

ADRIANA BUARQUE MARCON

**CITOTAXONOMIA DAS ESPÉCIES DE *ACROSTICHUM* L.
(PTERIDACEAE) OCORRENTES NO NORDESTE
BRASILEIRO**

RECIFE
2000

ADRIANA BUARQUE MARCON

**CITOTAXONOMIA DAS ESPÉCIES DE *ACROSTICHUM* L.
(PTERIDACEAE) OCORRENTES NO NORDESTE
BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Marcelo Guerra

Co-orientadora: Prof^a Iva Carneiro Leão Barros

RECIFE
2000

ADRIANA BUARQUE MARCON

**CITOTAXONOMIA DAS ESPÉCIES DE *ACROSTICHUM* L.
(PTERIDACEAE) OCORRENTES NO NORDESTE BRASILEIRO**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA:

DR. MARCELO GUERRA (ORIENTADOR)

DR^A. ANA MARIA BENKO-ISEPPON

DR. PAULO GUNTER WINDISCH

DR^A. LAISE DE HOLANDA CAVALCANTI ANDRADE (SUPLENTE)

DR^A. MARIA JOSÉ DE SOUZA LOPES (SUPLENTE)

*Aos meus pais Gothardo e Vera
e aos meus irmãos Juliana e Cristiano,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos vão para todas as pessoas que me acompanharam e incentivaram, estando ou não diretamente ligadas ao meu trabalho, especialmente para aquelas com quem convivi desde o momento em que passei a fazer parte do laboratório de Citogenética Vegetal. Primeiramente ao meu orientador, Marcelo Guerra, pela amizade e confiança transmitidas ao longo desse trabalho, que me ajudaram a adquirir um vasto conhecimento e uma visão crítica indispensáveis em nossa profissão. Agradeço também à minha co-orientadora, Iva Barros, pela amizade e incentivo dispensados e por me conduzir ao surpreendente mundo das pteridófitas. Ao colega de laboratório George, pela grande amizade, atenção e incentivo em todas as horas e ajuda dispensada em todas as viagens de coleta. Às importantes contribuições dos amigos Leonardo Felix, que coletou uma grande parte do material utilizado no trabalho, a André Vanzela, que me ajudou e acompanhou minhas atividades iniciais no laboratório e a Toni, pelo desenvolvimento conjunto da técnica de hibridização *in situ*. Pela alegre convivência com meus amigos do laboratório, Ana Christina, Ana Emília, Betânia, Gianna, Ivanildo, Leonardo, Lia, Luzia, Nataniel (Toni), Paulo, Reginaldo, André, Andréa, Jaílson e Loiva, que nunca mediram esforços em me ajudar e com os quais sempre estou aprendendo. À amiga Andréa Pedrosa que, mesmo longe, sempre me ajudou, enviando referências bibliográficas. Agradeço ainda a Marlene Barbosa, curadora do herbário UFP-Geraldo Mariz, pelo auxílio concedido no processamento do material herborizado, a José Alves pela ajuda em coletas e fotografias e a Ariadna Lopes, pela ajuda no Abstract.

Meus agradecimentos vão também ao Curso de Mestrado em Biologia Vegetal, ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), referente à minha bolsa de estudo, e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo financiamento de parte do material utilizado no trabalho, ajudas indispensáveis, sem as quais seria impossível a realização desse trabalho.

Por fim, agradeço à minha família, pelo amor e incentivo que recebo todos os dias e pela compreensão de minha ausência em alguns momentos. E mais importante, agradeço a Deus, sempre presente na minha vida.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO <i>ACROSTICHUM</i>	8
2.2. CITOGENÉTICA DE PTERIDÓFITAS	11
2.2.1. Importância do número cromossômico	11
2.2.2. Importância da morfologia cromossômica	12
2.2.3. Análise meiótica	13
2.2.4. Bandeamento C	14
2.2.5. Bandeamento com fluorocromos	15
2.2.6. Hibridização <i>in situ</i>	16
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
4. MANUSCRITO	24
ABSTRACT	25
INTRODUCTION	25
MATERIAL AND METHODS	27
RESULTS	29
DISCUSSION	31
ACKNOWLEDGMENTS	33
LITERATURE CITED	33
5. CONCLUSÕES	42
6. RESUMO	43
7. ABSTRACT	44
8. ANEXOS	45
8.1. ANEXO 1: ILUSTRAÇÕES ADICIONAIS À REVISÃO	46
8.2. ANEXO 2: NORMAS DO MANUSCRITO	49

1. INTRODUÇÃO

Acrostichum L. (Pteridaceae) é um gênero de pteridófitas representado no Brasil pelas espécies *A. aureum* L. e *A. danaeifolium* Langsd. & Fisch. Ambas possuem morfologia similar, sendo os melhores caracteres para a distinção encontrados na fronde, na distribuição das pinas férteis e na morfologia das paráfises (tricomas encontrados entre os esporângios).

A distribuição geográfica de *A. aureum* se restringe a orlas de mangues e estuários, enquanto que *A. danaeifolium* apresenta uma maior abrangência, podendo ocorrer juntamente com *A. aureum* ou em locais alagados mais afastados da costa litorânea.

As pteridófitas, em geral, são muito estudadas citotaxonomicamente. Esses estudos mostraram-se muito importantes para a classificação dessas espécies e para o conhecimento de seus mecanismos de especiação, já que a hibridização e a poliploidia são eventos frequentes em sua evolução. No Brasil, no entanto, a análise citogenética de pteridófitas ainda é praticamente inexistente, tendo-se conhecimento de apenas um único trabalho desenvolvido na Amazônia por Tryon et al. (1975).

Visando contribuir para o estudo citotaxonomico de pteridófitas regionais, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar citogeneticamente as duas espécies de *Acrostichum* ocorrentes no nordeste brasileiro. Essas espécies foram escolhidas por serem morfológicamente semelhantes, simpátricas, sem indício de hibridização, abundantes e de fácil cultivo. Essas duas últimas características são importantes por facilitarem a análise citológica do material. Por outro lado, o material é adequado para testar o nível de divergência citogenética entre duas espécies aparentemente tão próximas e verificar se há algum indício de hibridização. O fato de que algumas populações asiáticas e africanas apresentam poliploidia levanta também a possibilidade de que as nossas espécies apresentem alguma diversificação citológica importante para a taxonomia do grupo.

Os números cromossômicos geralmente reportados para as duas espécies são $n=30$ ou $2n=60$, considerados diplóides. Entretanto, para *A. aureum*, citótipos poliplóides ($2n=120$) foram registrados no Japão e na África do Sul. Ainda, um caso de aneuploidia ($2n=119$) foi reportado na mesma localidade japonesa em que foi encontrado o citótipo poliplóide.

No presente trabalho, foi realizada uma investigação citogenética comparativa detalhada entre as duas espécies de *Acrostichum* ocorrentes no Brasil, visando avaliar suas divergências ao nível cromossômico. Para isso, foram investigados o número e a morfologia cromossômica com técnicas de coloração convencional, a distribuição de heterocromatina mediante os fluorocromos cromomicina A_3 (CMA) e DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), bem como o número de sítios cromossômicos portadores dos genes para RNAr 45S através da técnica de hibridização *in situ*. Adicionalmente, realizou-se ainda a análise meiótica de alguns indivíduos para avaliar a possível ocorrência de híbridos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO *ACROSTICHUM*

Acrostichum foi descrito por Linnaeus (1753), com base na espécie tipo, *Acrostichum aureum*, coletada pela primeira vez na Jamaica. Inicialmente, o gênero *Acrostichum* era constituído por 25 espécies, hoje desmembradas em gêneros afins. O mais recente sistema taxonômico proposto para as pteridófitas americanas (Tryon e Tryon, 1982) tem posicionado *Acrostichum* dentro da tribo Pterideae (Pteridaceae).

Pteridaceae é uma família grande e diversa, representada por seis tribos de distribuição aproximadamente mundial, com cerca de 35 gêneros, sendo 22 destes americanos. A família é caracterizada por esporângios abaxiais ou marginais cobertos por indúsio, também

denominados “falsos indúsios” por serem formados pela margem da lâmina recurvada, esporos triletes e números cromossômicos com $n=29, 30$ (Moran e Yatskievych, 1995) ou múltiplos destes. Adicionalmente destacam-se outros atributos, restritos somente a alguns gêneros, tais como um arranjo acrosticóide dos esporângios e variação cromossômica numérica ($n=38, 39, 40, 44$ e 110). A família é conhecida paleontologicamente por poucos fósseis sendo representada com certeza somente no Eoceno por *Acrostichum preaureum* Arnold e Daugherty (Tryon e Tryon, 1982).

Dos sete gêneros que compõem a tribo Pterideae, quatro, apresentam distribuição neotropical. Destes, os maiores são *Pteris* L., com 200 espécies, sendo 55 americanas, e *Acrostichum*, com três espécies, das quais duas são amplamente distribuídas nas Américas. O número cromossômico da tribo varia relativamente pouco: $n=29, 58$ e 116 em *Pteris*, $n=58$ em *Anopteris* (Prantl) Diels e *Neurocallis* Fée e $n=30, 60$ em *Acrostichum* (Tryon e Tryon, 1982, Kawakami, 1980, 1982).

As três espécies viventes referidas para *Acrostichum* são *A. aureum* L., de distribuição pantropical, *A. danaeifolium* Langsd. & Fisch., neotropical, e *A. speciosum* Willd. paleotropical, do sudeste da Ásia à Austrália tropical (Tryon et al., 1990).

O gênero *Acrostichum* é terrestre-palustre. O pecíolo varia de decumbente-ascendente a ereto, grosso, portando escamas e raízes esponjosas. As frondes são levemente dimórficas, nas quais a pina fértil é usualmente mais estreita e menor que a estéril. As frondes medem de dois a quatro metros de altura e crescem em touceiras (Fig. 1 do anexo). A lâmina foliar é simplesmente pinada, imparipinada, com as pinas inteiras, glabras ou minutamente pubescentes, apresentando venação anastomosada. Os esporângios nascem sobre a superfície da pina, juntamente com paráfises (tricomatas) pequenas, e há ausência de indúcio. Os esporos são triletes. A arquitetura da folha e o padrão de venação são características do gênero,

havendo presença abundante de paráfises entre os esporângios (Tryon e Tryon, 1982; Mickel e Beitel, 1988; Tryon e Stolze, 1989; Moran e Yatskievych, 1995).

