

Ed. J. Rita  
*Taxonomía, Biogeografía y  
Conservación de Pteridófitos*  
Soc. Hist. Nat. Bal. - IME  
Palma de Mallorca, 1990

# CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO CITOTAXONÓMICO DE *ANOGRAMMA LEPTOPHYLLA* (L.) LINK

M. QUEIRÓS, J. ORMONDE & I. NOGUEIRA  
Centro de Fitossistemática e Fitoecologia do INIC  
Museu, Laboratório e Jardim Botânico. Universidade de Coimbra

## Resumo.

Apresenta-se o número cromossómico de *Anogramma leptophylla* de diversos indivíduos provenientes de três localidades próximas de Coimbra, Portugal. Tecem-se comentários cariológicos sobre o comportamento dos cromossomas na mitose e na meiose e relacionam-se os números cromossómicos encontrados com a distribuição geográfica.

**Palavras chave:** *Anogramma leptophylla*, cariologia, Portugal.

## Summary.

The authors have studied from the cytological point of view *Anogramma leptophylla* from three places near Coimbra, Portugal. Considerations on the chromosome behaviour during mitosis and meiosis are given. Relation between the reported chromosome numbers and the geographical distribution is stated.

**Key words:** *Anogramma leptophylla*, caryology, Portugal.

## INTRODUÇÃO.

*Anogramma leptophylla* (L.) Link é um feto com esporófito frágil e fugaz, de rizoma anual muito curto e com frondes verdes e delicadas, ligeiramente dimorfas, as externas 1-2 pinadas, estéreis e efémeras, as internas 2-3 pinadas e férteis, com gametófito potencialmente perene, que cresce preferentemente em solos mais ou menos profundos e húmidos em comunidades briopteridofíticas, sobre rochas e em fendas destas, nas bermas de caminhos, taludes e muros de pedra. Esta espécie, com uma vasta distribuição geográfica, é a mais polimorfa do género *Anogramma* Link, que compreende 7 espécies. Encontra-se bem representada na Europa atlântica, na região mediterrânica e nas Ilhas Macaronésicas, é frequente no Irão até à Índia, na África tropical e austral e em Madagascar, na Austrália e na Nova Zelândia, e na América estende-se desde o México ao Chile meridional.

Tendo recentemente estudado este feto (QUEIRÓS, ORMONDE & NOGUEIRA, 1988) de São Paulo de Frades (Fig. 1a), localidade próxima de Coimbra, encontramos o número meiótico  $n=26$ , que se encontra em concordância com os resultados obtidos por TUTIN em material de Jersey, Ilhas Channel (LÖVE & LÖVE, 1961; FABBRI, 1963) e por KURITA (1971) em plantas da Europa. Estes resultados foram confirmados por GIBBY (1986) e por MANTON & al. (1986) em plantas da ilha da Madeira.

