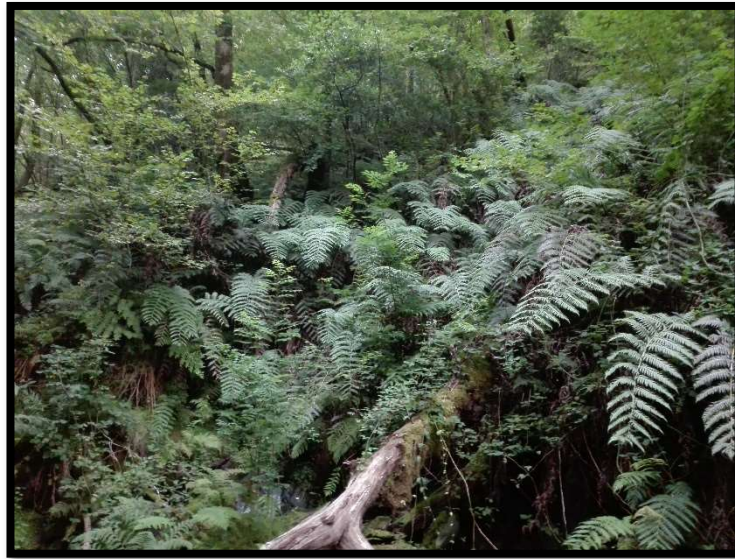




UNIVERSIDADE DA CORUÑA

## Grao en Bioloxía

### Memoria do Traballo de Fin de Grao



**Os feitos relictos do Terciario en Galicia: Análise filoxenética e estudo ecolóxico de poboacións de *Culcita macrocarpa* Presl. na Península Ibérica**

**Los helechos del Terciario en Galicia: Análisis filogenético y estudio ecológico de las poblaciones de *Culcita macrocarpa* Presl. en la Península Ibérica**

**Tertiary relict ferns in Galicia: Phylogenetic analysis and ecological study of Iberian *Culcita macrocarpa* Presl. populations**

**Eva Martínez Veiga**

Xuño, 2020

*Directores Académicos: Dr. Manuel Pimentel Pereira  
Dra. Elvira Sahuquillo Balbuena*

## **TRABALLO DE FIN DE GRAO**

Manuel Pimentel Pereira e Elvira Sahuquillo Balbuena autorizan a presentación do Traballo de Fin de Grao “Análise filoxenética e estudo ecolóxico de poboacións de *Culcita macrocarpa* Presl. na Península Ibérica” presentado por Eva Martínez Veiga para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

A Coruña, a 23 de Xuño de 2020

Asdo.: Dr. Manuel Pimentel Pereira

Asdo.: Elvira Sahuquillo Balbuena

## ÍNDICE

Resumo/Abstract .....	4
Introdución .....	5
Obxectivos .....	9
Material e Métodos .....	10
A.-Estudo das relacións filoxenéticas .....	10
A.1.-Obtención das secuencias e elaboración das matrices de datos .....	10
A.2.-Análises filoxenéticas .....	10
B.-Estudo piloto da análise da capacidade de xermolación das esporas .....	11
B.1.-Obtención do material vexetal .....	11
B.2.-Cultivo in vitro das esporas .....	12
B.3.-Estimación da taxa de viabilidade .....	12
Resultados .....	14
A.-Análise filoxenética .....	14
B.-Análise da viabilidade das esporas ( <i>fitness</i> ) .....	17
Discusión .....	19
Conclusións/Conclusions .....	22
Bibliografía .....	23
Anexos .....	28

## Resumo

Os feitos relictos do Terciario son un grupo amplo de especies que na actualidade habitan en refuxios onde as condicións ambientais seguen a ser favorables para elas. Na actualidade, están ameazadas en distinto grao debido á desaparición paulatina dos seus hábitat pola acción antrópica. Neste traballo estúdase se os feitos relictos forman un grupo homoxéneo a través da análise da súa posición na árbore filoxenética da clase *Polypodiopsida*. Asemade, realízase un estudo piloto na especie relictada ameazada *Culcita macrocarpa*, relacionando a *fitness* dos individuos de dúas localidades, estimada mediante a capacidade xerminativa das esporas, coas características poboacionais. Os resultados amosan que os feitos relictos forman un grupo heteroxéneo a pesar de atoparse en hábitats comúns. Ademais, o estudo piloto indica que existen diferenzas claras na *fitness* entre as poboacións de *C. macrocarpa*. A metodoloxía aplicada sería, *a priori*, acaída para analizar as variacións de *fitness* entre os distintos feitos relictos do Terciario.

**Palabras Clave:** *Culcita macrocarpa* Presl., Fieito relictado, Filoxenia, *Fitness*, Viabilidade esporal

## Abstract

Tertiary relict ferns are a large group of species that currently live in shelter areas where environmental conditions continue to be favorable to them. These species are generally threatened due to habitat loss and degradation. Here, we build a phylogeny of the *Polypodiopsida* to assess whether relict fern species form a homogeneous group. In addition to this, we conduct a preliminary study on the relationship between population characteristics and fitness -measured as spore viability- in two *Culcita macrocarpa* Presl. populations. Our results show that Iberian Tertiary relict ferns form a heterogeneous group despite their ecological similarities. Also, we have observed clear differences in fitness between two *C. macrocarpa* populations. Finally, we consider that the methodology used could be suitable to analyse the conservation status of other relict ferns.

**Keywords:** *Culcita macrocarpa* Presl., Fitness, Phylogeny, Relict Fern, Spore viability.

## Introdución

As especies relictas do Terciario son aquelas que quedaron illadas en refuxios onde as condicións climáticas permitiron a súa supervivencia ante os pasados eventos de cambio climático, moi particularmente as glaciacións do Pleistoceno (Milne & Abbott, 2002).

A distribución actual das especies relictas terciarias é consecuencia directa da aridificación e arrefriamento que sufriu a Terra durante o Mioceno, o que levou ao retroceso dos bosques tropicais perimediterráneos e á extinción de moitos taxóns Lauróides (Delgado & Plaza, 2016). As glaciacións do Pleistoceno (2,59 Millóns de anos/Ma – 10000 anos), que deron como resultado o clima actual, intensificaron ditos efectos, minguando máis os hábitats adecuados para estas especies. Na actualidade, os últimos remanentes destes bosques de Laurisilva atópanse nos arquipélagos das Canarias, Azores e Madeira (Barrón 2003, Axelrod 1975). Asemade, moitos taxóns relictos sobreviviron ós períodos glaciais en numerosos núcleos disxuntos repartidos pola Península Ibérica, Norte de África, Sur de Italia e a Rexión Balcano-Exea. Ditas especies viven acantonadas en zonas costeiras e húmidas, sen poder avanzar cara o norte debido ao frío nin cara o sur pola aridez (Rodríguez Sánchez & Arroyo, 2008), entre elas numerosos feitos (Cranfill & Kato, 2003) actualmente relegados a pequenas localidades primeiramente nas illas Macaronésicas e na Península Ibérica (Barrón, 2003; Rodríguez Sánchez & Arroyo, 2008).

Se ben os feitos supoñen unha porcentaxe moi baixa da flora vascular na Península Ibérica e unicamente un 2,8% das especies na flora galega (Amigo, 2005), estas liñaxes están claramente sobre-representadas nas listas vermellas e catálogos de especies protexidas (Amigo, 2005). Isto é especialmente certo para aquelas especies de óptimo tropical/subtropical e carácter relicto, que vense atinxidas pola forte redución e fragmentación do seu hábitat por cambios no uso do territorio e o efecto do cambio climático (Delgado & Plaza, 2016). Na Táboa 1 indícanse as especies de feitos relictos da Flora Ibérica que soportan un maior grao de ameaza.

Especies	Familia	Estatus de Conservación	Referencia
<i>Culcita macrocarpa</i> C.Presl	Culcitaceae	Perigo Crítico de Extinción	Lista Vermella da flora vascular de España
<i>Hymenophyllum tunbrigensis</i> (Wild) G.Kunkel	Hymenophyllaceae	Vulnerable	Lista Vermella da flora vascular de España
<i>Hymenophyllum wilsonii</i> (L.) Sm		Perigo Crítico de Extinción	Lista Vermella da flora vascular de España
<i>Vandenboschia speciosa</i> Fée		Vulnerable	Lista Vermella da flora vascular de España
<i>Davallia canariensis</i> (L.) Sm	Davalliaceae	Vulnerable	Catálogo Rexional de Especies Ameazadas da Flora do Principado de Asturias
<i>Woodwardia radicans</i> (L.) Sm	Blechnaceae	Vulnerable	Catálogo galego de especies ameazadas
<i>Dryopteris aemula</i> (Ait.) Kuntze	Dryopteridiaceae	Vulnerable	Lista Vermella da flora vascular de España
<i>Dryopteris guanchica</i> Gibby&Jermy		Vulnerable	Lista Vermella da flora vascular de España
<i>Diplazium caudatum</i> (Cav.) Jermy	Athyriaceae	Vulnerable	Lista Vermella da flora vascular de España

Táboa 1. Listaxe de feitos relictos co seu estado de conservación (Moreno, 2010; <https://www.xunta.gal/>; <https://movil.asturias.es/>).

A familia subcosmopolita *Hymenophyllaceae* inclúe 436 especies de pequenos feitos epífitos, saxícolas e terrestres que viven en ambientes moi húmidos (Hennequin *et al.*, 2010; Vasques *et al.*, 2019). Esta familia está representada no territorio ibérico por tres especies, *Himenophyllum tunbrigense*, *H. wilsonii* (Fig. 1) e *Vandenboschia speciosa* (Fig. 2). O xénero *Hymenophyllum* ten unha distribución moi ampla en zonas cálidas e tropicais, mais estas dúas especies habitan en áreas temperadas-subtropicais como as illas da Macaronesia e o NW de Europa.