Os caracteres mais utilizados na separação taxonômica de *A. aureum* e *A. danaeifolium* estão na disposição das pinas na ráquis, nas características e na consistência das pinas férteis, na presença ou ausência de pinas abortivas no pecíolo e na morfologia das paráfises. Em *A. aureum*, as pinas se apresentam mais espaçadas na ráquis, com pinas férteis limitadas à porção apical da lâmina e pinas abortivas no pecíolo (Fig. 2b,c,d do anexo). As paráfises apresentam morfologia globosa e irregularmente lobada. *Acrostichum danaeifolium* diferencia-se pela disposição mais aglomerada das pinas, que apresentam consistência membranácea. As pinas férteis estendem-se do ápice até quase a base da lâmina (Fig. 2a,c do anexo). O pecíolo não apresenta pinas abortivas (Fig. 2d do anexo) e as paráfises têm o ápice lateralmente estendido (Adams e Tomlinson, 1979; Proctor, 1980).

O número cromossômico $n=30$ e $2n=60$ para espécies de *Acrostichum*, foi reportado por Manton e Sledge (1954), Abraham et al. (1962 *apud* Fabri, 1963), Walker (1966), Dujardin e Tilquin (1971), Lovis (1977) e Walker (1985). Entretanto, Kawakami (1979, 1980, 1982) e Roux (1993) registraram $2n=120$ para *A. aureum*, demonstrando a ocorrência de poliploidia no gênero. Também foi encontrada na mesma espécie a ocorrência de um aneuplóide com $2n=119$ (Nakato, 1996).

Adams e Tomlinson (1979) estudaram as diferenças morfológicas e ecológicas entre *A. aureum* e *A. danaeifolium* do Sul da Flórida, constatando que *A. danaeifolium* tem ampla distribuição geográfica e, quando ocorre junto com *A. aureum*, não se nota evidências de hibridização. Por outro lado, López (1978) encontrou na República Dominicana, exemplares intermediários entre as espécies, sugerindo a existência de híbridos. Proctor (1980) referiu *A. aureum* e *A. danaeifolium* como as únicas espécies do gênero na Jamaica. Segundo o autor, *A. aureum* habita margens de mangue e estuários enquanto *A. danaeifolium* habita estuários,

estando frequentemente associada com *A. aureum*, e ainda lugares de água corrente e elevações acima de 457 m.

No estado de Pernambuco, *A. aureum* ocorre nos municípios de Ipojuca, Jaboatão, Paulista, Prazeres e Quipapá, enquanto *A. danaeifolium* ocorre em Recife (Dois Irmãos) e Nazaré da Mata (Barros et al., 1988). Nesse levantamento, percebeu-se um limite na ocorrência de *A. aureum* até a subzona de mata úmida, enquanto que *A. danaeifolium* mostrou-se mais abrangente chegando até a subzona de mata seca.

2.2. CITOGENÉTICA DE PTERIDÓFITAS

Pesquisas citológicas em pteridófitas têm sido conduzidas no sentido de auxiliar na resolução de determinados problemas taxonômicos, bem como revelar detalhes nos padrões de evolução e nos processos de especiação (Lovis, 1977). Embora ainda escassos no Brasil, destacando-se apenas o trabalho de Tryon et al., (1975) para algumas pteridófitas da Amazônia, abordagens citogenéticas especialmente com referências a contagens cromossômicas, têm sido amplamente desenvolvidas.

2.2.1. Importância do número cromossômico

Um dos eventos mais significativos na evolução do grupo das pteridófitas é a poliploidia, que ocorre em cerca de 90% das espécies (Walker, 1979; Leitch e Bennett, 1997). A maioria dos números cromossômicos altos das pteridófitas está bem relacionada a um tipo especial de poliploidia denominado neopaleopoliploidia. Os paleopoliplóides, denominados por Stebbins (1970) de poliplóides relictuais, são poliplóides antigos que não mostram nenhuma relação clara com seus parentais diplóides. Neopaleopoliplóides são espécies originadas de um paleopoliplóide através de novos ciclos de poliploidia, resultando em números cromossômicos ainda mais altos. Nesse caso, o número cromossômico do paleopoliplóide

passa a ser considerado como número básico do grupo (x) e os números cromossômicos dos neopaleopoliplóides são considerados tetraplóides ($4x$), hexaplóides ($6x$), etc. *Asplenium* L., por exemplo, é considerado um neopaleopoliplóide por ser representado por espécies com níveis de ploidia variando de 2 a 16 e possuindo números básicos altos, tais como $x=36$, 38, 39, apresentando indivíduos diplóides com $2n=72$ e $2n=78$ (Manton e Sledge, 1954; Kato et al., 1992), tetraplóides com $2n=144$ e $2n=156$ (Walker, 1966, 1985; Kato et al., 1992) e octoplóides com $n=288$ (Walker, 1966). *Pteris* L. também retrata esse evento, com número básico $x=29$ e espécies diplóides com $2n=58$, triplóides com $2n=87$ (Kato et al., 1992; Nakato, 1990, 1996) e tetraplóides com $2n=116$ (Kawakami, 1971; Nakato et al., 1995).

Os neopoliplóides são poliplóides de origem mais recente, que comumente dividem com seus parentais diplóides o mesmo ambiente e apresentam cromossomos similares em tamanho e morfologia aos dos diplóides. Esses poliplóides são mais comumente encontrados em pteridófitas heterosporadas e em angiospermas (Guerra, 2000). Em *Selaginella* P. Beauv., por exemplo, foi realizado um estudo cariomorfológico em 16 representantes do gênero no Japão, tendo-se encontrado espécies com $2n=16$, 18, 20, 30 e 32, das quais $2n=30$ e $2n=32$ provavelmente são neopoliplóides (Takamiya, 1993). Na análise do grau de parentesco entre essas espécies, foi verificado que havia a possibilidade de três números cromossômicos básicos nesse gênero ($x=8$, 9, 10). No gênero *Isoetes* L., um estudo citológico com seis espécies ocorrentes no nordeste da América do Norte, desenvolvido por Kott e Britton (1980), mostrou a ocorrência de duas espécies diplóides ($2n=22$), três tetraplóides ($2n=44$) e uma decaplóide com $2n=110$.

2.2.2. Importância da morfologia cromossômica

Além do número cromossômico, a morfologia cromossômica, caracterizada pelo tamanho do cromossomo, e posição do centrômero, também é utilizada como um complemento na

caracterização de determinados táxons. Destacam-se, por exemplo, estudos cariológicos desenvolvidos em Lycopodiaceae para *Lycopodium* L. (Takamiya, 1992) e em Blechnaceae para *Woodwardia* Sm. (Takamiya et al., 1992).

Em *Lycopodium* foi realizada uma comparação através da morfologia cromossômica em seis espécies pertencentes a cinco diferentes seções. Quatro dessas espécies, pertencentes a quatro seções diferentes, apresentaram $2n=68$, porém com muitas diferenças cariomorfológicas. Duas outras espécies apresentaram $2n=46$ com cromossomos metafásicos de tamanho e forma muito semelhantes. Dessa forma, concluiu-se que a seção *Complanata*, à qual pertencem as duas últimas espécies, seria cariomorfológicamente homogênea e distinta das demais.

Takamiya et al. (1992) também desenvolveram uma análise morfológica dos cromossomos de cinco espécies de *Woodwardia*. Destas espécies, três apresentaram-se diplóides com $2n=68$, constatando-se similaridade na morfologia cromossômica. As outras duas espécies eram tetraplóides, com $2n=124$ e $2n=136$. Observou-se, através da fórmula cariotípica, similaridade entre o conjunto cromossômico da espécie tetraplóide de $2n=136$ com as espécies diplóides, além do número básico em comum $x=34$, e o fato de o maior cromossomo do conjunto apresentar-se submetacêntrico. A outra espécie tetraplóide ($2n=124$) diferiu das demais por ter apresentado número básico $x=31$ e um cromossomo telocêntrico como o maior do conjunto. Este estudo reforçou o tratamento desta espécie em um gênero independente, *Chieniopteris* Ching.

2.2.3. Análise meiótica

A análise meiótica é um parâmetro citogenético muitas vezes utilizado em indivíduos de morfologia intermediária entre duas espécies, pois oferece informações necessárias para a identificação de ocorrência ou não de hibridização entre espécies próximas.

A hibridização pode ser causada por mecanismos genéticos que previnem uma autofecundação, devido à maturação tardia de um dos gametas, favorecendo a fecundação cruzada (Manton, 1961). Fenômenos de hibridização em pteridófitas são bastante comuns e têm sido reportados entre espécies de diversos gêneros, tais como *Adiantum* L., *Anemia* Sw., *Asplenium* L., *Blechnum* L., *Danaea* Sm., *Diplazium* Sw., *Feea* Bory, *Gleichenia* Sm., *Goniopteris* C. Presl, *Pleopeltis* Humb. & Bonpl., *Pityrogramma* Link, *Tectaria* Cav., *Thelypteris* Schmidel, *Trichomanes* L. e *Vittaria* Sm. (Walker, 1966, 1985).

Polystichum x saltum J.P.Roux, por exemplo, é um híbrido interespecífico cujos prováveis parentais são *P. transvaalense* N.C. Anthony e *P. wilsonii* H. Christ. Esse híbrido, encontrado por Roux (1997) na província de KwaZulu/Natal, na África do Sul, apresentou caracteres morfológicos de ambas as espécies parentais e o mesmo número cromossômico observado nestas ($2n=164$). A análise meiótica, entretanto, mostrou sua origem híbrida por apresentar erro no pareamento cromossômico, com a presença de cromossomos univalentes na metáfase meiótica, ocasionado pela falta de homologia entre os genomas de espécies diferentes.