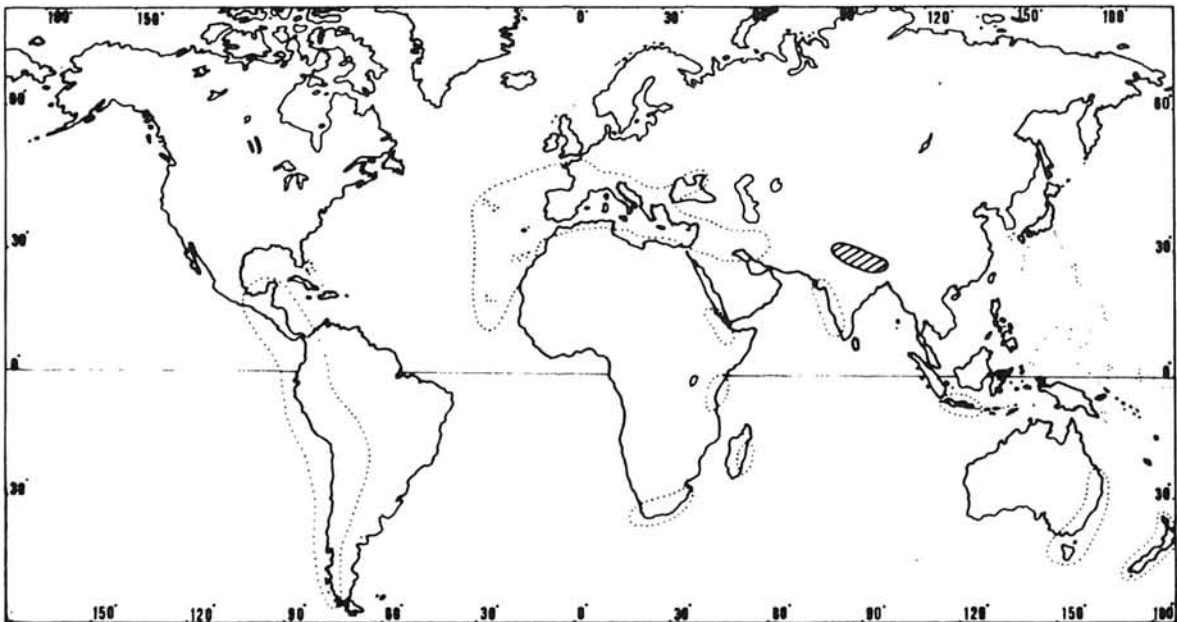
No entanto,  $n=29$  é citado por BROWNLIE (1958) para indivíduos de Port Hills, Nova Zelândia, por MICKEL & al. (1966) para indivíduos de Oaxaca, no México, e por BAROUTSIS & GASTONY (1978) para indivíduos da mesma localidade do México e da Província do Cabo, África do Sul. MICKEL & al. (1966) determinaram também  $n=27$  em indivíduos de Nayarit do México,  $n=c. 56-57$  foi citado por MEHRA & VERMA (1960),  $n=c. 58$  por VERMA & KHULLAR (1965) e  $n=58$  por KHULLAR (in MANTON & al., 1986) para indivíduos da Índia setentrional, que os autores atribuíram a *A. leptophylla*.

A disparidade destes números,  $n=26$  para material europeu e macaronésico,  $n=29$  e  $n=58$  para material de outros continentes, levou-nos a estudar novamente este taxon sob o ponto de vista cariológico, utilizando populações espontâneas de várias localidades de Portugal.

## MATERIAL E MÉTODOS.

Dada a fugacidade do esporófito deste feto, cujo ciclo de vida não vai muito além de três meses, tornou-se difícil alargar o nosso estudo a outras regiões do País.

Segundo as nossas observações, nas localidades agora mencionadas, o esporófito deste feto inicia o seu desenvolvimento em fins de Janeiro, princípios de Fevereiro, frutifica durante os meses de Fevereiro e Março, para fenecer em Abril, princípios de Maio. Segundo MANTON & al. (1986), é muito difícil manter em cultura este feto por ser anual, apesar do protalo ser potencialmente vivaz. Estudámos diversos indivíduos provenientes de populações de três localidades da província da Beira Litoral: Ribeira de Valbom (Fig. 1c) e Vale de Canas (Fig. 1b), ambas próximas de Coimbra, e Parque de Santa Cruz (Fig. 1d) na cidade de Coimbra.



Mapa 1. Distribuição de *Anogramma leptophylla*

..... Plantas diploides ( $n = 26, 27, 29$ )

////// Plantas tetraploides ( $n = 58$ )



Fig. 1. Silhuetas de frondes de *Anogramma leptophylla*  
a - São Paulo de Frades; b - Vale de Canas;  
c - Ribeira de Valbom; d - Parque de Santa Cruz, Coimbra.

Para a obtenção de figuras da meiose, utilizou-se a técnica do esmagamento das células mães dos esporos em carmim acético. Sempre que possível, usou-se material sem prévia fixação, no próprio dia de colheita, técnica que a experiência nos ensinou oferecer bons resultados. Na impossibilidade de se estudar todo o material no dia em que este foi colhido, utilizou-se também, com bons resultados, a técnica descrita por GIBBY & al. (1977) e por HORJALES (1986), em que, após a fixação de pínulas com soros em diversos estados de formação numa mistura de álcool absoluto + ácido acético glacial (3:1), se arrefeceu rapidamente o material. Para tal, utilizou-se uma mistura frigorífica de gelo picado, sal comum e cloreto de amónio em partes iguais. Após 24 horas, o fixador é renovado e, após 48 horas, o material é de novo mudado para álcool a 70% e colocado no frigorífico a cerca de 5°C. O estudo do material deve realizar-se no prazo máximo de 20 dias.