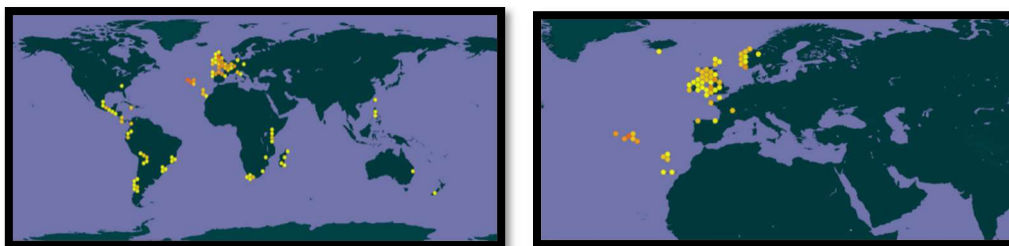


Figura 1: Mapas GBIF(13/4/20) coa distribución de *H.tunnbringense* (esquerda) e de *H.wilsonii* (dereita).

*Vandenboschia speciosa* é un relicto Macaronésico-Europeo (Barrón & Peyrot, 2006) cuxa distribución abrangue a Península Ibérica, o norte de Italia, Francia, Alemaña, Illas Británicas e Macaronésicas (Fig. 2). Tamén se rexistran poboacións en Cuba, Madagascar, Indonesia e o centro de China, áreas alleas á distribución desta especie e que poderían sinalar introducións recentes (GBIF; Rumsey *et al*, 1998).



Figura 2 : Mapa GBIF(13/4/20) coa distribución de *V. Speciosa*.

*Davallia canariensis* pertence á familia *Davalliaceae*, que contén 65 especies (Smith *et al*, 2006) distribuídas no trópico e subtropical do Vello Mundo (Copeland, 1927). A distribución de *D. canariensis* é máis reducida, cinguíndose á Península Ibérica, Canarias, Azores, Madeira, costa de Marrocos, Cabo Verde, costa de Senegal e de Mauritania. Rexístranse tamén poboación na costa de Sudáfrica, norte de Colombia, Alemaña, Suecia e Países Baixos, que reflicten recentes introducións deste taxón (Fig. 3).



Figura 3 : Mapa GBIF(13/4/20) coas citas de *D. canariensis*.

As familias *Blechnaceae* e *Dryopteridaceae* cóntanse entre as máis diversas dentro dos feitos da Clase *Polypodiopsida* (265 e 2115 especies, respectivamente). Ambas son subcosmopolitas pero difiren nos seus centros de máxima diversidade. No caso das *Blechnaceae* é Australasia-Oceanía e o Neotrópico, con numerosos endemismos nestas áreas (Dittrich *et al.*, 2017). As *Dryopteridaceae* son un grupo fundamentalmente pantropical con numerosas especies que avanza cara as rexións temperadas (Tryon & Tryon 1982; Kramer *et al.*, 1990). Dentro destas familias, *Woodwardia radicans* (*Blechnaceae*) habita diversas zonas da Península Ibérica, as illas Macaronésicas e o sur

de Italia (Fig. 4). Trátase dunha especie nemoral estreitamente relacionada con taxóns do L de Asia e de N América (De Gasper, *et al.*, 2016).



Figura 4 : Mapa GBIF(13/4/20) da distribución de *W. radicans*.

Dentro das *Dryopteridaceae*, as especies *Dryopteris aemula* e *D. guanchica* (Liu *et al.*, 2007; Fig. 5) son representativas da flora atlántico-macaronésica. *Dryopteris aemula* é unha especie diploide que medra tamén en áreas do W de Europa como as Illas Británicas ou o Occidente de Francia (Juslén *et al.*, 2011). *Dryopteris guanchica*, un alotetraploide que ten entre os seus parentais a *D. aemula* (Juslén *et al.*, 2011), presenta unha distribución máis restrinxida (Fig. 5).



Figura 5 : Mapas GBIF(13/4/20) coa distribución de *D. aemula* (esquerda) e *D. guanchica* (dereita).

Outro endemismo Europeo-Macaronésico relicto do Terciario é *Diplazium caudatum* pertencente a cosmopolita familia *Athyriaceae* que engloba aproximadamente 230 especies (Rothfels *et al.*, 2012; PPG I, 2016). Este feito habita en sotobosques da Laurisilva e barrancos con solos e clima húmido sempre con temperaturas elevadas. Na actualidade, como vemos na Figura 6, atópase en zonas consideradas refuxios climáticos (Rumsey *et al.*, 2005) como son as illas Canarias, Madeira, Azores, no sur da Península Ibérica (Serra de Algeciras, Cádiz) e na illa de Santo Antão en Cabo verde (Blanca, 1999; Delgado & Plaza, 2006; Moya *et al.*, 2010). Os núcleos non Ibero-Macaronésicos da Fig. 6 trátanse, unha vez máis, de introducións recentes.



Figura 6 : Mapa GBIF(13/4/20) da distribución de *D. caudatum*.

Por último, a familia *Culcitaceae* constitúe un grupo monofilético integrado por un xénero, *Culcita*, que inclúe dúas especies actuais e unha fósil (Christenhusz *et al.*, 2011). *Culcita remberi* é un fósil do Mioceno (16-15.4 Ma) (Pison *et al.*, 2018), namentres *C. conifolia* e *C. macrocarpa* son as especies actuais. *Culcita conifolia* distribúese en

bosques chuviosos montanos e submontanos cálidos do centro e sur de América, incluíndo illas como Jamaica, Cuba e A Española (Large & Braggins 2004, Fig. 7). *Culcita macrocarpa* vive, a baixa altitude (350m), en bosques temperados e húmidos no noroeste da Península Ibérica, sur de Andalucía, e nas illas da Macaronésia (Kessler *et al.*, 2018; Fig. 7).

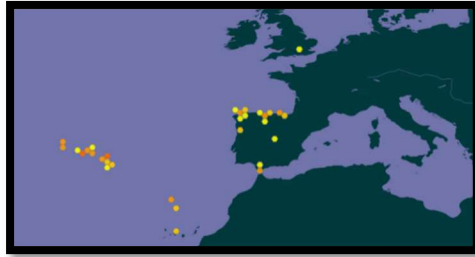


Figura 7 : Mapa GBIF (13/4/20) da distribución de *C. macrocarpa*.

*Culcita macrocarpa* rexistra unha variedade xenética moi baixa nas súas poboacións, o que pode atribuírse á fragmentación e redución das súas poboacións (Delgado & Plaza, 2019). O illamento dos individuos, intensificado pola degradación do seu hábitat, unido ao empobrecemento xenético fan desta unha especie moi vulnerable ante ameazas como o cambio climático (Quintanilla *et al.*, 2007).

Os feitos viven preferentemente en medios moi húmidos e estables, sombreados pola presenza de anxiospermas arbóreas, o que favorece os seus procesos de reprodución sexual (Sharpe & Mehlreter, 2010). A conservación dos hábitats será esencial para preservar as especies desta liñaxe (Brummitt *et al.*, 2016). A alteración e fragmentación dos bosques naturais (e.g., plantación intensiva de eucalipto en Galicia, usos agrícolas) leva á redución xeral do tamaño das poboacións e, como consecuencia, pode producirse unha erosión xenética que atinxe á *fitness* dos individuos (Quintanilla *et al.*, 2007). Os feitos relictos, como grupo de especial vulnerabilidade e importancia na Península Ibérica e en Galicia, non serán unha excepción. Porén, será importante tamén atender ás características particulares das especies, xa que as respostas ante as distintas ameazas son en boa medida especie-específicas (Pucko *et al.*, 2011).

Realizar estudos que combinen a análise filoxenética/bioxeográfica dos grupos coa análise do estado de conservación das poboacións é imprescindible para entender a situación actual das especies. Asemade, os resultados obtidos no noso traballo que combina a análise filoxenética cun estudio da *fitness*, medida mediante parámetros relacionados coa supervivencia e fecundidade das esporas (Quintanilla & Escudero, 2006), en concreto de *C. macrocarpa*, serán importantes para deseñar estratexias de conservación para esta especie.



## Obxectivos

Este estudo encádrase na bioloxía da conservación de feitos relictos terciarios presentes na Península Ibérica, concretamente daqueles que están incluídos nalgunha figura de protección (Táboa 1). Os obxectivos específicos son os seguintes:

-Analizar a posición filoxenética dos feitos relictos analizados dentro da Clase *Polypodiopsida*, co gallo de verificar se se trata dun grupo homoxéneo ou non. Tentarase tamén de analizar, de xeito preliminar, as súas afinidades bioxeográficas.

- Analizar a posible existencia de diferenzas na *fitness* reprodutiva entre 2 poboacións de *Culcita macrocarpa*. Trátase dunha análise preliminar para poñer a punto un método que podería ser extendido ás restantes especies de feitos relictos incluídos no traballo. No caso de detectarse diferenzas, tentarase buscar posibles causas entre as características das poboacións analizadas.

## Material e Métodos

### A.-Estudo das relacións filoxenéticas

#### A.1.-Obtención das secuencias e elaboración das matrices de datos

Para a realización deste estudo seleccionáronse as secuencias de 3 xenes cloroplásticos (atpB, rbcL e rps4) por seren os máis empregados nas análises filoxenéticas (Chunxiang *et al.*, 2011). As especies de feitos seleccionadas na análise cubren á maioría das familias da Clase *Polypodiopsida* tomando como referencia o traballo de Qi *et al.*, (2018). Seleccionáronse 3 especies como grupos externos (Qi *et al.*, 2018): *Laurus nobilis* L., *Equisetum vieriegatum* Schleich. ex F.Weber & D.Mohr. e *Ophioglossum reticulatum* L. Preparáronse tres matrices independentes, unha para cada xene empregado na filoxenia. As especies seleccionadas e o código das secuencias obtidas inclúense no Anexo I. Unha vez obtidas as matrices fíxose un pre-alinamento co algoritmo Clustal tal e como se implementa no programa Mega-X (Kumar *et al.*, 2018), co gallo de comprobar se as secuencias eran homólogas. Unha vez aliñadas confeccionouse un arquivo en formato fasta para cada unha das matrices de datos. As matrices definitivas dos xenes atpB e rps4 inclúen 98 e 93 secuencias, respectivamente, namentres que a do xene rbcL comprende 102 secuencias. A lonxitude das matrices é de 1827 bases no caso das matrices dos xenes atpB e rps4 e 1440 a do xene rbcL .