2.2.4. Bandeamento C

Além das técnicas convencionais, que permitem a contagem e observação da morfologia cromossômica, em determinadas situações torna-se necessário o emprego de técnicas de coloração diferencial, como o bandeamento C, a coloração com fluorocromos, coloração com nitrato de prata, etc., que oferecem mais detalhes acerca do conjunto cromossômico da espécie em estudo (ver Vosa, 1985).

Uma das técnicas de bandeamento cromossômico que permite distinguir as regiões heterocromáticas é a chamada técnica de bandeamento C. Sabe-se que a heterocromatina é formada por seqüências altamente repetitivas de DNA, geralmente sem atividade gênica (Vosa, 1985). Como tais seqüências (bandas C) são evolutivamente instáveis, a localização

destas pode revelar diferenças genômicas entre táxons afins (ver Schubert e Rieger, 1990). Curiosamente, não foi encontrado nenhum trabalho anterior utilizando técnicas de bandeamento C em pteridófitas, embora essa técnica tenha sido aplicada em briófitas (Newton, 1985, 1986), gimnospermas, e diversos grupos de angiospermas (Guerra, 2000a).

Tanaka e Hizume (1980) analisaram o bandeamento C de três espécies de gimnospermas, *Cycas revoluta* Thunb. ($2n=22$), *Ginkgo biloba* L. ($2n=44$) e *Pinus densiflora* Sieb. e Zucc. ($2n=24$), e encontraram padrões de distribuição de bandas amplamente diferentes. Em *Cycas revoluta* as bandas apareciam principalmente em 12 cromossomos telocêntricos. Em *Ginkgo biloba* somente dois pares de cromossomos apresentavam bandas C enquanto que em *Pinus densiflora* todos os cromossomos apresentaram bandas na região centromérica.

Em angiospermas a aplicação dessa técnica pode ser exemplificada pelas análises feitas em espécies de *Scilla* L. (Greilhuber e Speta, 1989) e *Capsicum* L. (Moscone et al., 1993). *Scilla cilicica* Siehe e *S. morrisii* Meikle, ambas com $2n=12$, são espécies muito próximas e de difícil distinção taxonômica. Os resultados obtidos mostraram que o padrão das bandas C nas duas espécies diferiu, não só no número de bandas, mas também no tamanho das mesmas, embora essas duas espécies analisadas tivessem morfologia cromossômica muito semelhante. A aplicação do bandeamento C em seis espécies diplóides do gênero *Capsicum* separou cada uma delas pelo padrão de distribuição das bandas. Essa técnica mostrou ser uma importante ferramenta na citotaxonomia desse gênero, já que entre as espécies há pouca distinção entre os cariótipos corados convencionalmente.

2.2.5. Bandeamento com fluorocromos

Determinados corantes fluorescentes também são muito utilizados na coloração de regiões específicas da heterocromatina. Os fluorocromos mais utilizados em vegetais são a cromomicina A₃ (CMA), que cora preferencialmente regiões repetitivas de DNA ricas em

GC, e o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que cora preferencialmente regiões ricas em AT (Schweizer 1976). Bandas evidenciadas com esses corantes são denominadas bandas CMA⁺ e DAPI⁺, respectivamente. A aplicação de técnicas de bandeamento com fluorocromos CMA/DAPI vem sendo amplamente empregada em gimnospermas e angiospermas, inexistindo em pteridófitas.

Para as gimnospermas, destaca-se o padrão de bandas CMA/DAPI obtido para *Pinus densiflora* Sieb. & Zucc. e *P. thunbergii* Parl. (Hizume et al., 1989), caracterizando o cariótipo das duas espécies. Para espécies de Araucariaceae, Cupressaceae e Podocarpaceae, o padrão de bandas CMA/DAPI também se apresentou como um caráter adicional importante na distinção dos cariótipos (Davies et al., 1997).

Dentre os trabalhos com angiospermas, destaca-se a variabilidade no padrão de bandas obtida para espécies de *Citrus* L. (Guerra, 1993) e *Drosera* L. (Sheikh e Kondo, 1995). Em *Citrus*, foram analisadas cinco espécies, todas com número cromossômico constante ($2n=18$), cromossomos pequenos e morfologia similar. Neste caso, aplicando a coloração com fluorocromos CMA e DAPI, observou-se uma grande variabilidade no padrão destas bandas entre as espécies estudadas, abrindo novas possibilidades para a análise evolutiva (ver Guerra et al., 2000; Pedrosa et al., 2000). Em doze espécies australianas de *Drosera*, o bandeamento com fluorocromos evidenciou a maioria das bandas localizadas nas regiões terminais dos cromossomos, sendo alguns cromossomos identificados pelo tipo de bandas que portavam.

2.2.6. Hibridização *in situ*

Uma outra técnica denominada hibridização *in situ* permite a localização de determinadas seqüências de DNA, codificantes ou não, no conjunto cromossômico de uma espécie. Consiste no isolamento de uma seqüência de DNA marcada por uma molécula fluorescente

(sonda) e que irá hibridizar com um sítio cromossômico da espécie analisada, indicando assim sua exata localização. Os genes mais utilizados como sonda (marcadores moleculares) são os que codificam para RNAr 45S e 5S (ver Heslop-Harrison, 1994).

Através desta técnica, sítios de DNA ribossomal foram, por exemplo, detectados em cromossomos mitóticos de raiz e cromossomos politênicos de células do tapete de antera de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e *Phaseolus coccineus* L. (Guerra et al., 1996). A sonda de DNAr hibridizou em 10 sítios nos cromossomos mitóticos de *V. unguiculata*, enquanto em análises anteriores com técnicas de coloração convencional o número de cromossomos satelitados, os quais estão associados com o DNAr 45S, variava de 0 a 2, mostrando a maior sensibilidade desta técnica para detectar essas regiões cromossômicas. No gênero *Hypochaeris* L., uma análise da localização dos sítios para RNAr, coloração com nitrato de prata e com fluorocromo (CMA), permitiu observar rearranjos cromossômicos tais como fissões e fusões cêntricas e translocações, estabelecendo-se uma relação filogenética entre onze espécies da Europa e da América do Sul (Cerbah et al., 1998).

Além desses tipos de sonda, o conjunto cromossômico total pode ser marcado e utilizado também como sonda para identificar as espécies parentais de híbridos (hibridização genômica *in situ* - GISH). Um exemplo de sua aplicação pode ser observado em *Milium montianum* Parl., uma Gramineae, com $2n=22$ e cariótipo distintamente bimodal, constituído por oito cromossomos maiores e 14 menores (Bennett et al., 1992). Para confirmar sua origem híbrida, o conjunto cromossômico de um dos possíveis parentais, *M. vernale* M. Bieb. ($2n=8$), foi marcado, utilizado como sonda e colocado em contato com o DNA genômico de *M. montianum*. Os resultados mostraram oito cromossomos marcados nesta espécie, demonstrando sua origem aloploplóide e confirmando a origem de um dos parentais.

A aplicação desta técnica em pteridófitas é bastante recente e restringe-se aos trabalhos de Brandes et al., (1997), que analisaram a distribuição de um tipo particular de seqüência de

DNA repetitivo (retrotransposon) em *Pteris cretica* L. e *Selaginella apoda* L., bem como o trabalho de Kawakami et al. (1999) com *Osmunda japonica* Thbg. A hibridização do retrotransposon em *P. cretica* apresentou distribuição dispersa nos cromossomos, marcando alguns cromossomos por inteiro e outros apenas com sinais fracos de hibridização. Em *S. apoda* o retrotransposon mostrou-se distribuído por todo o cromossomo exceto em seis sítios de DNAr. Kawakami et al. (1999) compararam o número de sítios de DNAr 45S entre indivíduos haplóides e diplóides de *Osmunda japonica*, encontrando quatro sinais de hibridização nos haplóides e oito sinais nos diplóides. Esses resultados sugeriram que a planta haplóide teria surgido através de apogamia.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, D. C., e P. B. Tomlinson. 1979. *Acrostichum* in Florida. Amer. Fern J. 69:42–46.
- Barros, I. C. L., O. C. Lira e A. J. R. Silva. 1988. Distribuição geográfica das pteridófitas ocorrentes no estado de Pernambuco, Brasil. Acta Bot. Bras. 2: 47-84.
- Bennett, S. T., A. Y. Kenton, e M. D. Bennett. 1992. Genomic *in situ* hybridization reveals the allopolyploid nature of *Milium montianum* (Gramineae). Chromosoma 101: 420-424.
- Brandes, A., J. S. Heslop-Harrison, A. Kamm, S. Kubis, R. L. Doudrick, e T. Schmidt. 1997. Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of *Ty1-copia* like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. Plant Mol. Biol. 33: 11-21.
- Cerbah, M., J. Coulaud, e S. Siljak-Yakovlev. 1998. rDNA organization and evolutionary relationships in the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). J. Heredity 89: 312-318.

- Davies, B. J., I. E. W. O'Brien, e B.G. Murray. 1997. Karyotypes, chromosome bands and genome size variation in New Zealand endemic gymnosperms. *Pl. Syst. Evol.* 208: 169-185.
- Dujardin, M., e J. P. Tilquin. 1971. IOPB chromosome numbers reports XXXIII. *Taxon* 20:609–614.
- Fabri, F. 1963. Primo supplemento alle tavole cromosomiche delle pteridophyta di Alberto Chiarugi. *Caryologia* 16: 237-335.
- Greilhuber, J. e F. Speta. 1989. A Giemsa C-banding and DNA content study in *Scilla cilicica* and *S. morrisii*, two little know sibling species of the *S. siberica* alliance (Hyacinthaceae). *Pl. Syst. Evol.* 165: 71-83.
- Guerra, M. 1993. Cytogenetics of Rutaceae V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* 71: 234-241.
- Guerra, M. 2000. Chromosome number variation and evolution in monocots. Pp. 127-136 in: K.L. Wilson e D.A. Morrison (eds.), *Monocots: Systematics and Evolution*, CSIRO, Melbourne.
- Guerra, M. 2000a. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet. Mol. Biol.* 23:1029–1041.
- Guerra, M., A. Kenton, e M. D. Bennett. 1996. rDNA sites in mitotic and polytene chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Phaseolus coccineus* L. revealed by *in situ* hybridization. *Ann. Bot.* 78: 157-161.
- Guerra, M., K. G. B.Santos, A. E. B. Silva, e F. Ehrendorfer. 2000. Cytogenetics of Rutaceae VI: heterochromatin banding patterns in *Aurantioideae* – a case of parallel chromosomal evolution. *Amer. J. Bot.* 87: 735-747.