Os números cromossómicos somáticos foram determinados em vértices vegetativos de indivíduos de populações de Vale de Canas e do Parque de Santa Cruz, fixados no líquido de Navachine (modificações de Bruun), incluídos em parafina, seccionados em cortes com 12µm de espessura e corados pelo violeta de genciana.

## RESULTADOS.

Em todas as plantas estudadas da Ribeira de Valbom, de Vale de Canas e do Parque de Santa Cruz, foi encontrado  $n=26$  (Fig. 2; Figs. 3, 4; Fig. 5), em células mães dos esporos. A meiose decorre normalmente, com formação de bivalentes em todos os indivíduos estudados, de acordo com as nossas determinações anteriores (QUEIRÓS, ORMONDE & NOGUEIRA, op. cit.).

Os vértices vegetativos estudados revelaram a existência de 52 cromossomas somáticos (Fig. 6).

## DISCUSSÃO.

O estudo citotaxonomico de *A. leptophylla* empreendido pelos autores atrás mencionados, mostrou que no hemisfério sul se têm encontrado plantas diplóides e outras tetraplóides, respectivamente com  $n=29$  e  $n=58$ , enquanto que no hemisfério norte foram encontrados indivíduos diplóides com  $n=27$  e  $n=29$  no México, e outras com  $n=26$  na Europa e nas Ilhas Macaronésicas.

As discrepâncias verificadas no hemisfério norte, levaram LOVIS (1977) e PICHI SERMOLLI (in FERRARINI & al., 1986) a admitirem que o número cromossómico meiótico de *A. leptophylla* seria  $n=29$  e que os números  $n=26$  e  $n=27$  poderiam ser interpretados como resultantes de fenómenos de aneuploidia. Este último autor, tal como BAROUTSIS & GASTONY (1978), admite que os mencionados números cromossómicos também poderiam ser resultantes de erros de contagem, visto que a estrutura dos cromossomas e o seu comportamento torna esta contagem muito difícil. Segundo MANTON & al. (1986), as dificuldades acrescem ainda com as pequenas dimensões das células e dos cromossomas.

O presente estudo da meiose e da mitose em *A. leptophylla* não mostrou a existência de qualquer tendência para os cromossomas se agruparem, embora revelasse que os cromossomas somáticos eram finos e coravam tenuamente pela técnica utilizada, circunstância que torna, de facto, a contagem bastante difícil.

Deste modo, e considerando que  $n=29$  seja o número básico do género *Anogramma*, pensamos, tal como PICHI SERMOLLI (FERRANINI & al., 1986), que  $n=26$  seja, na verdade, resultante de fenómenos de aneuploidia.

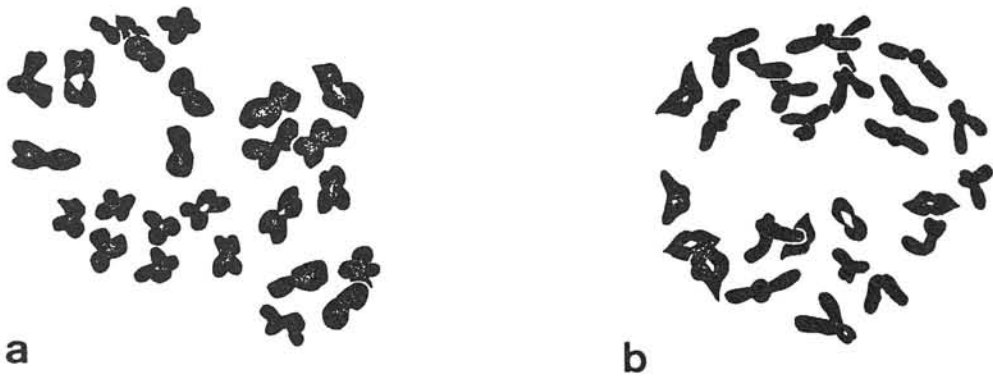


Fig. 2 - Citologia de *Anogramma leptophylla* de Ribeira de Valbom. a - metafase, n = 26; b - início de anafase, n = 26.