As análises filoxenéticas leváronse a cabo nas matrices individuais e tamén na matriz concatenada. A concatenación levouse a cabo ao non atoparse diferencias apoiadas estatisticamente entre as topoloxías individuais (Pirie *et al.*, 2009). A matriz concatenada, cunha lonxitude de 5094 bases, construíuse co software Mesquite (Maddison *et al.*, 2016). As secuencias ausentes foron substituídas por datos perdidos na concatenación. Finalmente, a matriz concatenada foi aliñada empregando o antes citado algoritmo Clustal implementado en Mega.

#### A.2.-Análises filoxenéticas

As análises filoxenéticas leváronse a cabo nas matrices individuais e na matriz global seguindo tres métodos: Máxima Parsimonia, Estatística Bayesiana e Máxima Verosimilitude. Empregáronse as tres metodoloxías co gallo de obter uns resultados coa maior fiabilidade posible.

As análises de máxima parsimonia realizáronse co programa PAUP\*4.0b10 (Swofford.,1998). A análise realiza unha procura heurística con 100 réplicas engadindo secuencias de maneira aleatoria (*random addition sequence replicates*) e emprega a permutación de pólas de tipo TBR (*Tree bisection reconnection*). Por último, a fiabilidade dos nodos da topoloxía estableceuse en base a unha análise *bootstrap* con 1000 replicas.

As análises bayesianas leváronse a cabo empregando o programa MrBayes-3.2.7a (Ronquist *et al.*, 2012). Este test estima a probabilidade *a posteriori* das distintas topoloxías posibles mediante o emprego das cadeas de Markov (MCMC). Foi necesario o establecemento de *priors* para dita análise, os cales conteñen a información previa que se ten das secuencias analizadas (Lemey *et al.*, 2009). A selección do modelo de evolución levouse a cabo empregando o programa MrModeltest 2.3 (Nylander., 2004). Concluíuse que o modelo de substitución máis acaído é o GTR (*General Time Reversible*)+I+G para todas as matrices. Para cada análise empregáronse 4 cadeas de Markov con 10.000.000 de xeracións, gardándose 1 topoloxía de cada 1.000. A converxencia das análises comprobouse empregando as medidas numéricas e gráficas

proporcionadas polo propio programa MrBayes. A comprobación repetiuse mediante o uso do programa Tracer v1.6 (Rambaut *et al.*, 2016. A análise co programa MrBayes realizouse no servidor *Cipres Science Gateway* (San Diego Supercomputer Center; (<https://www.phylo.org/portal2/login!input.action>, accedido nos días 14-05-20, 15-05-20 e 16-05-20).

A última das metodoloxías empregada foi a de Máxima Verosimilitude. De novo aplicouse o modelo GTR+I+G á análise, e a fiabilidade das pólas estimouse mediante o método *bootstrap* (1000 repeticións). Esta análise levouse a cabo tamén no *Cipres Science Gateway*. Todas as árbores resultantes dos distintos métodos foron editadas co programa FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2016).

### B.-Estudo piloto da análise da capacidade de xermolación das esporas

Para realizar este estudo preliminar empregáronse dúas poboacións de *C. macrocarpa* (Táboa 2): Rego de Cal de Viñas (Parque Natural das Fragas de Eume, Pontedeume, A Coruña) e Artike (Bermeo, Biscaia). As poboacións foron seleccionadas por ocupar un rango amplo na distribución ibérica da especie (extremo NE e NW da área de distribución). Ambas presentan tamaños de poboación reducidos e están situadas en áreas onde a vexetación natural atópase moi modificada.

A poboación C11 presenta moi poucos individuos (28) ao longo dunha canle moi pechada arrodeada por repoboacións de eucalipto e ciprés de Lawson. A poboación C4 (15 individuos), malia estar nunha zona protexida habita tamén nunha comunidade onde a vexetación natural está moi deturpada. A cobertura arbórea está composta principalmente por oliveira de Australia, eucalipto e exemplares de bidueiro.

Poboación	Localidade	Orientación	Individuos Totais Poboación	Data de Muestreo	Individuos Sementados	Data de Inicio do Cultivo
C4	Fraga Pequena (Rego de Cal de Viñas)	N-NW	15	22/01/2020	5	09/03/2020
C11	Artike (Euskadi)	E	28	29/01/2020	7	09/03/2020

Táboa 2: Descrición das 2 poboacións de *Culcita macrocarpa* incluídas no estudo.

#### B.1.-Obtención do material vexetal

As mostras foron recollidas nas poboacións naturais por persoal do laboratorio de Flora Vascular (Área Botánica, Fac. Ciencias) unha vez concedidos os permisos pertinentes. Na poboación C4 recolléronse 5 fragmentos de fronde correspondentes a outros tantos individuos, namentres que na C11 obtivéronse 7 fragmentos. Todos os espécimes portaban soros en estado axeitado de madurez (antes da apertura do soro; Fig.8) e foron trasladadas en sobres de papel ó laboratorio. As frondes colocáronse entre follas de papel de filtro de 75g/m<sup>2</sup>, cun lixeiro peso enriba durante unha semana, a T<sup>a</sup> ambiente, para estimular a maduración dos soros e a liberación das esporas. Tras ese período de tempo, filtráronse as esporas cunha peneira de 100µm de diámetro con gallo de eliminar restos vexetais como as paredes dos esporanxios. Finalmente, gardáronse as esporas en tubos de plástico etiquetados co n<sup>o</sup> da poboación no conxelador a -40°C ata o momento de iniciar o cultivo.



Figura 8: Fragmento de fronde de *Culcita macrocarpa* con soros maduros.

### B.2.-Cultivo *in vitro* das esporas

O cultivo das esporas realizouse en placas Petri nun medio mineral (Dyer, 1983) que inclúe os seguintes compostos:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,51 g/l);  $\text{KNO}_3$  (0,12 g/l);  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1,44 g/l);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,25 g/l);  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,017 g/l). Ademais a dito medio engadíuselle un 15% de agar máis 10 U/ml do antifúngico Nystatina disolta en 1ml de Dimetilsulfóxido (Dyer, 1983; Quintanilla *et al.*, 2002). O número de individuos dos que se cultivaron esporas inclúese na Táboa 2.

O primeiro paso no proceso de cultivo foi a dispersión das esporas (imprescindible para a súa posterior contaxe) en tubos eppendorf nos que se engadiu medio de cultivo líquido e unha pequena cantidade de deterxente PVP para evitar a hidrofobia das esporas. Logo envorcouse o contido de ditos tubos sobre as placas Petri e distribuíuse uniformemente empregando esferas de vidro estériles. Para a estimación da concentración de esporas sementadas realizáronse dilución seriadas e recontos de esporas mediante cámara de Neubauer. Sementáronse aproximadamente 7,5 mg de esporas por placa e individuo e incubáronse na cámara de cultivo a  $24,59^\circ\text{C} \pm 0,58^\circ\text{C}$ , cun fotoperíodo 16h/8h para a xermolación.

### B.3.-Estimación da taxa de viabilidade

A viabilidade esporal empregouse como aproximación á *fitness* das poboacións de *Culcita macrocarpa*. Escolleuse este parámetro por ser limitante no ciclo de vida dos feitos e por ofrecer facilidades para o seu estudo en laboratorio. Estimouse en dous momentos diferentes: (i), antes do inicio da xermolación das esporas (dous días despois do inicio da incubación) e (ii), 72 días despois do inicio da incubación, cando xa se pode asegurar que as esporas non xermoladas non son viables (Delgado & Plaza, 2016). O recuento fíxose coa axuda dun estereomicroscopio e observando un mínimo de 100 esporas por placa. No primeiro recuento estimouse a porcentaxe de esporas rotas, decoloradas ou malformadas, que foron consideradas non viables (Fig.9). No segundo recuento estimouse a porcentaxe de esporas inicialmente viables que ademais estaban xermoladas (Fig.10). Para considerar unha espóra como xermolada debe ter sufrido xa a súa primeira división, de xeito que haxa células protálicas que superen a parede da espóra (Quintanilla *et al.*,

2000). Se ben estaba previsto como parte do TFG realizar un seguimento das esporas máis exhaustivo, non foi posible polas medidas de confinamento impostas o 13 de marzo de 2020.



Figura 9: Imaxes de esporas non viables [Fernández (2019)]

Para determinar a existencia de diferenzas significativas entre os datos de xermolación das esporas de ambas poboacións realizouse unha análise exploratoria dos datos mediante o cálculo de distintos estatísticos (Media, Desviación estandar e o Intervalo de confianza). Asemade, construíronse gráficos tipo *box-plot*. Non se realizaron tests non paramétricos de comparación de medias polo baixo número de datos obtidos no estudo.

