Ecological diversity and adaptive tendencies in the tropical fern *Trichomanes* L.(Hymenophyllaceae) with special reference to climbing and epiphytic habits. *Botanical Journal of the Linnean Society* 142:41–63.
- Dubuisson JY (1997) rbcL Sequences: A Promising Tool for the Molecular Systematics of the Fern Genus *Trichomanes* (Hymenophyllaceae)?. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8:128–138.
- Ebihara A, Iwatsuki K, Kurita S & Ito M (2002) Systematic Position of *Hymenophyllum rolandi-principis* Rosenst. or a Monotypic Genus *Rosenstockia* Copel. (Hymenophyllaceae) Endemic to New Caledonia. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 53: 35-49.

Ebihara A, Dubuisson JY, Iwatsuki K, Hennequin S & Ito M (2006) A taxonomic revision of Hymenophyllaceae. *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants* 51:221–280.

Ebihara A, Iwatsuki K, Ito M, Hennequin S & Dubuisson JY (2007) A global molecular phylogeny of the fern genus *Trichomanes* (Hymenophyllaceae) with special reference to stem anatomy. *Botanical Journal of the Linnean Society* 155:1–27.

Flora e Funga do Brasil (2023) Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 31 de outubro de 2023.

Fujiwara T, Liu H, Meza-Torres EI, Morero RE, Vega AJ, Liang, Z, Ebihara A, Leitch IJ & Schneider H (2023) Evolution of genome space occupation in ferns: linking genome diversity and species richness. *Annals of Botany* 20:1–12.

Gasper AL, Grittz GS, Russi CH, Schwartz CE & Rodrigues AV (2021) Expected impacts of climate change on tree ferns distribution and diversity patterns in subtropical Atlantic Forest. *Perspectives in Ecology and Conservation* 19:369–378.

Gessner F (1939) Die Assimilation der Hymenophyllaceen. *Protoplasma* 34:102–116.

Gonzatti F., Windisch PG (2023). Hymenophyllaceae in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB91174>>. Acesso em: 1 de novembro de 2023.

Gonzatti F, Larsen C, Windisch PG, Scariot FJ, Echeverrigaray S & Ritter MR (2023b) *Hymenophyllum* subg. *Hymenophyllum* (Hymenophyllaceae) in the Atlantic Forest Domain, Brazil: Phylogenetic Relationships and Taxonomic Review. *48(2):173–191*

Gonzatti F, Vasques DT, Windisch PG, Ritter MR & Motomi I (2023a) Systematics and Taxonomy of the *Hymenophyllum polyanthos* Complex in the Brazilian Atlantic Forest Domain. *Systematic Botany* 48:55–77.

Gonzatti F, Windisch PG, Scariot FJ, Echeverrigaray S, Ritter MR (2020) Revision of *Hymenophyllum* subg. *Sphaerocionium* (Hymenophyllaceae) in the Atlantic Forest Domain (Brazil), Based on Molecular and Morphological Evidence. *Systematic Botany* 45:707–748.

Gonzatti F. & Windisch PG (2018) Flora do Espírito Santo: *Hymenophyllum* (Hymenophyllaceae). *Rodriguésia* 69: 611–629.

Guerra M (2008) Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research* 120:339–350.

Hennequin S, Ebihara A, Dubuisson JY & Schneider H (2010) Chromosome number evolution in *Hymenophyllum* (Hymenophyllaceae), with special reference to the subgenus *Hymenophyllum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55:47–59.

Hennequin S, Ebihara A, Ito M, Iwatsuki K & Dubuisson JY (2003a) Molecular systematics of the fern genus *Hymenophyllum* s.l. (Hymenophyllaceae) based on chloroplastic coding and noncoding regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27:283–301.

Hennequin S (2003b) Phylogenetic relationships within the fern genus *Hymenophyllum* s.l. (Hymenophyllaceae, Filicopsida): contribution of morphology and cytology. *Comptes Rendus Biologies* 326(6):599–611.

Hennequin S, Ebihara A, Ito M, Iwatsuki K & Dubuisson JY (2006) New Insights into the Phylogeny of the Genus *Hymenophyllum* s.l. (Hymenophyllaceae): Revealing the Polyphyly of *Mecodium*. *Systematic Botany* 31:271–284.

Henry TA, Bainard JD & Newmaster SG (2014) Genome size evolution in Ontario ferns (Polypodiidae): evolutionary correlations with cell size, spore size, and habitat type and an absence of genome downsizing. *Genome* 57:555–566.