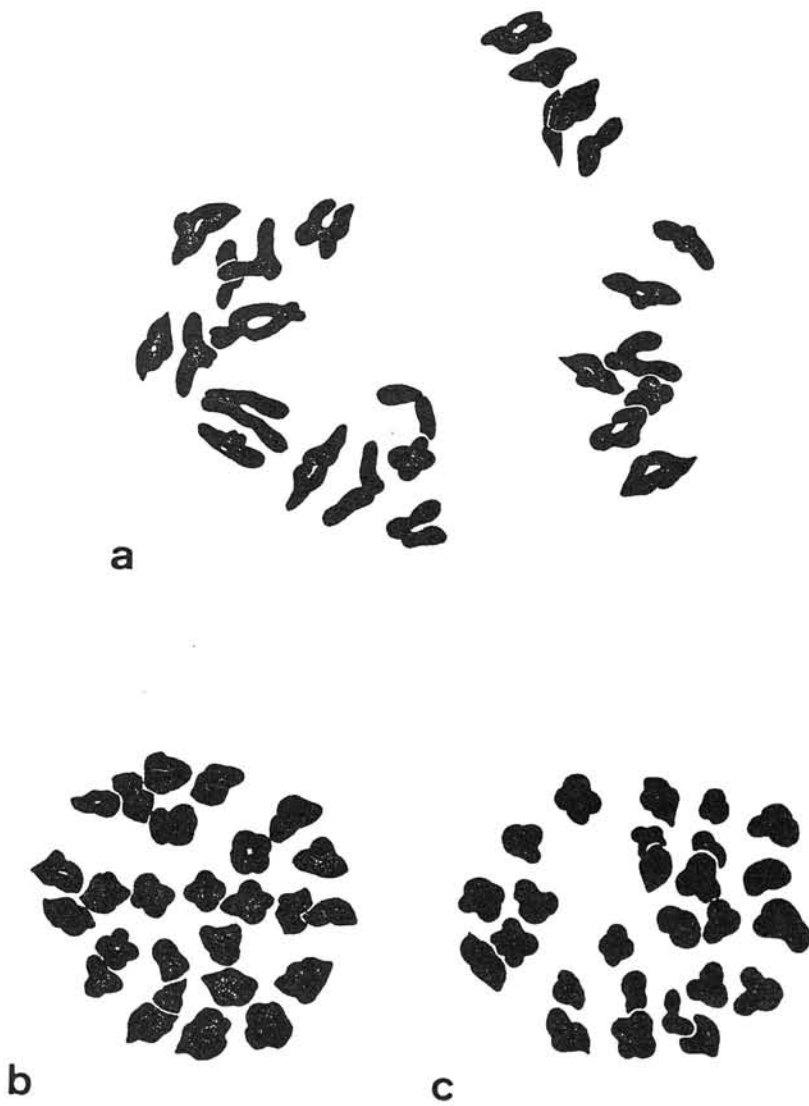


Fig. 3. Citologia de *Anogramma leptophylla* de Vale de Canas. a - início de anafase I, n = 26; b, c - metafases, n = 26.

Para a obtenção de figuras da meiose, utilizou-se a técnica do esmagamento das células após dessecar com cartolina acetica. Sempre que possível, usou-se material sem prévia fixação, ao próprio dia de colheita, técnica que a captação nos ensaios obtiveram bons resultados. Na impossibilidade de obter o material no dia em que se realizou o estudo, utilizou-se também, com bons resultados, o método de GIBBY & GIBBY (1956) em que, após a fixação com álcool, o material foi tratado com uma solução de 1% de ácido acético e 1% de cloruro de cálcio durante 24 horas, e fixado com álcool. Este método é utilizado para o estudo de células de animais, sendo que o material de origem vegetal, como o de *Anogramma leptophylla*, apresenta dificuldades para a obtenção de células em parafina, sendo necessário um tempo de exposição a corantes específicos.