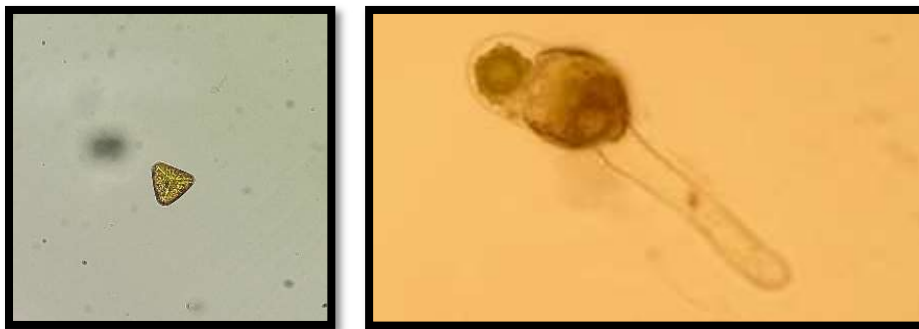


Figura 10: Imaxes dunha espóra viable (esquerda; autora: Eva Martínez) e outra xermolada [dereita, Fernández (2019)]

## Resultados

### A.-Análise filoxenética

Os resultados das 3 análises filoxenéticas (Máxima Parsimonia, Estatística Bayesiana e Máxima Verosimilitude) baseadas na concatenación das 3 rexións plastídicas (atpB, rbcL e rps4) non amosan diferenzas significativas na topoloxía, mais si nos valores de apoio estatístico. Seleccionouse para este traballo a árbore resultado da análise Bayesiana que contaba cun mellor apoio (superior en moitos casos ó 90%), presentaba un número menor de politomías e asemellábase máis ás filoxenias publicadas para os feitos *Polypodiopsida* (Qi *et al.*, 2018). A topoloxía obtida (Figs. 11 e 12) amosa unha clara diferenciación entre os 3 grupos externos (*Equisetum variegatum*, *Ophioglossum reticulatum* e *Laurus nobilis*) e o grupo interno constituído pola Clase *Polypodiopsida*. Dentro do grupo interno observamos 2 cladogramas principais ben diferenciados: i) clado dos feitos de diverxencia temperá e ii) clado dos feitos Eupoliploides.

-O clado dos feitos *Eupoliploides* (Fig. 11) conta cun apoio do 92.7% e abrangue a maior parte das especies relictas deste estudo (*Davallia canariensis*, *Dryopteris aemula*, *Dryopteris guanchica*, *Diplazium caudatum*, *Woodwardia radicans*). Este clado está a súa vez integrado por 2 subclados, que constitúen dous grupos monofiléticos (PP 100%): Eupoliploides I (Subcl. *Polypodiineae*) e Eupoliploides II (Subcl. *Aspleniinaeae*).

-O subclado dos feitos Eupoliploides I (Subcl. *Polypodiineae*) está integrado por 9 familias: *Tectariaceae*, *Dydimochlaneaceae*, *Lomariopsidiaceae*, *Nephrolepsidiaceae*, *Oleandraceae*, *Polypodiaceae*, *Davalliaceae*, *Dryopteridiaceae* e *Hypodematiaceae*. Destas familias só dúas inclúen especies relictas: A F. *Dryopteridiaceae*, cos relictos *Dryopteris guanchica* e *D. aemula* e a F. *Davalliaceae*, que inclúe o relicto do Terciario *Davallia canariensis* (PP> 90%).

-Ao subclado dos feitos Eupoliploides II pertencen 9 familias: *Blechnaceae*, *Cystodiaceae*, *Rachidosuraceae*, *Theypteridiaceae*, *Woodsiaceae*, *Onocleaceae*, *Athyriaceae*, *Aspleniaceae* e *Diplaziopsidiaceae*. Destas familias dúas presentan especies relictas. A F. *Blechnaceae*, co relicto *Woodwardia radicans* e a F. *Athyriaceae*, na cal atópase outro relicto, *Diplazium caudatum*.

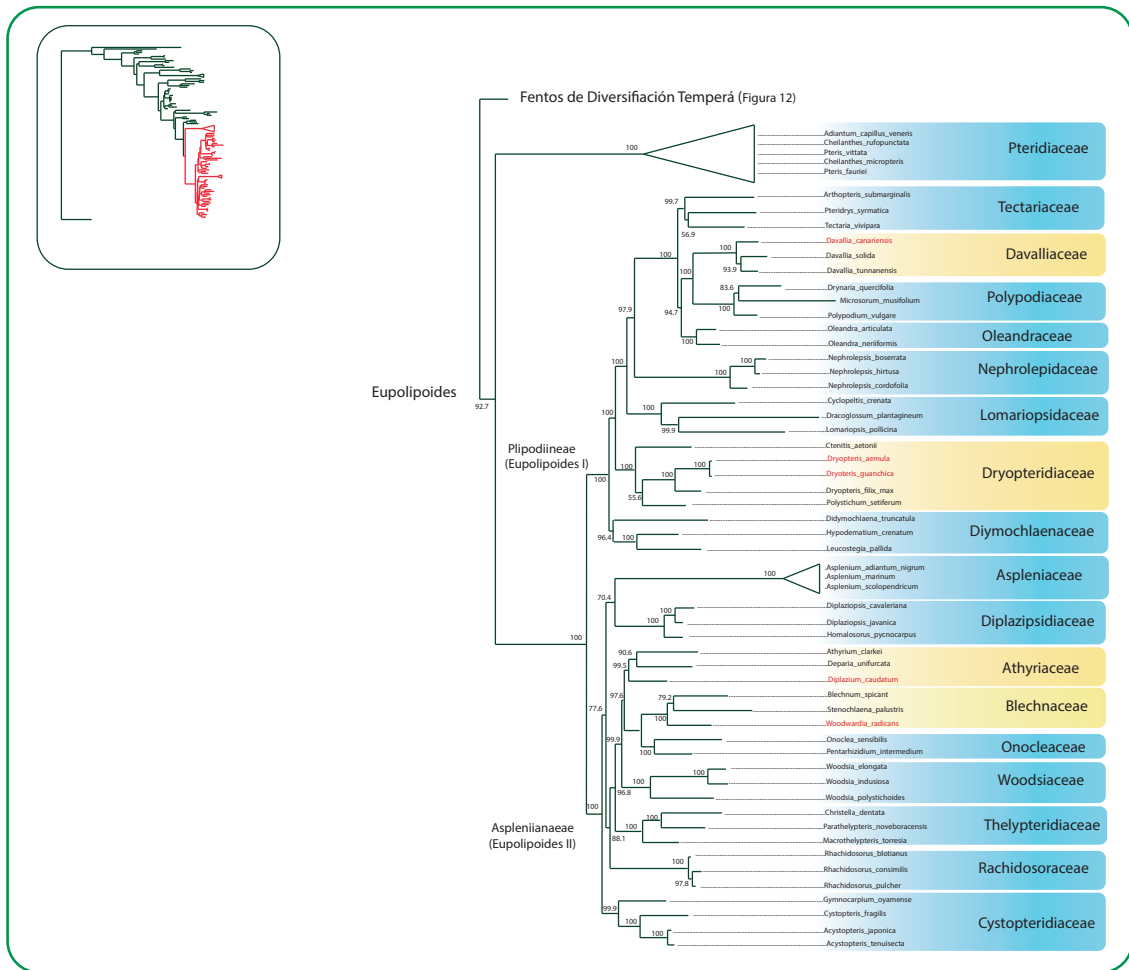


Figura 11: Arbore filoxénética parcial procedente da análise Bayesiana da matriz concatenada dos xens: (atpB, rbcL e rps4) que amosa as relacións evolutivas entre os feitos *Eupolipoides* da Clase *Polypodiopsida* analizados. As familias ás que pertencen as especies relictas aparecen emarcadas en cadros amarelos e as especies destácanse con letras vermellas.. Os valores sobre as pólas correspóndense cos probabilidades *a posteriori* (PP).

As restantes familias que inclúen especies relictas aparecen nos clados máis basais na filoxenia (Fig. 12). A familia *Culcitaceae* (PP 99.9%), que inclúe só dúas especies na actualidade, *Culcita conifolia* e *C. macrocarpa* é irmá da *F. Plagiogiraceae* e, xunto con ela, atópanse dentro dun clado (PP>90%) integrado por *Cyatheaceae*, *Dicksoniaceae*, *Cibotiaceae* y *Thyrsopteridiaceae*, todas elas da Orde *Cyatheales*, os feitos arborescentes. A *F. Hymenophyllaceae*, que inclúe tres especies consideradas relictas (*Hymenophyllum tunbringense*, *H. wilsonii* e *Vandenboschia speciosa*), ocupa unha posición case basal dentro dos feitos Leptoesporanxiados (Pryer *et al*, 2004). Esta familia recibe un apoio unicamente moderado na árbore (PP 72.4%).





### B.-Análise da viabilidade das esporas (fitness)

Como se amosa na Táboa 3, as porcentaxes de esporas que presentaban algunha característica física que impedía a súa futura xerminación é moi semellante entre as poboacións analizadas (19,6% en C4 y 19.57% en C11). Disto dedúcese que a cantidade de esporas que si poderían xerminar é elevado xa que rondaría o 80% en ambas poboacións (80.40% na C4 e 80.43% na C11).

11/03/2020		Porcentaxes de esporas non viables	
Poboación C4		Poboación C5	
C4.1.1	30	C11.1	18
C4.1.2	22	C11.2	15
C4.1.3	12	C11.3	35
C4.2.1	22	C11.4	22
C4.2.2	12	C11.5	22
		C11.6	15
		C11.7	10

Táboa 3 : Reconto de esporas non viables nas 2 poboacións analizadas.

Debido ao problema da pandemia non se puido realizar o seguimento da xerminación das esporas, pero si facer un reconto das xerminadas ao cabo de 72 días. Na táboa 4 pódese observar que as porcentaxes de xermolación difiren entre as 2 poboacións e que existe unha elevada variabilidade nos diferentes individuos da poboación C4.

22/05/20		Porcentaxes de esporas xermoladas	
C4		C11	
C4.1.1	12%	C11.1	86%
C4.1.2	57.60%	C11.2	98%
C4.1.3	0%	C11.3	87%
C4.2.1	64.50%	C11.4	94%
C4.2.2	2.90%	C11.5	94%
		C11.6	89%
		C11.7	85%

Táboa 4: Reconto de esporas xermoladas.