- Heslop-Harrison, J. S. 1994. *Techniques et Utilisations des Marqueurs Moléculaires*. INRA, Paris.
- Hizume, M., A. Ohgiku, e A. Tanaka. 1989. Chromosome banding in the genus *Pinus* II. Interespecific variation of fluorescent banding patterns in *P. densiflora* and *P. Thunbergii*. Bot. Mag. 102: 25-36.
- Kato, M., N. Nakato, X. Cheng, e K. Iwatsuki. 1992. Cytotaxonomic study of ferns of Yunnan, southwestern China. Bot. Mag. 105: 105-124.
- Kawakami, S. 1971. Karyological studies on Pteridaceae I. Karyotypes of three species in *Pteris*. Bot. Mag. 84: 180-186.
- Kawakami, S. 1979. Karyomorphological studies on Japanese Pteridaceae I-*Dennstaedtia*, *Microlepia*, *Sphenomeris*, *Pteris*. Bull. Aichi Univ. Educ. (Nat. Sci.) 28: 85-104.
- Kawakami, S. 1980. Karyomorphological studies on Japanese Pteridaceae II-*Pteris*, *Acrostichum*, *Cheilanthes*, *Onychium*. Bull. Aichi Univ. Educ. (Nat. Sci.) 29: 129-150.
- Kawakami, S. 1982. Karyomorphological studies on Japanese Pteridaceae IV-Discussion. Bull. Aichi Univ. Educ. (Nat. Sci.) 31: 175-186.
- Kawakami, S. M., K. Kondo, e S. Kawakami. 1999. Analysis of nucleolar organizer constitution by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in diploid and artificially produced haploid sporophytes of the fern *Osmunda japonica* (Osmundaceae). Pl. Syst. Evol. 216:325-331.
- Kott, L. S. e D. M. Britton. 1980. Chromosome numbers for *Isoetes* in northeastern North America. Can. J. Bot. 58: 980-984.
- Leitch, I. J. e M. D. Bennett. 1997. Polyploidy in angiosperms. Trends Plant Sci. 2: 470-476.
- Linnaeus, C. 1753. *Species Plantarum*. Ray Society, London.
- López, I. G. 1978. Revision del genero *Acrostichum* en la Republica Dominicana. Moscosoa 1: 64-70.

- Lovis, J. D. 1977. Evolutionary patterns and processes in ferns. *Adv. Bot. Res.* 4: 229-415.
- Manton, I. 1961. Evolution in the pteridophyta. Pp. 105-120 *in*: P. J. Wanstall (ed.), “*A Darwin Centenary*”, Vol. 6. B.S.B.I. Conf. Rep., London.
- Manton, I. e W. A. Sledge. 1954. Observations of the cytology and taxonomy of the pteridophyte flora of Ceylon. *Phil. Trans. Roy. Soc. London* 238: 127-185.
- Mickel, J. T. e J. M. Beitel. 1998. *Pteridophyte Flora of Oaxaca, Mexico*. New York Botanical Garden, New York.
- Moran, R. C. e G. Yatskievych. 1995. Pteridaceae. Pp. 104-145 *in*: R.C. Moran e R. Riba, (eds.), *Flora Mesoamericana. Psilotaceae a Salviniaceae*. Universidad Autónoma de México, México.
- Moscone, E. A., M. Lambrou, A. T. Hunziker, e F. Ehrendorfer. 1993. Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). *Pl. Syst. Evol.* 186: 213-229.
- Nakato, N. 1990. Notes on chromosomes of Japanese pteridophytes (3). *J. Jpn. Bot.* 65: 204-209.
- Nakato, N. 1996. Notes on chromosomes of Japanese pteridophytes (4). *J. Jpn. Bot.* 71: 163-167.
- Nakato, N., M. Kato, e B. D. Liu. 1995. A cytotaxonomic study of some ferns from Jiangsu and Zhejiang provinces, China. *J. Jpn. Bot.* 70: 194-204.
- Newton, M. E. 1985. *Pellia borealis* Lorbeer: its cytological status and discovery in Britain. *J. Bryol.* 14: 215-230.
- Newton, M. E. 1986. Bryophyte phylogeny in terms of chromosome cytology. *J. Bryol.* 14: 43-57.
- Pedrosa, A., D. Schweizer, e M. Guerra. 2000. Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Theor. Appl. Genet.* 100:361–367.

- Proctor, G. R. 1985. *Ferns of Jamaica – A Guide to the Pteridophytes*. British Museum (Natural History), London.
- Roux, J. P. 1993. A new cytotype for *Acrostichum aureum*. *Bothalia* 23: 75.
- Roux, J. P. 1997. The morphology and cytology of a new *Polystichum* (Pteridophyta: Dryopteridaceae) hybrid from South Africa. *Bot. J. Linn. Soc.* 124: 375-381.
- Schubert, I. e R. Rieger. 1990. Characterization of plant chromosomes by means of banding techniques, differential incorporation of base analogues, and *in situ* hibridization. Pp. 32-46 in: R. C. Sobti e G. Obe (eds.), *The Eukaryotic Chromosome – Structural and Functional Aspects*. Springer-Verlag and Narosa Publishing House, Berlin.
- Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58: 307-324.
- Sheikh, S. A. e K. Kondo. 1995. Differential staining with orcein, Giemsa, CMA, and DAPI for comparative chromosome study of 12 species of Australian *Drosera* (Droseraceae). *Amer. J. Bot.* 82: 1278-1286.
- Stebbins, G. L. 1970. *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. Addison-Wesley Publishing Company, California.
- Takamiya, M. 1992. Karyomorphology of the genus *Lycopodium sensu stricto* and relationships among species. *Bot. Mag.* 105: 573-588.
- Takamiya, M. 1993. Comparative karyomorphology and interrelationships of *Selaginella* in Japan. *J. Plant Res.* 106: 149-166.
- Takamiya, M., K. Osato, e K. Ono. 1992. Karyomorphological studies on *Woodwardia sensu lato* of Japan. *Bot. Mag.* 105: 247-263.
- Tanaka, R. e M. Hizume. 1980. C banding treatment for the chromosomes of some gymnosperms. *Bot. Mag.* 93: 167-170.

- Tryon, A. F., H. P. Bautista, e I. da S. Araújo. 1975. Chromosome studies of Brazilian ferns. *Acta Amazonica* 5: 35-43.
- Tryon, R. M. e R. G. Stolze. 1989. Pteridophyta of Peru. Part II: 13-Pteridaceae – 15-Dennstaedtiaceae. *Fieldiana Botany* 22: 81-83.
- Tryon, R. M., and A. F. Tryon. 1982. *Ferns and Allied Plants - with Special Reference to Tropical America*. Springer-Verlag, New York.
- Tryon, R. M., A. F. Tryon, e K. U. Kramer. 1990. Pteridaceae. Pp. 230-256 *in*: K. U. Kramer e P. S. Green (eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants, Vol. I, Pteridophytes and Gymnosperms*. Springer-Verlag, Berlin.
- Vosa, C. G. 1985. Chromosome banding in plants. Pp. 79-99 *in*: A. K. Sharma e A. Sharma (eds.), *Chromosome and Cell Genetics*. Gordon and Breach Science Publishers, New York.
- Walker, T. G. 1966. A citotaxonomic survey of the pteridophytes of Jamaica. *Trans. Roy. Soc. Edinburgh*. 66: 169-237.
- Walker, T. G. 1979. The cytogenetics of ferns. Pp. 87-132 *in*: A. F. Dyer (ed.), *The Experimental Biology of Ferns*. Academic Press, London.
- Walker, T. G. 1985. Cytotaxonomic studies of the ferns of Trinidad 2. The cytology and taxonomic implications. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Bot.)* 13: 149-249.

4. MANUSCRITO

Manuscrito enviado para a revista

AMERICAN FERN JOURNAL

A Karyotype Comparison Between Two Closely Related Species of *Acrostichum*

ADRIANA B. MARCON, IVA C. L. BARROS and MARCELO GUERRA

Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Nelson Chaves s/n,
Cidade Universitária, 50.670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

ABSTRACT.—*Acrostichum aureum* L. and *A. danaeifolium* Langsd. & Fisch. are morphologically similar sympatric species which grow in mangrove communities. To evaluate the cytological differences between these species, their karyotypes were analyzed with conventional staining, triple-staining with chromomycin A₃ (CMA), distamycin A (DA) and DAPI, silver nitrate, and *in situ* hybridization with 45S rDNA as probe. Both species have the same chromosome number ($2n=60$) with only small differences in chromosome size and morphology. The CMA⁺ banding pattern revealed four terminal bands in *A. danaeifolium* and six in *A. aureum*. DAPI⁺ bands were not found. The maximum number of nucleoli per interphase nucleus and the number of 45S rDNA sites were consistent with the number of CMA⁺ bands: four in *A. danaeifolium* and six in *A. aureum*. All meiotically analyzed materials showed 30^{II} with normal chromosome pairing and segregation, except in one plant with a chromosome bridge and fragment in cells of anaphase I and II. It is suggested that sympatry and karyotypic orthoselection have contributed to keep the morphological and karyological similarities in a such widespread species.

The Pteridaceae is a large and diverse family of homosporous ferns of almost global distribution. This family comprises 32 genera, 22 of which occur in the Americas. The pantropical genus *Acrostichum* includes at least three species: the paleotropical *A. speciosum* Willd., the pantropical *A. aureum* L. and the neotropical *A. danaeifolium* Langsd. & Fisch.

(Tryon and Tryon, 1982). The last two species are widely distributed in Brazil, occurring mainly as sympatric members of mangrove communities. *Acrostichum danaeifolium* also may be found isolated on swampy banks far away from coast.