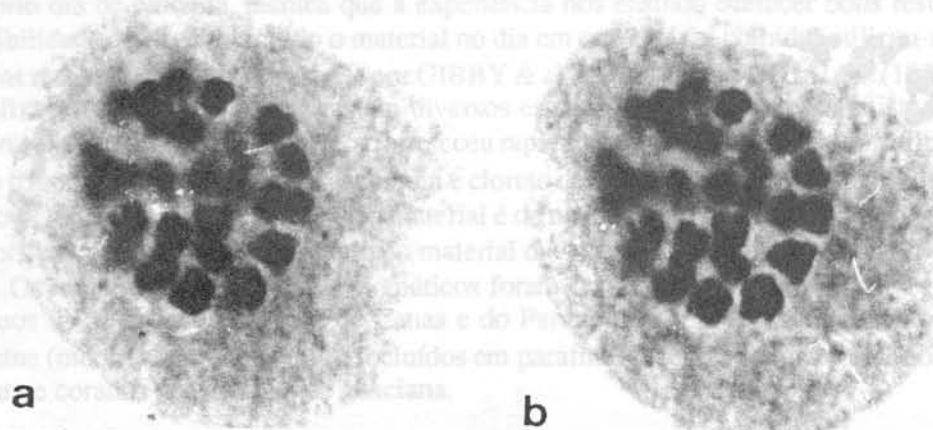


Fig. 3 - Citologia de *Anogramma leptophylla* de Vale de Canas. a - início da metáfase, n = 26; b - final da metáfase, n = 26.

As diferenças verificadas no hemisfério norte, tiveram LOUIS (1977) e PICH BERMOLLI (in FERRARINI & al., 1986) a admitirem que o número cromossómico meiótico de *A. leptophylla* seria n=29 e que os números n=26 e n=27 poderiam ser interpretados como resultados de eventos de aneuploidia. Este último autor, tal como GASTONY (1978), considerou que os cromossómios n=26 e n=27 poderiam ser derivados de eventos de poliploidização. LOUIS & al. (1976) consideram ainda com as populações de *A. leptophylla* do hemisfério norte, a existência de qualquer tipo de poliploidização, sendo que a presença de cromossomas n=26 e n=27 em *A. leptophylla* do hemisfério norte, de forma semelhante à observada em *A. leptophylla* do hemisfério sul, poderia ser o resultado de eventos de poliploidização.

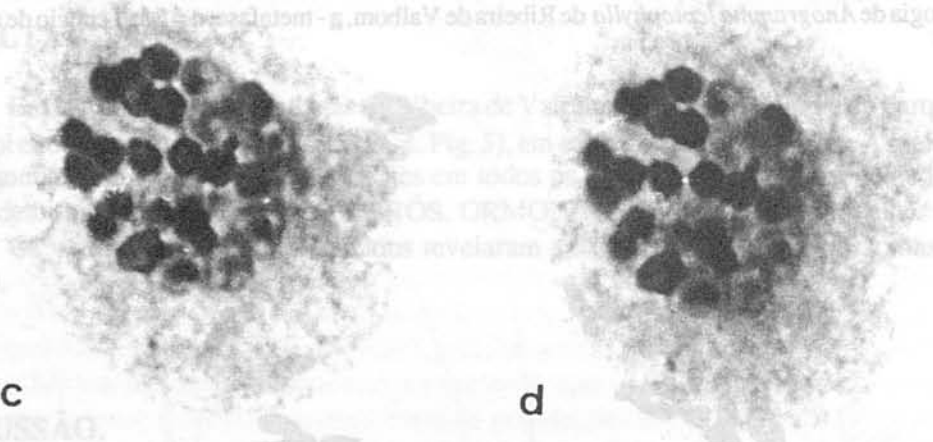


Fig. 4. Citologia de *Anogramma leptophylla* de Vale de Canas. a - d - fotografias da meiose, n = 26.

As diferenças verificadas no hemisfério norte, tiveram LOUIS (1977) e PICH BERMOLLI (in FERRARINI & al., 1986) a admitirem que o número cromossómico meiótico de *A. leptophylla* seria n=29 e que os números n=26 e n=27 poderiam ser interpretados como resultados de eventos de aneuploidia. Este último autor, tal como GASTONY (1978), considerou que os cromossómios n=26 e n=27 poderiam ser derivados de eventos de poliploidização. LOUIS & al. (1976) consideram ainda com as populações de *A. leptophylla* do hemisfério norte, a existência de qualquer tipo de poliploidização, sendo que a presença de cromossomas n=26 e n=27 em *A. leptophylla* do hemisfério norte, de forma semelhante à observada em *A. leptophylla* do hemisfério sul, poderia ser o resultado de eventos de poliploidização.