A Táboa 5 inclúe os valores medios, de desviación típica e o intervalo de confianza para a viabilidade esporal ó cabo de 72 días para ambas poboacións. A media e a desviación estándar son bastante distintas entre as dúas poboacións. O valor medio das esporas xermoladas da poboación C4 (0.274) é evidentemente menor có da poboación C11 (0.904). Tamén se pode observar que tanto a desviación estándar (0.097 fronte a 0.002) como o intervalo de confianza son maiores na poboación C4, o que indica que as porcentaxes de esporas xermoladas varían moito entre individuos dentro desta poboación (Táboa 5). O diagrama de caixas realizado (Fig.13) reforza a idea de que si existen diferencias claras entre as medias das 2 poboacións.

Poboación	Media	Desv. Est	Int.Cf
C4	0.274	0.097	0.189-0.359
C11	0.904	0.002	0.902-0.906

Táboa 5: Análise exploratorio da viabilidade nas dúas poboacións estudadas. Desv. Est= desviación estándar, Int.Cf,=intervalo de confianza.

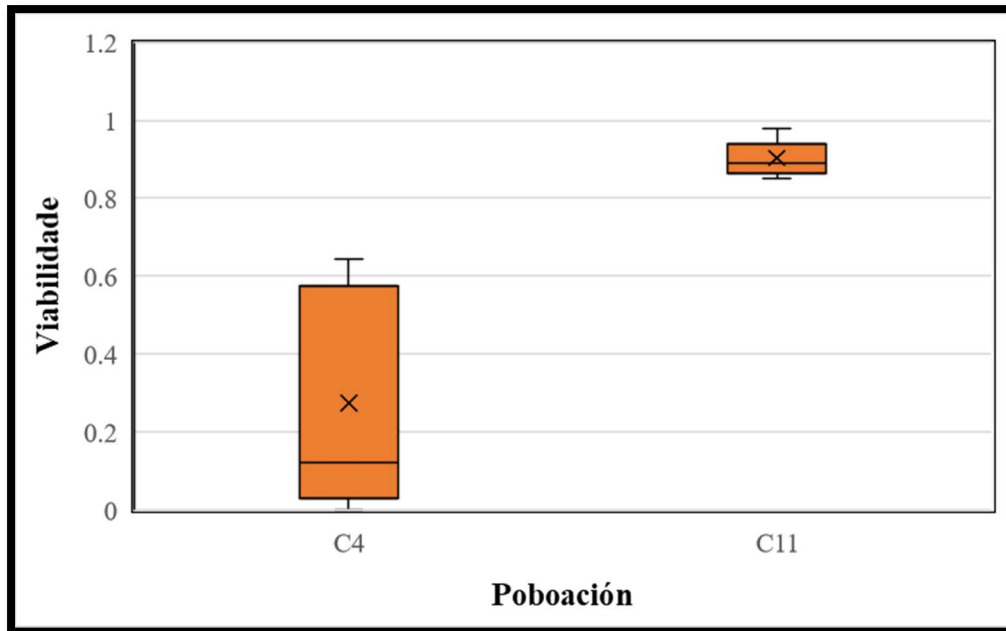


Figura 13: Diagrama de caixas da viabilidade das esporas en cada unha das poboacións estudadas.

## Discusión

Como se pode observar nas Figs. 11 e 12, os feitos relictos non forman un clado único senón que distribúense polo cladograma reflectindo relacións filoxenéticas de diversa índole. Asemade, as relacións filoxenéticas obtidas son coherentes co observado en filoxenias publicadas da Clase *Polypodiopsida* (e.g. Qi *et al.*, 2018). A revisión da bibliografía publicada permite apreciar que as idades de diverxencia das familias nas que están incluídos os feitos relictos (Táboa 6) son tamén moi variables. Oscilan entre os 172-150 millóns de anos (Ma) das F. *Hymenophyllaceae* (Hennequin *et al.*, 2008) e *Culcitaceae* (Qi *et al.*, 2018) e os 70 Ma da F. *Davalliaceae* (Qi *et al.*, 2018). A diverxencia tivo lugar, polo tanto, en distintos intres entre o Xurásico e o Terciario. Porén, os amplos rangos de erro destas estimas fan que dar unha idade exacta sexa difícil (Graur & Martin, 2004).

Se ben a filoxenia realizada (Fig. 11 e 12) permite analizar a posición relativa das familias, a diverxencia das especies e as súas afinidades bioxeográficas deberán buscarse en bibliografía específica (Táboa 6). Os estudos citados na Táboa 6 para as distintas especies e xéneros amosan un escenario de novo moi heteroxéneo, no que os xéneros e as especies relictas diverxen en momentos diferentes entre o Oligoceno e o Plioceno (Táboa 6). Máis relevante para este traballo resulta a afinidade bioxeográfica histórica que as especies relictas amosan (Táboa 6). Así, por sinalar algúns exemplos, *Culcita macrocarpa*, de distribución Ibero-Macaronésica, presenta afinidades Neotropicais (relacionada coas especies *C. coniiifolia*, propia do S de América e *C. remberi*, especie extinta de zonas temperado cálidas do Mioceno do N de América; Pinson *et al.*, 2018). Porén, outras especies amosan afinidades moi diferentes. *Woodwardia radicans* relaciónase primeiramente con especies asiáticas (Li *et al.*, 2015), o que tamén ocorre coa especie *Davallia canariensis* (Liu *et al.*, 2013). Finalmente, as especies relictas galegas do xénero *Hymenophyllum* inclúense nun clado no que abundan as especies do extremo S de América e Oceanía (Hennequin *et al.*, 2008).

As familias ás que pertencen as especies relictas en estudo son dispares no seu porte, ecoloxía e fisioloxía (Aizpuru *et al.*, 1999; Quintanilla *et al.*, 2004). Por sinalar os casos nos que a diferenza é máis extrema, as especies da F. *Culcitaceae* (*Culcita macrocarpa* e *C. coniiifolia*), ambas arborescentes, son terrestres e de gran tamaño, estando vencelladas a bosques con elevada humidade. Pola súa banda, dentro da F. *Blechnaceae* o xénero *Woodwardia* inclúe feitos terrestres non arborescentes que presentan frondes de gran tamaño e habitan zonas boscosas de alta humidade mais tamén zonas de borde de bosque sempre que haxa auga dispoñible (Cranfill & Kato 2003; Kasmirczak, 1999). No outro extremo do espectro, os integrantes da familia *Hymenophyllaceae* presentan frondes de pequeno tamaño e monoestromáticas, medrando fundamentalmente sobre rochas ou troncos de árbores (Hennequin *et al.* 2010). A heteroxeneidade fisiolóxica existente dentro dos feitos considerados relictos atinxe tamén á regulación do ciclo vital, especialmente á fase gametofítica (Quintanilla *et al.*, 2004). Nalgunhas das especies a sexualidade dos gametófitos ven determinada pola concentración de anteridióxenos (e.g. *Woodwardia radicans*), namentres que noutros taxóns estes non xogan ningún papel relevante (e.g. *Culcita macrocarpa*). Tamén as especies son moi variables no que se refire á frecuencia da autogamia nas poboacións, sendo esta de novo especialmente alta en *C. macrocarpa* (Quintanilla *et al.*, 2004).

Idade de diversificación Familia	Bioxeografía Actual	Especie	Idade Xénero/ Especie	Fontes
70 Ma (Finas Cretácico)	Trópicos e Subtrópicos	<i>Davallia canariensis</i>	Especie: 11.1 Ma	Qi <i>et al.</i> , 2018 Liu <i>et al.</i> , 2013, Schuettpelz & Pryer 2009
90 Ma(Cretácico) / 172 Ma (Xurásico medio)	Subcosmopolita	<i>Hymenophyllum tunbrigense</i> <i>Hymenophyllum wilsonii</i> <i>Vandensboschia speciosa</i>	Xénero <i>Vandensboschia</i> : 19 Ma	Qi <i>et al.</i> , 2018 Hennequin <i>et al.</i> , 2008
85 Ma (Cretácico)	Subcosmopolita	<i>Woodwardia radicans</i>	Xénero: 56.51 ± 2.89 Ma	Qi <i>et al.</i> , 2018 Li <i>et al.</i> , 2015 Cranfill and Kato, 2003
100 Ma (Principio Cretácico)	Pantropical	<i>Diplazium caudatum</i>	Xénero: 41.7 Ma Especie 17Ma	Qi <i>et al.</i> , 2018 Wei <i>et al.</i> , 2013 Liu <i>et al.</i> , 2007
150 Ma (Xurásico Sup.)*	Neotropical	<i>Culcita macrocarpa</i> <i>Culcita conifolia</i> <i>Culcita remberi</i>	Especies: 19.5 Ma 23 Ma 16-15 Ma	Qi <i>et al.</i> , 2018 Ben-Menni Schuler ., 2018
90 Ma (Cretácico)	Cosmopolita	<i>Dryopteris aemula</i> <i>Dryopteris guanchia</i>	Xénero: 23.2 Ma Especies: menos 5 Ma	Qi <i>et al.</i> , 2018 Sessa <i>et al.</i> , 2012

Táboa 6: Idades de diversificación dos taxones estudados e fontes de información.\* Debido a que non se atopou a idade de diversificación da familia *Culcitaceae* nesta táboa aparece a data da familia *Dicksoniaceae*, moi emparentada coas *Culcitaceae*.