These two species are morphologically very similar, although there are differences between fertile fronds, petioles, and paraphyses. For example, in *A. aureum* only the distal few pairs of pinnae are fertile, there are abortive pinnae on the petiole, and the paraphyses (*i.e.*, trichomes occurring between sporangia) are globular, while in *A. danaeifolium* the pinnae are fertile from the apex to almost the base of the blades, the petioles have no abortive pinnae, and the paraphyses have laterally extended apices (Adams and Tomlinson, 1979; Proctor, 1985). The chromosome numbers of both species are $n=30$ or $2n=60$ (Manton and Sledge, 1954; Walker, 1966, 1985; Dujardin and Tilquin, 1971; Lovis, 1977), although polyploids have been reported in two populations of *A. aureum* with $2n=120$ (Kawakami, 1980, 1982; Roux, 1993) as well as an aneuploid with $2n=119$ (Nakato, 1996).

The sympatric distribution between *A. aureum* e *A. danaeifolium* suggests that marked genetic differences may maintain reproductive isolation between the species, and mediate against hybridization and polyploidy, which are frequent events in the evolution of pteridophytes, especially in homosporous genera (Walker, 1984). However, López (1978) observed the occurrence of morphologically intermediate individuals in the Dominican Republic.

In the study reported here, the cytological divergence between *A. danaeifolium* and *A. aureum* was investigated using conventional cytogenetic techniques to analyze chromosome number and morphology, fluorochrome staining to identify heterochromatin blocks, silver nitrate staining to detect the maximum number of nucleoli, and *in situ* hybridization to localize 45S ribosomal DNA (45S rDNA) sites in the genomes of both species.

MATERIAL AND METHODS

Samples and collection sites are given in Table 1. Part of the collected material was cultivated in the experimental garden of the Department of Botany of the Federal University of Pernambuco, Brazil, and another part of the material was stored as dried voucher specimens in the UFP herbarium for posterior identification.

SAMPLE PREPARATION AND FIXATION.—For mitotic analysis, actively growing root-tips were treated with 0.002 M 8-hydroxyquinoline at room temperature for 1 h, followed by 23 h at 6°C, then fixed in Carnoy's solution (ethanol:acetic acid 3:1) for 2-24 h. For meiotic analysis, young sporangia were fixed directly in Carnoy's for 2-24 h at room temperature. All fixed material was stored in a freezer until needed.

CONVENTIONAL STAINING.—Root-tips were washed twice in distilled water for 5 min, after which they were treated with a mixture of 2% cellulase–20% pectinase for 5-6 h at 37°C and hydrolyzed in 5 N HCl for 30 min at room temperature. The root meristem was isolated, mounted on a microscope slide in 45% acetic acid, squashed under a coverslip (subsequently removed by freezing with liquid nitrogen), dried at room temperature, stained with 1% hematoxylin or 2% Giemsa, and mounted in Entellan (Merck), according to Guerra (1999). For meiotic analysis, sporangia were squashed in 2% acetic-carmin and analyzed. Karyotype formulas were based on measurements of the long and short arm lengths of each chromosome performed on photographs of the best metaphase figures. Chromosome nomenclature, based on centromeric index (short arm/total length x 100), followed the system proposed by Levan et al. (1964), allowing comparison with results of previous authors.

FLUORESCENT CMA/DA/DAPI STAINING.—Root-tips were washed in distilled water, treated with a mixture of 2% cellulase–20% pectinase for 5-6 h at 37°C, and squashed in 45% acetic acid on a microscope slide. The slides were aged for 3 days at room temperature, stained with 0.5 mg/ml chromomycin A₃ (CMA) for 1 h, counterstained with 0.1 mg/ml distamycin A (DA) for 30 min, and 2 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 30 min, then mounted in a mixture of glycerol:McIlvaine's buffer (1:1) containing 2.5 mM MgCl₂ (following Schweizer and Ambros, 1994). CMA detects heterochromatin blocks rich in guanine and cytosine and DAPI detects blocks rich in adenine and thymine, whereas distamycin A is a non-fluorescent DNA ligand that increases the contrast between CMA and DAPI.

SILVER NITRATE STAINING.—Root-tips were treated and squashed as described for fluorochrome staining. The silver nitrate staining technique was based on Rufas et al. (1987). A small drop of silver nitrate (50%, w/v, in formalin-water) was placed over the squashed cells, covered with a coverslip, and incubated at 60°C in a moist chamber for ca. 10 min.

IN SITU HYBRIDIZATION. —An rDNA probe isolated from *Arabidopsis thaliana* (SK18S + SK25S) containing two separately recloned fragments of the 45S rDNA repeat, representing the 18S and 25S rDNA (Unfried et al., 1989; Unfried and Gruendler, 1990), kindly supplied by Prof. D. Schweizer, University of Vienna, was marked with biotin-11-dUTP (Sigma, USA) by nick translation. The 5S rDNA probe was obtained from genomic DNA of *Passiflora edulis* by PCR using the primers 5'-GTG CGA TCA TAC CAG C(A/G)(G/T)TAA TGC ACC GG-3' and 5'-GAG GTG CAA CAC GAG GAC TTC CCA GGA GG-3' (Gottlob-McHugh et al., 1990). The technique was based on Moscone et al. (1996). The probes were added at a final concentration of 1.2-3.0 ng/µl to a hybridization mixture containing 60% (v/v)

formamide, 5% (w/v) dextran sulphate, and 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ salmon sperm in 2xSSC. The hybridization mixture and the cytological preparations were denatured at 75°C for 10 min and hybridized for 18-20 h at 37°C in a moist chamber. The 45S rDNA probe was detected with mouse anti-biotin monoclonal antibody (Dakopatts n° M743) and visualized with rabbit anti-mouse antibody conjugated to tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC) (Dakopatts n° R270). The 5S rDNA probe was detected with sheep anti-digoxigenin antibody conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) (Boehringer Mannheim n° 1207741) and FITC-conjugated rabbit anti-sheep (Dakopatts F135, DAKO). The slides were stained with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI, washed in 2xSSC, and mounted in Vectashield H-1000 (Vector Labs).

MICROPHOTOGRAPHY.—The slides were examined using a Leica DMLB microscope and the best cells photographed on Kodak ASA 25 Imagelink HQ film for bright-field and Kodak ASA 400 T-MAX film for fluorescence images. Prints were made on Kodak Kodabromide F3.

RESULTS

The chromosome number observed was $2n=60$ in all the individuals of the two species. The chromosome size and morphology were similar for both species (Fig. 1a, b). The haploid chromosome complement was formed by $1m+2sm+19st+8t$ in *A. aureum* and $1m+3sm+18st+8t$ in *A. danaeifolium* (Table 2). The metacentric pair was the second smallest of the complement in *A. aureum*, but in *A. danaeifolium* it was the fifth smallest pair. However, differences in chromosome length between chromosomes of a complement, which determine the ordering, were very small. Satellites were observed in two subtelocentric pairs in both species. The chromosome size exhibited a gradual variation within each complement, ranging from 4.91 to 8.09 μm in *A. aureum* and from 5.06 to 8.04 μm in *A. danaeifolium*. The

average chromosome sizes were 6.35 and 6.40 μm and the length of haploid complements was 190.57 and 192.12 μm for *A. aureum* and *A. danaeifolium*, respectively (Table 2).

Silver nitrate staining did not allow the visualization of the nucleolus organizer regions (NORs), although the nucleoli were well defined. In 887 nuclei analyzed of *A. danaeifolium*, the number of nucleoli varied from one to four, with three being the most common (56.3%). Cells with three or four nucleoli generally exhibited one nucleolus much smaller than the others. In *A. aureum* 318 nuclei were analyzed, and the number of nucleoli varied between one and six (Fig. 1c), with four being the most common (39.6%).

Meiotic analysis was performed in three individuals of *A. aureum* and four of *A. danaeifolium*, of which two from each species were growing together (Table 1). Both species nearly always showed normal meiosis, with 30 bivalents (Fig. 1d, e). In a single plant from a population of *A. aureum* some meiocytes showed anaphase I and II with a chromosome bridge and fragment (Fig. 1f).

After CMA/DA/DAPI staining, *A. danaeifolium* exhibited two pairs of subtelocentric chromosomes with a CMA⁺ band on their short arms, slightly different in size and brightness (Fig. 2a). The same cell stained with DAPI displayed a homogeneous staining, except the CMA⁺ regions, which became negatively stained. For *A. aureum*, three chromosome pairs showed a CMA⁺/DAPI⁻ band, two of them on the short arms of a subtelocentric and a telocentric chromosome pairs and one on the long arms of a subtelocentric pair (Fig. 2c). The band of the short arms of the subtelocentric chromosome pair was smaller and sometimes unstable. No DAPI⁺ bands were seen on the chromosomes of either of the species (Fig. 2b, d).

In situ hybridization with 45S rDNA fragments labeled the terminal regions of the short arms of two subtelocentric chromosome pairs of *A. danaeifolium*, with sites slightly different in size (Fig. 2e). In *A. aureum*, there were two sites on the short arms of a subtelocentric and a telocentric chromosome pairs and one on the long arms of a subtelocentric chromosome pair.

The site on the telocentric chromosome pair was the smallest, while the other two were of similar size (Fig. 2f). The 5S rDNA probe did not produce any single signal, in spite of repeated attempts.

DISCUSSION

Acrostichum danaeifolium and *A. aureum* are considered diploid taxa with a chromosome base number $x=30$ (Lovis, 1977). The chromosome number found in *Acrostichum* populations from Northeast Brazil agreed with those reported for Sri Lankan (Manton and Sledge, 1954), Jamaican, and Trinidadian (Walker, 1966, 1985) populations, with $2n=60$ and $n=30$ for both species. Dujardin and Tilquin (1971) also reported $n=30$ for a sample of *A. aureum* from Congo. On the other hand, Kawakami (1980, 1982) and Roux (1993) reported $2n=120$ for *A. aureum* from the Japanese island of Iriomote and from Natal (South Africa), respectively, and Nakato (1996) found an individual of *A. aureum* from the Iriomote population with $2n=119$. The latter is the only report of aneuploidy in *Acrostichum*, although dysploids are known in some other pteridophytes (Walker, 1984, 1985).