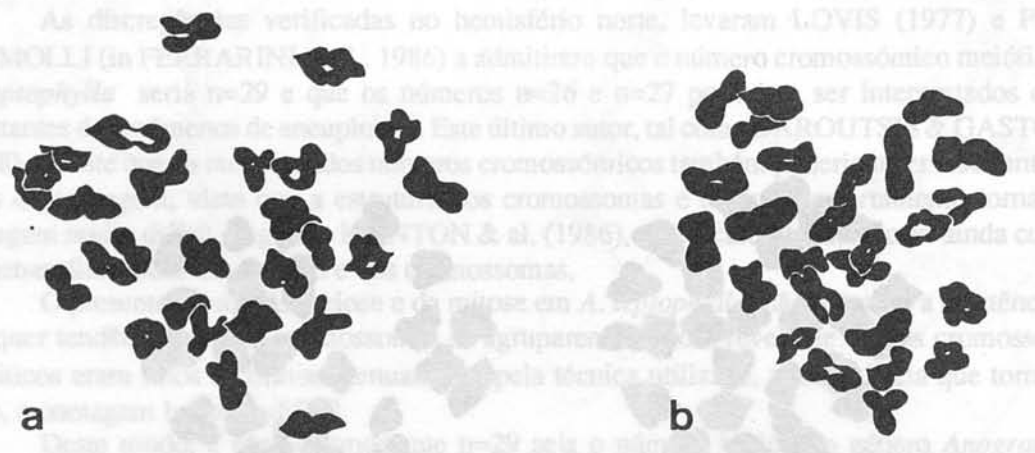


Fig. 5. Citologia de *Anogramma leptophylla* do Parque de Santa Cruz, Coimbra. a - final da metáfase, n = 26; b - final da metáfase, n = 26.

As diferenças verificadas no hemisfério norte, tiveram LOUIS (1977) e PICH BERMOLLI (in FERRARINI & al., 1986) a admitirem que o número cromossómico meiótico de *A. leptophylla* seria n=29 e que os números n=26 e n=27 poderiam ser interpretados como resultados de eventos de aneuploidia. Este último autor, tal como GASTONY (1978), considerou que os cromossómios n=26 e n=27 poderiam ser derivados de eventos de poliploidização. LOUIS & al. (1976) consideram ainda com as populações de *A. leptophylla* do hemisfério norte, a existência de qualquer tipo de poliploidização, sendo que a presença de cromossomas n=26 e n=27 em *A. leptophylla* do hemisfério norte, de forma semelhante à observada em *A. leptophylla* do hemisfério sul, poderia ser o resultado de eventos de poliploidização.



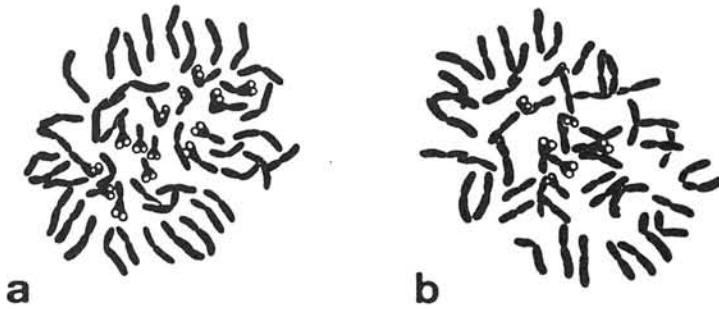


Fig. 6. Citologia de *Anogramma leptophylla*. a -  $2n = 52$  (Parque de Santa Cruz); b -  $2n = 52$  (Vale de Canas).

Em *A. leptophylla*, tal como em *Asplenium trichomanes* L., espécie polimorfa com vários citótipos correspondentes a formas a que foram dadas categoria subespecífica, têm-se encontrado dois citótipos, um diplóide com ampla distribuição geográfica e outro tetraplóide até agora circunscrito à Índia setentrional, sobretudo ao Himalaia. Pensamos que esta forma seja autotetraplóide e a ela se poderia também atribuir categoria subespecífica.