A análise filoxenética construída e a revisión bibliográfica realizada permitiron observar que as familias ás que pertencen os distintos feitos ameazados relictos que se inclúen neste estudo orixináronse en moi diferentes momentos ó longo da evolución dos *Polypodiopsida* (Fig. 11 e 12). Asemade, os feitos relictos son tamén claramente heteroxéneos dende o punto de vista bioxeográfico, morfolóxico, fisiolóxico e ecolóxico. Esta heteroxeneidade e as afinidades bioxeográficas das especies apoian dúas ideas clave sinaladas por distintos autores: (i), Que a comunidade pteridofítica dos cursos fluviais de influencia atlántica da Península Ibérica e a Macaronesia ten un substrato de óptimo temperado-subtropical e de orixe preglaciar (e.g. Quintanilla *et al.*, 2002a) e (ii), Que esta comunidade está constituída por especies cunha historia vital moi diferenciada (e.g. Quintanilla *et al.*, 2002a), o que afectará á reacción dos distintos taxóns ós cambios ambientais (Taberlet *et al.*, 1998). A conservación destes feitos requirirá a elaboración de plans de actuación individuais, sempre vencellados á conservación do seu hábitat .

O cambio climático, a deforestación e as plantacións forestais están a poñer en perigo a supervivencia das especies de feitos relictos na Península Ibérica (e.g. Quintanilla *et al.*, 2002a). A redución das poboacións a miúdo leva consigo un proceso de erosión xenómica por perda de diversidade xenética, o que a miúdo produce efectos negativos na *fitness* dos individuos (e.g. Buza *et al.*, 2000). Estes efectos dependerán tamén da historia vital das especies, e moi especialmente do sistema reprodutivo (Mateu-Andrés & De Paco, 2006).

O estudo piloto realizado con *Culcita macrocarpa* permitiu realizar a comparación entre dúas poboacións diferentes e sería, *a priori*, aplicable ás restantes especies relictas. Este estudo amosa que a porcentaxe de esporas que mostraban danos físicos ou defectos e, polo tanto, non presentaban capacidade de xermolación é semellante nas dúas poboacións (Táboas 4 e 5). Porén, a porcentaxe de xermolación ó cabo dos 72 días de cultivo é superior e menos variable na poboación C11 (Artike-País Vasco) ca na C4 (Eume-Galicia) sendo os valores medios 0.90 e 0.27, respectivamente. Esta diferenza podería

ser debida a que a poboación do País Vasco conta cun número maior de individuos (28) (Táboa 2) estando menos afectada pola deriva xenética cas poboacións pequenas, como a C4 (Quintanilla *et al.*, 2007). Porén, en estudos previos realizados con poboacións só galegas, non se detectou un efecto significativo do tamaño poboacional na viabilidade xerminativa (Fernández, 2019).

Sabemos que a produción de esporas está influenciada pola temperatura, humidade e a cuberta arbórea (Arens, 2001). No caso de *Culcita macrocarpa*, as súas esporas son moi sensibles aos cambios de humidade ambiental e á conxelación (Ballesteros *et al.*, 2012). Ademais, as porcentaxes máis altas de xerminación danse entre os 10°C-15°C, en termos xerais, pero hai que salientar que o efecto da temperatura sobre as poboacións varía debido ás peculiaridades xenéticas e ás diferenzas ambientais (Quintanilla *et al.*, 2000). O estudo realizado con marcadores moleculares en poboacións de *C. macrocarpa* presentes na Península Ibérica de Delgado & Plaza (2016) determinou a existencia de 2 grupos xenéticos (diferencias baseadas nos haplotipos) na Península Ibérica, un ó N formado polas poboacións da Cornisa Cantábrica e outro ó Sur coas poboacións de Andalucía. Dentro do primeiro grupo atópanse as poboacións de Asturias e Galicia, as cales amosan una baixa diversidade xenética e alta clonalidade, sendo a diversidade xenética nas poboacións vascas algo superior. Esta pequena diferenza podería explicar os nosos resultados de viabilidade, superiores na poboación de Artike (C11). Porén, sería preciso realizar novos estudos para descartar outras posibilidades, por exemplo que se trate dun efecto das condicións climáticas do ano no que se formaron as esporas.

## Conclusións

- A análise filoxenética dos feitos mostra que as especies relictas non forman un único grupo homoxéneo, senón que presentan diferentes relacións filoxenéticas con outras familias da Cl. *Polypodiopsida*. Estas relacións son reflexo do diferente momento de diversificación e das súas características morfolóxicas e fisiolóxicas. Forman polo tanto un grupo heteroxéneo malia que moitas delas conviven nos bosques húmidos da Península Ibérica, Canarias, Azores e Madeira tendo así una ecoloxía semellante.
- O estudo realizado para avaliar a viabilidade xerminativa das esporas de *Culcita macrocarpa* pode ser unha boa ferramenta para analizar o estado de conservación das poboacións das especies ameazadas de feitos relictos.
- A diferente diversidade xenética existente nas poboacións de *C. macrocarpa* podería explicar os diferentes valores de *fitness* observados. Porén, deberían levarse a cabo estudos adicionais para comprobar esta hipótese.

## Conclusions

- The phylogenetic analysis conducted shows that Tertiary relict fern species do not form a single homogeneous group. Genetics, morphology and physiology tell us that relict fern species are highly different, even if they share similar habitats in humid forests of the Iberian Peninsula, Canary Islands, Açores and Madeira.
- The methodology used to assess spore viability in *Culcita macrocarpa* populations can be a useful tool in order to analyze the conservation status of relict ferns.
- The different genetic diversity values found in the *C. macrocarpa* populations studied could explain the different spore viability recovered. More work is needed to ascertain this hypothesis.

## Bibliografía

- Aizpuru, I., C. Aseguinolaza, P.M. Uribe-echebarría, P. Urrutia, I. Zorrakín, eds. (1999). Ed. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz (España). ISBN: 84-457-1396-5.
- Amigo, J. (2005). Los helechos en el noroeste ibérico y su interés para la conservación. Lugo, Galicia: Instituto de Biodiversidad Agraria y Desenvolvemento Rural.
- Arens, N. C. (2001). Variation in performance of the tree fern *Cyathea caracasana* (*Cyatheaceae*) across a successional mosaic in an Andean cloud forest. *American journal of botany*, 88, 545–551.
- Axelrod, D. I. (1975). Evolution and biogeography of Madrean-Tethyan sclerophyll vegetation. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 62, 280-334.
- Ballesteros, D., Estrelles, E., Walters, C., & Ibars, A. M. (2012). Effects of temperature and desiccation on ex situ conservation of nongreen fern spores. *American journal of botany*, 99(4), 721–729.
- Barrón, E. (2003). Evolución de las floras Terciarias de la Península Ibérica. *Monografías del Jardín Botánico de Córdoba*, 11, 63-74.
- Barrón, E & Peyrot D. (2006). La vegetación forestal en el Terciario. In: Carrión J, Fernández S, Fuentes N, eds. *Paleoambientes y cambio climático*. Murcia, Spain: Fundación Séneca/ Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia, 56-77.
- Ben-Menni Schuler S. 2018. Diversidad Genética y Modelo Biogeográfico de cuatro especies de helechos relictos del Terciario. Universidad de Granada. Granada.
- Betancourt, Z. (2018). Descripción do biotopo e identificacións de ameazas das subpoboacións de *Calocitopsis macrocarpa* especies relictas macaronesas do Parque Natural das Fragas do Eume (Tese Doutoral). Universidade da Coruña, A Coruña.
- Blanca, G., (1999). Libro rojo de la flora silvestre amenazada de Andalucía. Consejería de Medio Ambiente.
- Brummitt, N., Aletrari, E., Syfert, M. M., & Mulligan, M. (2016). Where are threatened ferns found? Global conservation priorities for pteridophytes. *Journal of Systematics and Evolution*, 54(6), 604–616. <https://doi.org/10.1111/jse.12224>.
- Buza, L., Young, A., & Thrall, P. (2000). Genetic erosion, inbreeding and reduced fitness in fragmented populations of the endangered tetraploid pea *Swainsona recta*. *Biological Conservation*, 93(2), 177–186. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(99\)00150-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(99)00150-0).
- Chunxiang, L., Shugang, L., Xiaoyan, S., Qun Y. (2011). Phylogenetic Positions of the Enigmatic Asiatic Fern Genera *Diplaziopsis* and *Rhachidosorus* from Analyses of Four Plastid Genes. *American Fern Journal*, 101(3):142–155. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-101.3.142>.
- Christenhusz, M. J. M., Zhang, X. C., & Schneider, H. (2011). A linear sequence of extant families and genera of lycophytes and ferns. *Phytotaxa*, 19, 7–54. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.19.1.2>.

- Copeland, E. B. (1927). Davalloses and related genera. *Philipp. J. Sci.* 34, 239–257.
- Cranfill R & Kato M. (2003). Phylogenetics, Biogeography, and Classification of the Woodwardioid Ferns (Blechnaceae). *Pteridology in the New Millennium*, 25–48. Springer.
- Delgado, A. J. & Plaza, L. (2006). Helechos amenazados de Andalucía. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía. Sevilla.
- Dittrich, D., V. A., Salino, A., Monteiro, R., & De Gasper, A. L. (2017). The family *Blechnaceae* (*Polypodiopsida*) in Brazil: Key to the genera and taxonomic treatment of *austroblechnum*, *Cranfillia*, *Lomaridium*, *Neoblechnum* and *Telmatoblechnum* for southern and southeastern Brazil. *Phytotaxa*, 303(1), 1–33. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.303.1.1>.
- Dyer, A. F. (1983). Fern gametophytes in culture—a simple system for studying plant development and reproduction. *Journal of Biological Education*, 17(1), 23–39.
- Fernández, E. (2019). Análisis de la viabilidad de las esporas en poblaciones del helecho relicto amenazado *Culcita macrocarpa*. (TFG). Universidade da Coruña. España.
- De Gasper, A. L., Dittrich, V. A. D. O., Smith, A. R. & Salino, A. (2016). A classification for *Blechnaceae* (Polypodiales: *Polypodiopsida*): New genera, resurrected names, and combinations. *Phytotaxa*, 275(3), 191–227. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.275.3.1>.
- GBIF (2020), Página de Inicio de GBIF. Disponible en: <https://www.gbif.org> [16 de maio de 2020].
- Graur D & Martin W. 2004. Reading the entrails of chickens: molecular timescales of evolution and the illusion of precision. *Trends in Genetics* 20: 80–86.
- Hennequin S, Ebihara A, Dubuisson JY & Schneider H (2010) Chromosome number revolution in *Hymenophyllum* (*Hymenophyllaceae*) with special reference to the subgenus *Hymenophyllum*. *Molecular Phylogeny and Evolution*, 55:47–59. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.01.001>.
- Hennequin, S., Schuettpelz, E., Pryer, K. M., Ebihara, A., & Dubuisson, J. Y. (2008). Divergence times and the evolution of epiphytism in filmy ferns (*Hymenophyllaceae*) revisited. *International Journal of Plant Sciences*, 169(9), 1278–1287. <https://doi.org/10.1086/591983>.
- Hewitt G. M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* 58: 247–276.
- Juslén, A., Väre, H., & Wikström, N. (2011). Relationships and evolutionary origins of polyploid *Dryopteris* (*Dryopteridaceae*) from Europe inferred using nuclear *pgiC* and plastid *trnL-F* sequence data. *Taxon*, 60(5), 1284–1294. <https://doi.org/10.1002/tax.605005>.
- Kasmirczak, C. (1999). A família *Blechnaceae* (C. Presl) Copel. (Pteridophyta) no Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, PhD Diss.
- Kessler, M., Moran, R. C., Mickel, J. T., Matos, F. B., & Smith, A. R. (2018). Prodrómus of a fern flora for Bolivia. XXXV. *Dryopteridaceae*. *Phytotaxa*, 353(1), 1–114. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.353.1>.