IPCC (2014) *Climate Change 2014: synthesis report*. Geneva, Switzerland, 169 pp.

Irudayaraj V (1996) Studies on intraspecific variation in South Indian ferns: VII. Cytomorphology of *Trichomanes plicatum* (V. d. B.) Beddome. *Indian Fern Journal* 13: 46-50.

IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) (2019). Guidelines for using the IUCN red list categories and criteria, version 14. Prepared by the Standards and Petitions Committee. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf>>. Acesso em: 1 de dezembro de 2023.

Iwatsuki K (1990) Hymenophyllaceae. In: Krammer KU and Green PS (eds) *The families and genera of vascular plants. Pteridophytes and Gymnosperm*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, pp 157–163.

Judd WS, Campbell C, Kellogg EA, Stevens PF & Donoghue MJ (2009) *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*. 3ª edição. Artmed Editora, Porto Alegre, 630 pp.

Kessler M, Kluge J, Hemp A, Ohlemüller R (2011) A global comparative analysis of elevational species richness patterns of ferns. *Global Ecology and Biogeography* 20:868–880.

Kim HT & Kim JS (2020). The dynamic evolution of mobile open reading frames in plastomes of *Hymenophyllum* Sm. and new insight on *Hymenophyllum coreanum* Nakai. *Scientific reports* 10:1–11.

Larsen C, Gonzatti F, Acosta JM & Ponde MM (2020) Morphological and Molecular Evidence to Segregate a Disjunct Species of *Hymenophyllum* (Hymenophyllaceae) from Southern South America. *Systematic Botany* 45(3)439–449.

Lima LV, Sousa SM, Almeida TE & Salino A (2021) State of the art in cytogenetics, insights into chromosome number evolution, and new C-value reports for the fern family Gleicheniaceae. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 93:1–14.

Löve Á (1976) IOPB Chromosome Number Reports LIII. *Taxon* 25:483–500.

Maddison DR & Maddison WP (2004). Mesquite, version 2. Tucson, Arizona. Disponível em: <<https://www.mesquiteproject.org/>>. Acesso em: 1 de novembro de 2023.

Manton I (1950) Problems of cytology and evolution in the Pteridophyta. University Press, New York, 338 pp.

Mayrose I & Lysak MA (2020) The Evolution of Chromosome Numbers: Mechanistic Models and Experimental Approaches. *Genome Biology and Evolution* 13(2):evaa220 <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa220>

Mehlreter K, Walker LR & Shares JM (2010) Fern ecology. Cambridge University Press, New York, 444 pp.

Mehra P & Singh G (1957) Cytology of Hymenophyllaceae. *Journal of Genetics* 55:379–393.

Mitui K (1976) Chromosome studies on Japanese ferns (5). *Bulletin of Nippon Dental University General Education* 5: 131-140.

Morton CV (1947) The American species of *Hymenophyllum*, section *Sphaerocionium*. *Systematic Plant Studies* 29:139–201

Morton CV (1968) The genera, subgenera, and sections of the Hymenophyllaceae. *Contributions from the United States National Herbarium* 38:153–214.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca GA & Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853–858.

Ohri D (1998) Genome Size Variation and Plant Systematics. *Annals of Botany* 82:75–83.

Parra MJ, Acuña K, Corcuera L & Saldaña A (2009) Vertical distribution of Hymenophyllaceae species among host tree microhabitats in a temperate rain forest in Southern Chile. *Journal of Vegetation Science* 20:588–595.

Pellicer J, Hidalgo O, Dodsworth S & Leitch IJ (2018) Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. *Genes*, 9:88–102.

Pichi Sermolli REG (1977) Tentamen Pteridophytorum genera in taxonomicum ordinem redigendi. *Webbia* 31:313–512.

PPG I [Pteridophyte Phylogeny Group I] (2016) A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. *Journal of systematics and evolution* 54:563–603.

Proctor MCF (2012) Light and desiccation responses of some Hymenophyllaceae (filmy ferns) from Trinidad, Venezuela and New Zealand: poikilohydry in a light-limited but low evaporation ecological niche. *Annals of botany* 109:1019–1026.

Pryer KM, Smith AR, Hunt JS & Dubuisson JY (2001b) *rbcL* data reveal two monophyletic groups of filmy ferns (Filicopsida: Hymenophyllaceae). *American Journal of Botany*, v. 88, n. 6, p. 1118–1130, 2001.

Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ & Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142:1141–1153.

Rio Grande do Sul. 2014. Decreto nº 52.109, de 01 de dezembro de 2014. Assembléia Legislativa. Declara As Espécies da Flora Nativa Ameaçadas de Extinção no Estado do Rio Grande do Sul. Publicado no DOE nº 233, de 02 de dezembro de 2014.

Saber MA, Amorim BS, Costa L, Souza G & Pedrosa-Harand (2019) The role of chromosome changes in the diversification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Systematics and Biodiversity* 17:7-21.

Samad NA, Hidalgo O, Saliba E, Siljak-Yakovlev S, Strange K, Leitch IJ & Dagher-Kharrat MB (2020) Genome Size Evolution and Dynamics in *Iris*, with Special Focus on the Section *Oncocyclus*. *Plants* 9(12):1687

Smith AR, Pryer KM, Schuettpelz E, Korall P, Schneider H e Wolf PG (2006) A classification for extant ferns. *Taxon* 55:705–731.

Storme N & Mason A (2014) Plant speciation through chromosome instability and ploidy change: Cellular mechanisms, molecular factors and evolutionary relevance. *Current Plant Biology* 1:10–33.

Suissa JS & Sundue MA (2020) Diversity Patterns of Neotropical Ferns: Revisiting Tryon's Centers of Richness and Endemism. *American Fern Journal*. 110(4):211–232.

Tatuno S & Takei M (1969) Karyological Studies in Hymenophyllaceae I. Chromosome of the genus *Hymenophyllum* and *Mecodium* in Japan. *The Botanical magazine, Tokyo* 82:121–129.

Trávníček P, Čertner M, Ponert J, Chumová Z, Jersáková J & Suda J (2019) Diversity in genome size and GC content shows adaptive potential in orchids and is closely linked to partial endoreplication, plant life-history traits and climatic conditions. *New Phytologist* 224(4):1642–1656.

Tryon R (1972) Endemic areas and geographic speciation in tropical American ferns. *Biotropica* 4:121–131.

Tryon AF, Bautista HP & Araújo IS (1975) Chromosome studies of Brazilian ferns. *Acta Amazonica* 5: 35-43.

Vasques DT, Ebihara A, Hirai RY, Prado J & Motomi I (2019) Phylogeny of *Hymenophyllum* subg. *Mecodium* (Hymenophyllaceae), with special focus on the diversity of the *Hymenophyllum polyanthos* species complex. *Plant Systematics and Evolution* 305:811–825.

Vessey J & Barlow B (1963) Chromosome numbers and phylogeny in the Hymenophyllaceae. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 88: 301-306.

Vimala Y, Lavana S, Lavana UC (2021) Chromosome change and karyotype differentiation—implications in speciation and plant systematics. *The Nucleus* 64:33–54.

Walker TG (1966) A cytotaxonomic survey of the Pteridophytes of Jamaica. *Earth and Environmental Science Transactions of The Royal Society of Edinburgh* 66:169–237.

Walker TG (1985) Cytotaxonomic studies of the ferns of Trinidad. 2. The cytological and taxonomical implications. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Botany* 13:149–249.

Wang FG, Wang AH, Bai CK, Jin DM, Nie LY, Harris AJ, Che L, Wang JJ, Li SY, Xu L, Shen H, Gu YF, Shang H, Duan L, Zang CX, Chen HF & Yan YH (2022) Genome Size Evolution of the Extant Lycophytes and Ferns. *Plant Diversity* 44:141–152.

Windisch PG (2014) Hymenophyllaceae (Polypodiopsida) no estado do Rio Grande do Sul. *Pesquisas, Botânica* 65:15–48.

Zotz G & Büche M (2000) The epiphytic filmy ferns of a tropical lowland forest-species occurrence and habitat preferences. *Ecotropica* 6:203–206.

Anexo I**Número Cromossômico e Tamanho de Genoma para
espécies da subfamília Trichomanoideae**

*Atualmente, a aquisição de números cromossômicos está em andamento. Após a conclusão das análises citogenéticas, os dados irão integrar um manuscrito.

Anexo II**Chromosome Number for Iridaceae Juss.****IAPT chromosome data 40/5**

*Manuscrito aceito para publicação na revista
TAXON - IAPT/IOPB Chromosome Number
Data.