The karyotypes of *A. aureum* and *A. danaeifolium* were similar in total haploid length (ca. 192 μm), general symmetry, and chromosome size variation. They differed slightly in the karyotype formula: $1m+2sm+19st+8t$ for *A. aureum* and $1m+3sm+18st+8t$ for *A. danaeifolium*. The average chromosome size of the tetraploid *A. aureum*, described by Kawakami (1980), was 4.92 μm , therefore, much shorter than the average chromosome size in the present diploid sample (6.35 μm). Although this observed difference may be due to differential chromosome condensation, it most likely is due to chromosome size reduction observed in most polyploids (Raina et al., 1994; Leitch and Bennett, 1997).

In both *Acrostichum* species, the maximum number of nucleoli and CMA⁺ blocks were clearly correlated. For *A. danaeifolium*, there were four CMA⁺ bands in the metaphase chromosomes and interphase nuclei and up to four nucleoli per nucleus. A similar correlation occurred in *A. aureum*, with six CMA⁺ bands and a maximum of six nucleoli per nucleus. The large number of nuclei with a lower number of nucleoli may be related to the tendency of nucleoli to fuse (see, e.g., Moscone et al., 1995). In angiosperms, most nucleolus organizer regions (NORs) are CMA⁺/DAPI⁻ bands (Guerra, 2000), and the same seems to be true in *Acrostichum*. For other pteridophytes, apparently no previous karyological studies have been published using CMA/DAPI or silver nitrate staining.

In angiosperms, NORs are also correlated in number and size with secondary constrictions and sites of 45S rRNA genes. In pteridophytes, sites for 45S rRNA genes have been previously reported only in *Osmunda japonica* Thunb. (Kawakami et al., 1999) and in *Ceratopteris richardii* Brongn. (McGrath and Hickok, 1999), without indication about NORs or secondary constrictions. In *A. danaeifolium*, there were four secondary constrictions and four 45S rDNA sites; in *A. aureum* there also were four secondary constrictions but six 45S rDNA sites. This difference is probably due to the fact that 45S rDNA sites of a cell are not always active in *A. aureum* and some sites may be only rarely activated, resulting in a variable number of secondary constrictions. For example, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck has three 45S rDNA sites and a maximum of three nucleoli per cell, but only 2.5% of the metaphases exhibit three secondary constrictions (Pedrosa et al., 1997, 2000).

The meiotic analysis of both species of *Acrostichum* did not show any significant variation, even in sympatric populations. The anaphase bridge observed in a single individual of *A. aureum* is most probably due to an intraspecific polymorphism for a paracentric inversion. Therefore, in spite of the karyological, morphological, and ecological similarities between

both *Acrostichum* species, there was no morphological or meiotic evidence of interspecific hybridization, as was reported in specimens from the Dominican Republic by López (1978).

Our data suggest that cytogenetic differentiation between *A. danaeifolium* and *A. aureum* is limited to very small variations in chromosome morphology and structure. Considering that these two species are sympatric throughout a wide geographical region, occupy narrow ecological niches, and probably have a long history of reproductive isolation it is surprising that there are so few cytological differences between them. Probably, the reproductive isolation is based on genic rather than chromosomal barriers and the karyotypic orthoselection, common in many ferns, has conserved the basic karyotype in both species, even at the level of the distribution of heterochromatin and rDNA sites.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Leonardo Felix and George Baracho for help in field collections, Professor Dieter Schweizer, from Vienna University, for the SK18S + SK25S plasmids, and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), for financial help.

LITERATURE CITED

- Adams, D. C., and P. B. Tomlinson. 1979. *Acrostichum* in Florida. Amer. Fern J. 69:42–46.
- Dujardin, M., and J. P. Tilquin. 1971. IOPB chromosome numbers reports XXXIII. Taxon 20:609–614.

- Gottlob-McHugh, S. G. M. Lévesque, K. MacKenzie, M. Olson, O. Yarash, and D. A. Johnson. 1990. Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5S rDNA repeat structure in higher plants. *Genome* 33:486–494.
- Guerra, M. 1999. Hematoxylin: a simple, multiple-use dye for chromosome analysis. *Genet. Mol. Biol.* 22:77–80.
- Guerra, M. 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet. Mol. Biol.* 23:1029–1041.
- Kawakami, S. 1980. Karyomorphological studies on Japanese Pteridaceae II - *Pteris*, *Acrostichum*, *Cheilanthes*, *Onychium*. *Bull. Aichi Univ. Educ. (Nat. Sci.)* 29:129–150.
- Kawakami, S. 1982. Karyomorphological studies on Japanese Pteridaceae IV - Discussion. *Bull. Aichi Univ. Educ. (Nat. Sci.)* 31:175–186.
- Kawakami, S. M., K. Kondo, and S. Kawakami. 1999. Analysis of nucleolar organizer constitution by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in diploid and artificially produced haploid sporophytes of the fern *Osmunda japonica* (Osmundaceae). *Pl. Syst. Evol.* 216:325–331.
- Leitch, L. J., and M. D. Bennett. 1997. Polyploidy in angiosperms. *Trends Pl. Sci.* 2:470–476.
- Levan, A., K. Fredga, and A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201–220.
- López, I. G. 1978. Revision del genero *Acrostichum* en la Republica Dominicana. *Moscosa* 1:64–70.
- Lovis, J. D. 1977. Evolutionary patterns and processes in ferns. *Adv. Bot. Res.* 4:229–415.
- Manton, I., and W. A. Sledge. 1954. Observations of the cytology and taxonomy of the pteridophyte flora of Ceylon. *Philos. Trans., Ser. B* 238:127–185.

- McGrath, J. M., and L. G. Hickok. 1999. Multiple ribosomal RNA gene loci in the genome of the homosporous fern *Ceratopteris richardii*. *Canad. J. Bot.* 77:1199–1202.
- Moscone, E. A., J. Loidl, F. Ehrendorfer, and A. T. Hunziker. 1995. Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. *Amer. J. Bot.* 82:276–287.
- Moscone, E. A., M. A. Matzke, and A. J. M. Matzke. 1996. The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco. *Chromosoma* 105:231–236.
- Nakato, N. 1996. Notes on chromosomes of Japanese pteridophytes (4). *J. Jap. Bot.* 71:163–167.
- Pedrosa, A., M. Guerra, and W. Soares-Filho. 1997. An hierarchy of activation of nucleolar organizer regions in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Cytobios* 92:43–51.
- Pedrosa, A., D. Schweizer, and M. Guerra. 2000. Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Theor. Appl. Genet.* 100:361–367.
- Proctor, G. R. 1985. *Ferns of Jamaica – A Guide to the Pteridophytes*. British Museum (Natural History), London.
- Raina, S. N., A. Parida, K. K. Koul, S. S. Salimath, M. S. Bisth, V. Raja, and T. N. Khoshoo. 1994. Associated chromosomal DNA changes in polyploids. *Genome* 37:560–564.
- Roux, J. P. 1993. A new cytotype for *Acrostichum aureum*. *Bothalia* 23:75.
- Rufas, J. S., J. Giménez-Abián, J. A. Suja., and C. Garcia De La Vega. 1987. Chromosome organization in meiosis revealed by light microscope analysis of silver-staining cores. *Genome* 29:706–712.
- Schweizer, D., and P. F. Ambros. 1994. Chromosome banding. Pp. 97–112 in: J. R. Gosden (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 29. Humana Press, Totowa.

- Tryon, R. M., and A. F. Tryon. 1982. *Ferns and Allied Plants - with Special Reference to Tropical America*. Springer-Verlag, New York.
- Unfried, I., and P. Gruendler. 1990. Nucleotide sequence of the 5.8S and 25S rRNA genes and of the internal transcribed spacers from *Arabidopsis thaliana*. Nucl. Acids Res. 18:4011.
- Unfried, I., U. Stocker, and P. Gruendler. 1989. Nucleotide sequence of the 18S rRNA gene from *Arabidopsis thaliana* Co10. Nucl. Acids Res. 17:7513.
- Walker, T. G. 1966. A cytotaxonomic survey of the pteridophytes of Jamaica. Trans. Roy. Soc. Edinburgh 66:169–237.
- Walker, T. G. 1984. Chromosomes and evolution in pteridophytes. Pp. 103–141 in: A. K. Sharma and A. Sharma (eds.), *Chromosome Evolution of Eukaryotic Groups II*. CRC Press, Boca Raton.
- Walker, T. G. 1985. Cytotaxonomic studies of the ferns of Trinidad 2. The cytology and taxonomic implications. Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.), Bot. 13:149–249.

TABLE 1. List of *Acrostichum* samples analyzed, with provenance, voucher, and chromosome number.

Species	Provenance	Voucher	n	2n
<i>A. aureum</i>	Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco	ABMarcon et al. 208/27444		60
	Ipojuca, Pernambuco	ABMarcon et al. 267/27451	30	60
	Ipojuca, Pernambuco	—	30	
	João Pessoa, Paraíba	Cultivated, immature		60
	Rio Tinto, Paraíba	ABMarcon & GSBaracho 225/27446	30	60
<i>A. danaeifolium</i>	Areia, Paraíba	Cultivated, immature		60
	Bayeux, Paraíba	LPFelix 9367/27454		60
	Cajá, Paraíba	LPFelix 9369/27452		60
	Ipojuca, Pernambuco	Cultivated, immature	30	
	Itamaracá, Pernambuco	—		60
	João Pessoa, Paraíba	Cultivated, immature		60
	Juarez Távora, Paraíba	LPFelix 9368/27453		60
	Paulista, Pernambuco	ABMarcon & GSBaracho 221/25077	30	
	Paulista, Pernambuco	ABMarcon & GSBaracho 223/25078	30	60
	Recife, Pernambuco	Cultivated, immature		60
	Rio Tinto, Paraíba	ABMarcon & GSBaracho 228/27447	30	60
	Utinga, Bahia	ABMarcon et al. 263/27445		60

TABLE 2. Comparison between chromosome pairs of *Acrostichum aureum* and *A. danaeifolium*, ordered from the largest to the smallest. s, short arm; l, long arm; t, total length; ci, centromeric index (short arm/total length x 100); T, telomeric, ST, subtelomeric; SM, submetacentric; M, metacentric.