Aliás, a opinião que avançamos poderá ser reforçada pelo estudo da morfologia de *A. leptophylla* desta região, empreendido por MEHRA & SANDHU (1976). Os referidos autores verificaram que o gametófito (protalo) tem, no início, a forma de uma pequena lâmina espatulada semelhante ao talo das hepáticas, com os quais muitas vezes se confunde, e que, pelo aparecimento de dois ou mais meristemas descontínuos, na margem, se expande em forma de coração ou em formas irregularmente lobadas. Na região posterior, desenvolvem-se pequenos ramos pedunculados e cilíndricos, onde se formam arquegónios e anterídios. Na extremidade destes ramos aparecem tubérculos associados com fungos micorrizígenos. Segundo os autores, os fungos aparecem somente na natureza, não tendo sido encontrados nas plantas cultivadas em laboratório. Seriam estes tubérculos, associados aos fungos, os responsáveis pela sobrevivência do gametófito de *A. leptophylla* durante os rigorosos meses de inverno na região do Himalaia, onde nenhum outro gametófito, dos numerosos fetos que ali vivem, sobrevive nesta época do ano.

Ainda que se possam considerar positivos os nossos resultados, embora não totalmente esclarecedores do problema dada a complexidade do mesmo, tencionamos continuar estes estudos não só sob o ponto de vista cariológico, mas também palinológico.

## BIBLIOGRAFIA.

- BAROUTSIS, J. G. & GASTONY, G. (1978). Chromosome numbers in the fern genus *Anogramma* II. *Amer. Fern Journ.*, 68 (1): 3-6.
- BROWNLIE, G. (1958). Chromosome numbers in New Zealand ferns. *Trans. Roy. Soc. New Zealand*, 85 (2): 213-216.

- FABBRI, F. (1963). Primo supplemento alle Tavole cromosomiche delle Pteridophyta di Alberto Chiarugi. *Caryologia*, 16 (2): 237-335.
- FERRARINI, E., CIAMPOLINI, F., PICHI SERMOLLI, R. E. G. & MARCHETTI, D. (1986). Iconographia Palynologica Pteridophytorum Italiae. *Webbia*, 40 (1): 1-202.
- GIBBY, M. (1986). A chromosome count for *Anogramma leptophylla* in Madeira. *Fern Gaz.*, 13 (2): 120.
- GIBBY, M., JERMY, A. C., RASBACH, H., RASBACH, K., REICHSTEIN, T. & VIDA, G. (1977). The genus *Dryopteris* in the Canary Islands and Azores and the description of two new tetraploid species. *Bot. Journ. Linn. Soc.*, 74: 251-277.
- HORJALES, M. (1986). Sobre *Asplenium cuneifolium* en Galicia: estudio citotaxonomico. *Anales Jard. Bot.*, Madrid, 43 (1): 9-14.
- KURITA, S. (1971). Chromosome study of four species of leptosporangiate ferns. *Ann. Rep. For. Stud. Coll. Chiba Univ.*, 6: 41-43.
- LÖVE, A. & LÖVE, D. (1961). Chromosome numbers of central and northwest european plant species. *Opera Bot.*, 5: 1-581.
- LOVIS, J. D. (1977). Evolutionary patterns and processes in ferns. *Advances Bot. Research*, 4: 229-415.
- MANTON, I., LOVIS, J. D., VIDA, G. & GIBBY, M. (1986). Cytology of the fern flora of Madeira. *Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.), Bot. Ser.*, 15 (2): 123-161.
- MEHRA, P. N. & SANDHU, R. S. (1976). Morphology of the fern *Anogramma leptophylla*. *Phytomorphology*, 26 (1): 60-76.
- MEHRA, P. N. & VERMA, S. C. (1960). Cytotaxonomic observations on some west Himalayan Pteridaceae. *Caryologia*, 13 (3): 619-650.
- MICKEL, J. T., WAGNER, W. H. & CHEN, K. L. (1966). Chromosome observations on the ferns of Mexico. *Caryologia*, 19 (1): 95-102.
- QUEIRÓS, M., ORMONDE, J. & NOGUEIRA, I. (1988). Notas cariológicas e fitogeográficas de algumas Pteridophyta de Portugal I. *Acta Bot. Malacitana*, 13: 121-140.
- VERMA, S. C. & KHULLAR, S. P. (1965). Cytology of some W. Himalayan Adiantaceae (sensu Alston) with cytotaxonomic comments. *Caryologia*, 18 (1): 85-106.