- Kramer, K.U., Chambers, T.C. & Hennipman, E., (1990). In: Kramer, K.U., Green, P.S. (Eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants. Vol 1. Pteridophytes and Gymnosperms.* Springer-Verlag, Berlin. pp. 60–68 e 94-99.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., & Tamura K. (2018). *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Large M. & Braggins J. (2004) *Tree Ferns.* Timber Press, Portland.
- Lemey, P., Salemi, M., & Vandamme A. M. (2009). *The Phylogenetic Handbook.* Cambridge University Press. Cambridge.
- Li, C. X., Lu, S. G., Ma, J. Y., Gai, Y. H., & Yang, Q. (2015). Phylogeographic history of the *Woodwardioid* ferns, including species from the Himalayas. *Palaeoworld*, 25(2), 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.palwor.2014.10.004>.
- Liu, H. M., Zhang, X. C., Wang, W., Qiu, Y. L., & Chen, Z. D. (2007). Molecular phylogeny of the fern family *Dryopteridaceae* inferred from chloroplast *rbcL* and *atpB* genes. *International Journal of Plant Sciences*, 168(9), 1311–1323. <https://doi.org/10.1086/521710>.
- Liu, H., & Schneider, H. (2013). Evidence supporting *Davallia canariensis* as a late miocene relict endemic to macaronesia and atlantic Europe. *Australian Systematic Botany*, 26(5), 378–385. <https://doi.org/10.1071/SB13029>.
- Maddison, W. P. & D.R. Maddison. (2016). Mesquite: a modular system for Evolutionary analysis. Version 2.75 <http://www.mesquiteproject.org>.
- Mateu-Andrés, I., & De Paco, L. (2006). Genetic diversity and the reproductive system in related species of *Antirrhinum*. *Annals of Botany*, 98(5), 1053–1060. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl186>.
- Milne, R.I. & Abbott, R.J. (2002). The origin and evolution of Tertiary relict floras, *Advances in Botanical Research*, vol. 38, pp. 281-314.
- Moreno, J. C. (2010). Lista Roja 2008 de la flora vascular española.
- Moya P., Delgado A. & Plaza L. (2010). Propagación y aclimatación de cuatro especies de Pteridófitos amenazados en la provincia de Cádiz 13.
- MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space.
- Nylander, J. A. A. (2004). Mr Modeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Pinson, J. B., Manchester, S. R., & Sessa, E. B. (2018). *Culcita remberi* sp. Nov., an understory fern of Cyatheales from the Miocene of northern Idaho. *International Journal of Plant Sciences*, 179(8), 635–639. <https://doi.org/10.1086/698938>.
- Pirie, M. D., Humphreys, A. M., Barker, N. P. & Linder, H. P. (2009). Reticulation, data combination, and inferring evolutionary history: An example from *Danthonioideae* (Poaceae). *Systematic Biology*, 58(6), 612–628. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp068>.

- Pryer K. M, Schuettpelz E, Wolf PG, Schneider H, Smith AR, Cranfill R. (2004). Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. *Am J Bot.* 91:1582–98.
- Pucko C, Beckage B, Perkins T, Keeton WS. (2011). Species shift in response to climate change: Individual or shared responses? *Journal of the Torrey Botanical Society* 138: 156-176.
- Qi, X., Kuo, L. Y., Guo, C., Li, H., Li, Z., Qi, J., Ma, H. (2018). A well-resolved fern nuclear phylogeny reveals the evolution history of numerous transcription factor families. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 127 (March), 961–977. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.06.043>.
- Quintanilla, L. G., Amigo, J., Pangua, E., & Pajarón, S. (2002). Effect of storage method on spore viability in five globally threatened fern species. *Annals of Botany*, 90(4), 461–467.
- Quintanilla, L.G., Amigo, J., Pangua, E. & Pajaron, S. (2002a). Analisis biogeografico de la pteridoflora de la sierra de la Capelada (La Coruna, Espana). *Lazaroa* 23, 17-24.
- Quintanilla, L.G., Cabezudo, B., Garcia, A., Mesa, R., Nava, H.S. & Navas, P. (2004). *Culcita macrocarpa* C. Presl. En: A. Banares, G. Blanca, J. Guemes, J.C. Moreno & S. Ortiz (Eds.): *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de Espana*: 662-663. 2a Ed. Direccion General para la Biodiversidad. MMA. 1069 pp.
- Quintanilla, L. G., & Escudero, A. (2006). Spore fitness components do not differ between diploid and allotetraploid species of *Dryopteris* (*Dryopteridaceae*). *Annals of Botany*, 98(3), 609–618.
- Quintanilla, L. G., Pajarón, S., Pangua, E., & Amigo, J. (2000). Effect of temperature on germination in northern most populations of *Culcita macrocarpa* and *Woodwardia radicans*. *Plant Biology*, 2(06), 612–617.
- Quintanilla, L. G., Pajarón, S., Pangua, E., & Amigo, J. (2007). Allozyme variation in the sympatric ferns *Culcita macrocarpa* and *Woodwardia radicans* at the northern extreme of their ranges. *Plant Systematics and Evolution*, 263(3–4), 135–144. <https://doi.org/10.1007/s00606-006-0486-x>.
- Rambaut, A. (2016). FigTreev.1.4.3. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rodríguez-Sánchez, F., & Arroyo, J. (2008). Reconstructing in the demise of Thetyan plants: climatic-driven range dynamic of *Laurus* since the Pliocene. *Global Ecology and Biogeography*, 17, 685-95.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA & Huelsenbeck JP. (2012) . MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models *Syst. Biol.* May;61(3): 539-42. doi: 10.1093/sysbio/sys029.
- Rothfels, C.J., Sundue, M.A., Kuo, L., Larsson, A., Kato, M., Schuettpelz, E. & Pryer, K.M. (2012). A revised family-level classification for eupolypod II ferns (Polypodiidae: Polypodiales). *Taxon*, 61, 515-533.
- Rumsey, F. J., Barrett, J.A., Gibby, M., Rusell, S, J. & Vogel, J. C. (2005). Reproductive strategies and population structure in the endangered pteridophyte *Trichomanes speciosum* (Hymenophyllaceae: Pteridophyta). *FernGazette*, 17, 205.

- Rumsey, F. J., Jermy, A. C., & Sheffield, E. (1998). The independent gametophytic stage of *Trichomanes speciosum* Wild. (*Hymenophyllaceae*), the Killarney Fern and its distribution in the British Isles. *Watsonia*, 22, 1-20.
- Sessa, E. B., Zimmer, E. A., & Givnish, T. J. (2012). Phylogeny, divergence times, and historical biogeography of new world dryopteris (*Dryopteridaceae*). *American Journal of Botany*, 99(4), 730–750. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100294>.
- Schuettpelz E, Pryer KM. (2009). Evidence for a Cenozoic radiation of ferns in an angiosperm-dominated canopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 11200–11205. doi:10.1073/pnas.0811136106.
- Sharpe JM, Mehlreter K. (2010). Ecological insights from fern population dynamics. In: Mehlreter K, Walker LR, Sharpe JM eds. *Fern ecology*. Cambridge: Cambridge University Press. 61–110.
- Smith AR, Pryer KM, Schuettpelz E, Korall P, Schneider H. & Wolf PG. (2006). A classification for extant ferns. *Taxon*. 55:705–731.
- Swofford DL. (1998) PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A. G., & Cosson, J. F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7(4), 453–464. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00289.x>
- Tryon, R.M. & Tryon, A.F. (1982). *Ferns and Allied Plants. With Special Reference to Tropical America*. Springer, New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8162-4>.
- Vasques, D. T., Ebihara, A., Hirai, R. Y., Prado, J., & Motomi, I. (2019). Phylogeny of *Hymenophyllum* subg. *Mecodium* (*Hymenophyllaceae*), with special focus on the diversity of the *Hymenophyllum polyanthos* species complex. *Plant Systematic and Evolution*, 305(9), 811–825. <https://doi.org/10.1007/s00606-019-01609-y>.
- Wei, R., Schneider, H., & Zhang, X. C. (2013). Toward a new circumscription of the twin-fern genus *Diplazium* (*Athyriaceae*): A molecular phylogeny with morphological implications and infrageneric taxonomy. *Taxon*, 62(3), 441–457. <https://doi.org/10.12705/623.8>.