<i>A. aureum</i>				<i>A. danaeifolium</i>			
Pair	Measurements (l+s=t)	ci	Type	Pair	Measurements (l+s=t)	ci	Type
1	7.19+0.90=8.09	11.12	T	1	6.80+1.24=8.04	15.42	ST
2	6.59+1.01=7.60	13.29	ST	2	6.37+1.53=7.90	19.37	ST
3	5.06+2.42=7.48	32.35	SM	3	7.27+0.62=7.89	7.86	T
4	6.31+0.90=7.21	12.48	ST	4	4.89+2.77=7.66	36.16	SM
5	5.83+1.27=7.10	17.89	ST	5	5.53+1.78=7.31	24.35	ST
6	5.69+1.38=7.07	19.52	ST	6	5.76+1.45=7.21	20.11	ST
7	5.58+1.46=7.04	20.74	ST	7	6.99+0.00=6.99	0.00	T
8	6.22+0.74=6.96	10.63	T	8	5.34+1.59=6.93	22.94	ST
9	6.31+0.55=6.86	8.02	T	9	5.77+1.08=6.85	15.77	ST
10	5.76+1.08=6.84	15.78	ST	10	5.06+1.57=6.63	23.68	ST
11	6.13+0.55=6.68	8.23	T	11	5.41+1.15=6.56	17.53	ST
12	5.62+0.97=6.59	14.72	ST	12	5.62+0.90=6.52	13.80	ST
13	5.41+1.11=6.52	17.02	ST	13	5.02+1.45=6.47	22.41	ST
14	5.06+1.38=6.44	21.43	ST	14	4.58+1.80=6.38	28.21	SM
15	4.99+1.43=6.42	22.27	ST	15	5.00+1.35=6.35	21.26	ST
16	5.83+0.48=6.31	7.61	T	16	5.16+1.18=6.34	18.61	ST
17	5.37+0.83=6.20	13.39	ST	17	5.20+1.11=6.31	17.59	ST

TABLE 2 (continued)

<i>A. aureum</i>				<i>A. danaeifolium</i>			
Pair	Measurements (l+s=t)	ci	Type	Pair	Measurements (l+s=t)	ci	Type
18	5.20+0.98=6.18	15.86	ST	18	6.24+0.00=6.24	0.00	T
19	5.13+0.97=6.10	15.90	ST	19	6.13 +0.00=6.13	0.00	T
20	5.41+0.62=6.03	10.28	T	20	4.79+1.30=6.09	21.35	ST
21	4.79+1.18=5.97	19.76	ST	21	5.27+0.69=5.96	11.58	T
22	4.91+0.97=5.88	16.50	ST	22	4.37+1.59=5.96	26.68	SM
23	5.13+0.55=5.68	9.68	T	23	4.72+1.13=5.85	19.32	ST
24	4.16+1.45=5.61	25.85	SM	24	5.76+0.00=5.76	0.00	T
25	4.94+0.76=5.70	13.33	ST	25	5.09+0.55=5.64	9.75	T
26	4.65+0.90=5.55	16.22	ST	26	3.19+2.20=5.39	40.82	M
27	5.42+0.00=5.42	0.00	T	27	4.44+0.90=5.34	16.85	ST
28	4.17+0.83=5.00	16.60	ST	28	4.37+0.83=5.20	15.96	ST
29	3.05+2.08=5.13	40.54	M	29	4.47+0.69=5.16	13.37	ST
30	4.22+0.69=4.91	14.05	ST	30	5.06+0.00=5.06	0.00	T

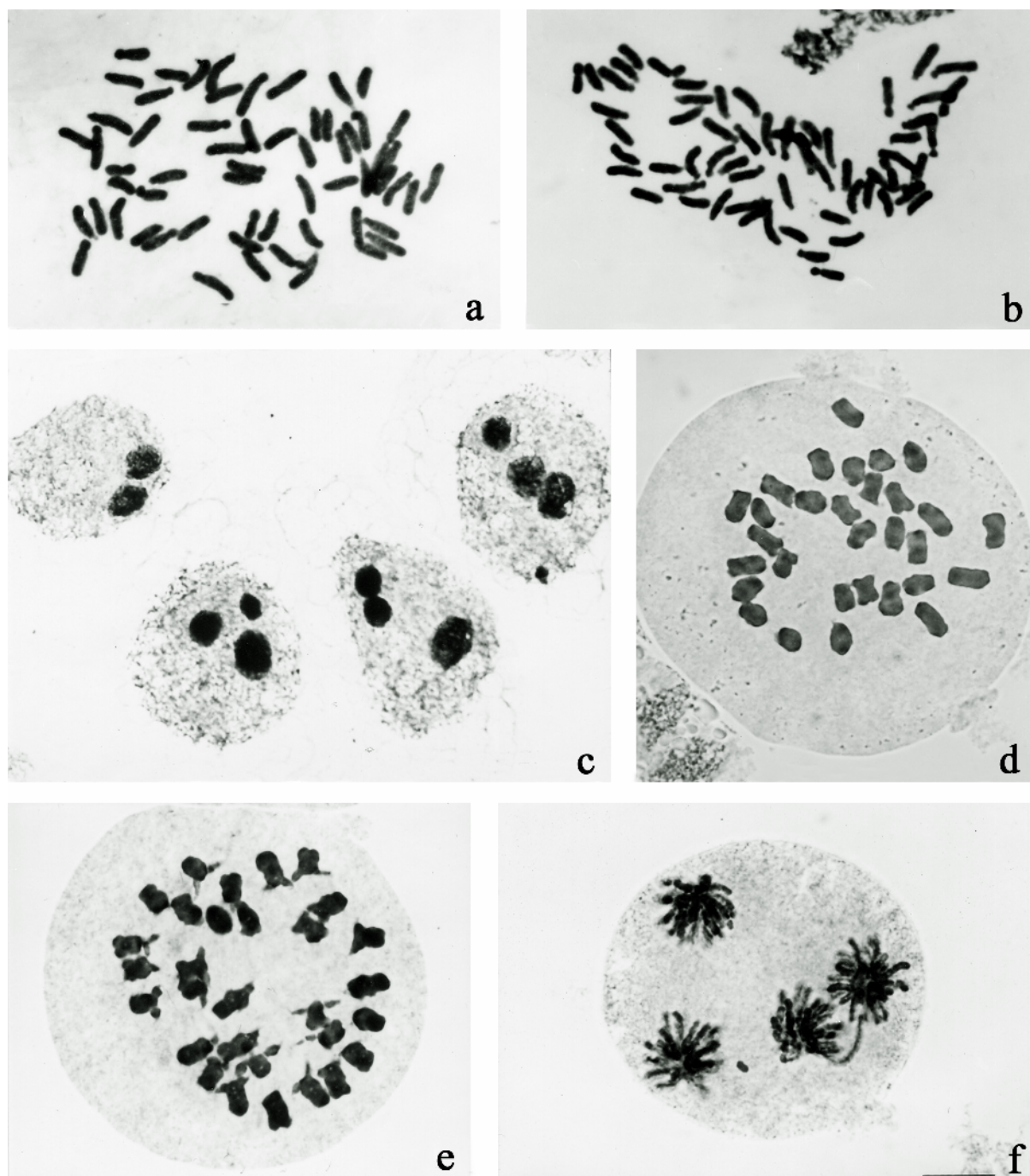


FIG. 1. Mitotic metaphase, nucleolus number, and meiotic behaviour in *Acrostichum*. **a, b.** Giemsa-stained mitotic metaphase of *A. danaeifolium* (**a**) and *A. aureum* (**b**). **c.** Silver-stained nuclei with 2–4 nucleoli in *A. danaeifolium*. **d, e, f.** Carmin-stained meiocytes with 30 bivalents in *A. danaeifolium* (**d**) and *A. aureum* (**e**) and a chromosome bridge with fragment in a later anaphase II of *A. aureum* (**f**). Bar represents 10 μm . Note in **e** the achiasmatic short arms of some acrocentric chromosomes.

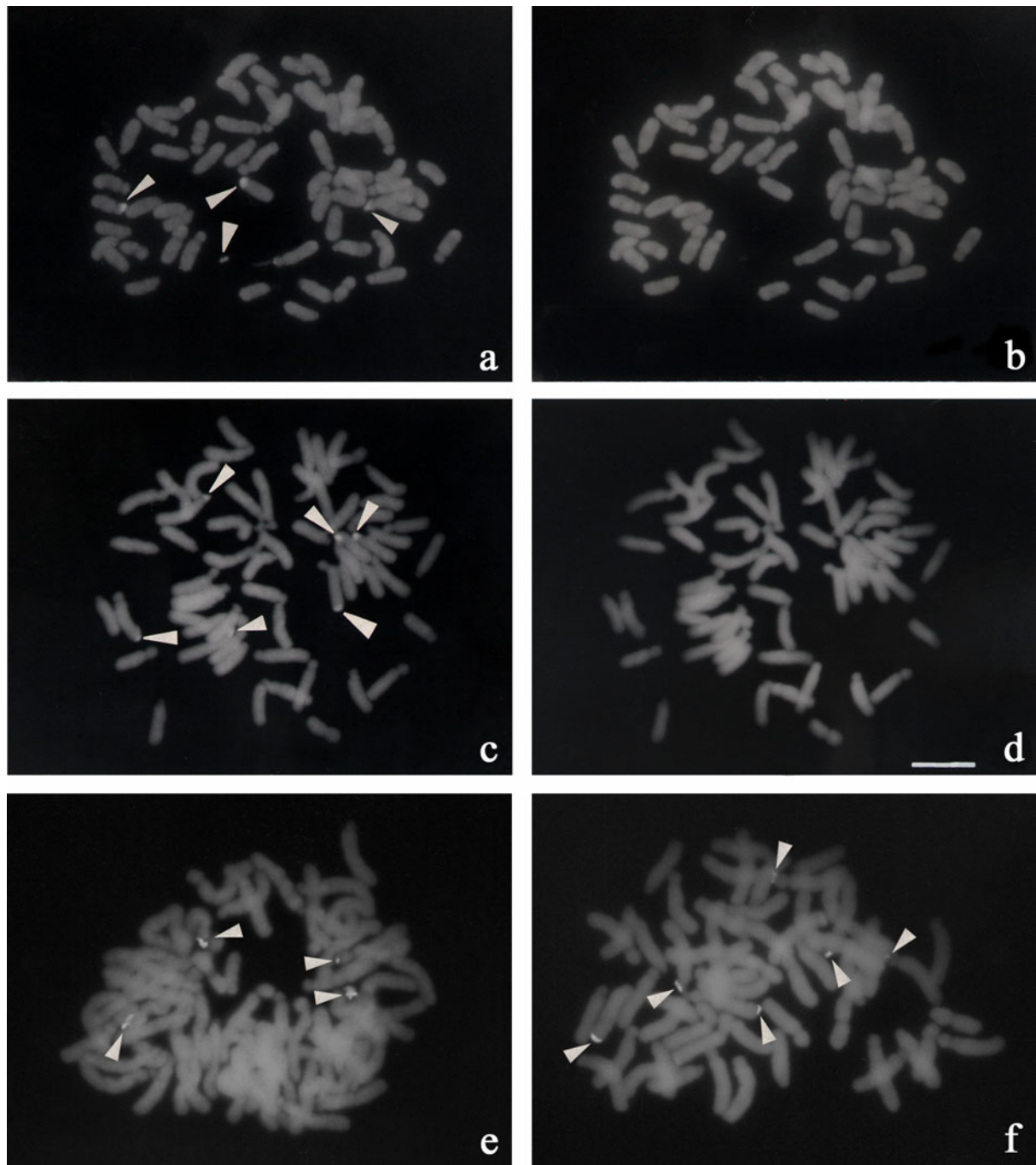


FIG. 2. CMA/DAPI bands and 45S rDNA sites in *Acrostichum danaeifolium* (a, c, e) and *A. aureum* (b, d, f). Arrows in a, c point to CMA⁺ bands that are negatively stained with DAPI (b, d). Arrows in e, f indicate rDNA sites. Bars represent 10 μ m. CMA/DAPI photographs (a, b, c, d) are in a different magnification in relation to FISH photographs (e, f).

5. CONCLUSÕES

- 1) Entre os indivíduos de *Acrostichum aureum* L. e *A. danaeifolium* Langsd. & Fisch. analisados, não foram observadas variações numéricas como a poliploidia e a aneuploidia, reportadas em outras populações de *A. aureum*.
- 2) A análise cariotípica convencional distingue as duas espécies por pequenas variações na morfologia cromossômica, sendo a fórmula cariotípica de *A. aureum* $2m+4sm+38st+16t$ e a de *A. danaeifolium* $2m+10sm+42st+6t$.
- 3) O bandeamento com o fluorocromo CMA revelou uma diferença cariotípica adicional entre essas espécies, havendo seis bandas CMA⁺ em *A. aureum* e quatro bandas em *A. danaeifolium*.
- 4) A hibridização *in situ* com o DNAr 45S coincidiu com o número de bandas CMA⁺ nas duas espécies, sugerindo que os sítios de DNAr 45S em *Acrostichum* são ricos em GC.
- 5) Mesmo não sendo possível a visualização das regiões organizadoras do nucléolo (RONs) através da coloração com nitrato de prata, a análise do número de nucléolos por núcleo, e dos sítios de DNAr sugerem que muito raramente todas as RONs são ativadas a cada divisão.
- 6) A análise meiótica de indivíduos simpátricos das duas espécies, revelou um pareamento meiótico normal, sugerindo a não ocorrência de híbridos nas populações investigadas.

6. RESUMO

Acrostichum aureum L. e *A. danaeifolium* Langsd. & Fisch. são espécies morfológicamente similares que crescem em simpatria em comunidades de mangue. Com o objetivo de avaliar as diferenças citológicas entre ambas as espécies, foram analisados seus cariótipos através da análise cromossômica convencional, da coloração com os fluorocromos CMA e DAPI, da coloração com nitrato de prata e da hibridização *in situ* utilizando como sonda o DNAr 45S. Ambas as espécies mostraram o mesmo número cromossômico ($2n=60$) mas diferiram na morfologia cromossômica. *Acrostichum aureum* apresentou a fórmula cariotípica $2m+4sm+38st+16t$ e *A. danaeifolium* $2m+10sm+42st+6t$. O padrão de bandas CMA⁺ mostrou somente quatro bandas terminais em *A. danaeifolium* e seis em *A. aureum*. Bandas DAPI⁺ não foram encontradas. O número máximo de nucléolo por núcleo interfásico e o número de sítios de DNAr 45S foram compatíveis com o número de bandas CMA⁺: quatro em *A. danaeifolium* e seis em *A. aureum*. Todos os indivíduos analisados meioticamente mostraram pareamento cromossômico normal (30^{II}) e segregação. Esses resultados sugerem que essas espécies mostrem pequenas, mas bem definidas, diferenças cariotípicas e apesar de suas similaridades morfológicas e ecológicas, elas parecem ser reprodutivamente isoladas.

7. ABSTRACT

Acrostichum aureum L. and *A. danaeifolium* Langsd. & Fisch. are morphologically similar species which grow sympatrically in mangrove communities. With the purpose to evaluate cytological differences between both species, their karyotypes were analysed using conventional chromosome staining technique, CMA and DAPI fluorochrome staining, silver nitrate staining and *in situ* hybridization, with 45S rDNA as probe. Both species showed the same chromosome number ($2n=60$) but differed in the chromosome morphology. *Acrostichum aureum* exhibited the karyotype formula $2m+4sm+38st+16t$ and *A. danaeifolium* showed the formula $2m+10sm+42st+6t$. The CMA⁺ banding pattern was only four terminal bands in *A. danaeifolium* and six in *A. aureum*. DAPI⁺ bands were not found. The maximum number of nucleoli per interphase nucleus and the number of 45S rDNA sites was consistent with the number of CMA⁺ bands: four in *A. danaeifolium* and six in *A. aureum*. All the meiotically analysed individuals showed normal chromosome pairing (30^{II}) and segregation. These results suggest that these species show few, but well defined karyotypic differences and despite their morphological and ecological similarities, they seem to be reproductively well isolated.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO 1



Fig. 1. População de *Acrostichum*. Indivíduos reunidos em touceira, crescendo em solos alagadiços e úmidos de mangues (a) e em locais intermediários entre mangue e restinga (b).



Fig. 2. Detalhes das frondes de *Acrostichum aureum* e *A. danaeifolium*. Fronde fértil de *Acrostichum danaeifolium* (a) e *A. aureum* (b), evidenciando a quantidade de pinas férteis; fronde estéril de *A. danaeifolium* (c1) e *A. aureum* (c2); detalhe do pecíolo em *A. danaeifolium* (d1) e *A. aureum* (d2). Setas indicam as pinas abortivas em *A. aureum*.

8.2. ANEXO 2

AFS FERN JOURNAL

INFORMATION FOR AUTHORS

Authors are encouraged to submit manuscripts pertinent to pteridology for publication in the American Fern Journal. Manuscripts should be sent to the editor:

R. James Hickey
Botany Dept.
Miami University
Oxford, OH 45056
hickeyrj@muohio.edu

Acceptance of papers for publication depends on merit as judged by two or more referees. Authors are encouraged to contribute toward publishing costs; however, the payment or non-payment of page charges will affect neither the acceptability of manuscripts nor the date of publication.

Authors should adhere to the following guidelines; manuscripts not so prepared may be returned for revision prior to review. Submit manuscripts in triplicate (xeroopies acceptable), include review copies of illustrations and originals of illustrations. After review, submission of final versions of manuscripts on diskette (Mac- or PC-compatible formats) is strongly encouraged although final text and tables can be sent electronically (as e-mail attachments). Use standard 8.5 by 11 inch paper of good quality, not "erasable" paper.

Double space manuscripts throughout, including title, author's names and full addresses, short , informative abstract, text (including heads and keys), literature cited, tables (separate from text), and figure captions (grouped as consecutive paragraphs separate from figures). Arrange parts of manuscript in order just given. Include author's name and page number in the upper right corner of every sheet. Provide margins of at least one inch (25 mm) all around on typed pages. Do not submit right-justified text, avoid footnotes, and do not break words at end of lines. Make table headings and figure captions self-explanatory. Use S.I. (metric) units for all measures (e.g., distance, elevation, weight) unless quoted or cited from another source (e.g., specimen citations). for nomenclatural matter (i.e., synonymy and typification), use one paragraph per basionym (see *Regnum Veg.* 58:39-40. 1968). Abbreviate titles according to *Botanico-Periodicum-Huntianum* (Lawrence et al., 1968, Hunt Botanical Library, Pittsburgh) and its supplement (1991). References cited only as part of

nomenclatural matter are not included in literature cited. For shorter notes and reviews, omit the abstract and put all references parenthetically in text. Use Index Herbariorum (Regnum Veg. 120:1-693. 1990; or <http://websun.nybg.org/bsci/ih/>) for designations of herbaria.

Illustrations should be proportioned to fit page width with caption ultimately to be included on the same page. Provide margins of at least 25 mm on all illustrations. For continuous-tone illustrations, design originals for reproduction without reduction or by uniform amount. In composite blocks, abut edges of adjacent photographs. Avoid combining continuous-tone and line-copy in single illustrations or blocks. Coordinate sequence and numbering of figures (and tables), with order of citation in text. Explain scales and symbols in figures themselves, not in captions. Include a scale and reference to latitude and longitude in each map.

Proofs and reprint order forms are sent to authors by the printer. Authors should send corrected proofs to the editor and reprint orders to the printer. Authors will be assessed charges for extensive alterations made after type has been set.

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). Occasionally, departure from these guidelines may be justified. Authors are encouraged to consult the editor for assistance with any aspect of manuscript preparation.

Papers of longer than 32 printed pages may be sent to the Editor of Pteridologia (memoir Editor, see journal cover page 2).