# Anexo I

Anexo I: Tábua que amosa as referencias de Gen Bank das secuencias empregadas na filoxenia.

rbcL			atpB			rps4		
Especie	Citación	GenBank #	Especie	Citación	GenBank #	Especie	Citación	GenBank #
<i>Acystopteris japonica</i>	Sano et al., 2000	AB021725.1	<i>Acystopteris japonica</i>	Li et al., 2011	JN168031.1	<i>Acystopteris japonica</i>	Li et al., 2011	JN168074.1
<i>Acystopteris tenuisecta</i>	Ebhara et al., 2010	AB574894.1	<i>Acystopteris tenuisecta</i>	Li et al., 2011	JN168032.1	<i>Acystopteris tenuisecta</i>	Li et al., 2011	JN168075.1
<i>Adiantum capillus-veneris</i>	Alulakh et al., 2019	MN207129.1	<i>Adiantum capillus-veneris</i>	Lu et al., 2012	JF935427.1	<i>Adiantum capillus-veneris</i>	Lu et al., 2012	JF980611.1
<i>Alsophila podophylla</i>	Liu et al., 2018	MG262389.1	<i>Alsophila podophylla</i>	Liu et al., 2018	MG262389.1	<i>Alsophila podophylla</i>	Liu et al., 2018	MG262389.1
<i>Alsophila tricolor</i>	Korall et al., 2007	AM410199.1	<i>Alsophila tricolor</i>	Korall et al., 2010	FN667553.1	<i>Alsophila tricolor</i>	Korall et al., 2010	FN667565.1
<i>Anemia mexicana</i>	Wäström et al., 2001	AJ303396.1	<i>Anemia mexicana</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463140.1	<i>Anemia mexicana</i>	Pryer et al., 2004	AY612649.1
<i>Anemia rotundifolia</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463321.1	<i>Anemia tomentosa</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463322.1	<i>Arthropteris submarginalis</i>	Liu et al., 2013	KC977452.1
<i>Anemia tomentosa</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463311.1	<i>Arthropteris submarginalis</i>	Liu et al., 2013	KC977359.1	<i>Asplenium adiantum-nigrum</i>	Marquardt et al., 2012	JX068767.1
<i>Arthropteris submarginalis</i>	Liu et al., 2013	KC977380.1	<i>Asplenium adiantum-nigrum</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463324.1	<i>Asplenium marinum</i>	Schnecker et al., 2005	AY549773.1
<i>Asplenium adiantum-nigrum</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463143.1	<i>Asplenium marinum</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463334.1	<i>Asplenium scolopendrium</i>	Schnecker et al., 2005	AY459169.1
<i>Asplenium marinum</i>	Vogel, 2000	AF240647.1	<i>Asplenium scolopendrium</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463346.1	<i>Athyrium clarkei</i>	Wei et al., 2017	MG183443.1
<i>Asplenium scolopendrium</i>	Vogel, 2000	AF240645.1	<i>Athyrium clarkei</i>	Wei et al., 2017	MG183365.1	<i>Azolla pinnata</i>	Metzgar et al., 2016	EF520914.1
<i>Athyrium clarkei</i>	Liu et al., 2009	F821340.1	<i>Azolla pinnata</i>	Wei et al., 2017	EF520877.1	<i>Blechnum spicant</i>	Cardenas et al., 2019	MH17884.1
<i>Azolla pinnata</i>	Metzgar et al., 2007	EF520927.1	<i>Blechnum spicant</i>	Rothfels et al., 2011	JF832157.1	<i>Cheilanthes micropteris</i>	Robinson et al., 2018	MH173078.1
<i>Blechnum spicant</i>	Rothfels et al., 2012	JF832059.1	<i>Cheilanthes micropteris</i>	Robinson et al., 2018	MH173078.1	<i>Cheopleuria integrifolia</i>	Pryer et al., 2004	AY612654.1
<i>Cheilanthes micropteris</i>	Robinson et al., 2018	MH173078.1	<i>Cheopleuria integrifolia</i>	Pryer et al., 2004	AY612692.1	<i>Christella dentata</i>	Li et al., 2015	KT805096.1
<i>Cheopleuria integrifolia</i>	Rai et al., 2010	EU352298.1	<i>Christella dentata</i>	Lehtonen et al., 2014	KM114087.1	<i>Cibotium barometz</i>	Korall et al., 2006	AM176485.1
<i>Christella dentata</i>	Näta et al., 2017	KY099782.1	<i>Cibotium barometz</i>	Liu et al., 2018	KM105066.1	<i>Cibotium chamissoi</i>	Korall et al., 2006	AM176486.1
<i>Cibotium barometz</i>	Hasebe et al., 1994	U05610.1	<i>Cibotium chamissoi</i>	Korall et al., 2006	AM176590.1	<i>Cibotium glaucum</i>	Korall et al., 2006	AM176487.1
<i>Cibotium chamissoi</i>	Korall et al., 2006	AM177329.1	<i>Cibotium glaucum</i>	Korall et al., 2006	AM176591.1	<i>Cibotium nealae</i>	Korall et al., 2006	AM176488.1
<i>Cibotium glaucum</i>	Wolf et al., 1994	U05913.1	<i>Cibotium nealae</i>	Korall et al., 2006	AM176592.1	<i>Cibotium schiedei</i>	Korall et al., 2006	AM176489.1
<i>Cibotium nealae</i>	Korall et al., 2006	AM177330.1	<i>Cibotium schiedei</i>	Korall et al., 2006	AM176593.1	<i>Ctenitis eatonii</i>	Liu et al., 2010	EF540713.1
<i>Cibotium schiedei</i>	Korall et al., 2006	AM177331.1	<i>Ctenitis eatonii</i>	Liu et al., 2010	KF709463.1	<i>Culcita conifolia</i>	Korall et al., 2006	AM176491.1
<i>Ctenitis eatonii</i>	Tsutsui et al., 2006	AB23291.1	<i>Culcita conifolia</i>	Korall et al., 2006	AM176595.1	<i>Culcita macrocarpa</i>	Korall et al., 2006	AM176492.1
<i>Culcita conifolia</i>	Wolf et al., 1994	U18648.1	<i>Culcita macrocarpa</i>	Korall et al., 2006	AM176596.1	<i>Cyathea multiflora</i>	Korall et al., 2010	FN667568.1
<i>Culcita macrocarpa</i>	Korall et al., 2006	AM177344.1	<i>Cyathea multiflora</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463365.1	<i>Cyclopetis crenata</i>	Hennsquin et al., 2010	HM748161.1
<i>Cyathea multiflora</i>	Barrena-Redondo et al., 2017	KY188477.1	<i>Cyclopetis crenata</i>	Liu et al., 2007	EF463365.1	<i>Cyclopetis fragilis</i>	Li et al., 2011	JN168082.1
<i>Cyclopetis crenata</i>	Li et al., 2006	DQ508766.1	<i>Cystodium sorbifolium</i>	Korall et al., 2006	AM184112.1	<i>Davallia canariensis</i>	Liu et al., 2014	KY601952.1
<i>Cystodium sorbifolium</i>	Korall et al., 2006	AM184111.1	<i>Cystopteris fragilis</i>	Lehtonen et al., 2012	HQ157273.1	<i>Davallia solida</i>	Schnecker et al., 2002	AY098210.1
<i>Cystopteris fragilis</i>	Ebhara et al., 2010	AB574938.1	<i>Davallia canariensis</i>	Liu et al., 2014	KF601950.1	<i>Davallia yunnanensis</i>	Kim et al., 2012	JX103760.1
<i>Davallia canariensis</i>	Liu et al., 2014	KF601951.1	<i>Davallia solida</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF452029.1	<i>Deparia unifurcata</i>	Li et al., 2011	JN168087.1
<i>Davallia solida</i>	Näta et al., 2017	KY099789.1	<i>Davallia yunnanensis</i>	Ma et al., 2018	MH392508.1	<i>Dicksonia antarctica</i>	Cardenas et al., 2019	KP244092.1
<i>Davallia yunnanensis</i>	Ma et al., 2018	MH392508.1	<i>Deparia unifurcata</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463569.1	<i>Dicranopteris linearis</i>	Shu et al., 2016	KU936699.1
<i>Deparia unifurcata</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463307.1	<i>Dicksonia antarctica</i>	Wolf et al., 1997	U93829.2	<i>Dicranopteris pedata</i>	Li et al., 2010	GU950644.1
<i>Dicksonia antarctica</i>	Rai et al., 2010	EU352310.1	<i>Dicranopteris linearis</i>	Li et al., 2010	GU950634.1	<i>Didymochlaena truncatula</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF452030.1
<i>Dicranopteris linearis</i>	Wolf et al., 1994	U18626.1	<i>Dicranopteris pedata</i>	Li et al., 2010	GU950632.1	<i>Diplazopsis cavaleriana</i>	Wei et al., 2010	HQ382018.1
<i>Dicranopteris pedata</i>	Fujivara et al., 2019	LC496744.1	<i>Didymochlaena truncatula</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF452030.1	<i>Diplazopsis javanica</i>	Wei et al., 2017	KY427342.1
<i>Didymochlaena truncatula</i>	Kuo et al., 2011	JF303975.1	<i>Diplazopsis cavaleriana</i>	Rothfels et al., 2012	JF832162.1	<i>Diplazium caudatum</i>	Wei et al., 2015	KP318937.1
<i>Diplazopsis cavaleriana</i>	Li et al., 2011	JN168015.1	<i>Diplazopsis javanica</i>	Wei et al., 2017	KY427342.1	<i>Dipteris conjugata</i>	Kuo et al., 2018	MH269301.1
<i>Diplazopsis javanica</i>	Wei et al., 2017	KY427342.1	<i>Diplazium caudatum</i>	Wei et al., 2019	MN615800	<i>Dracoglossum plantagineum</i>	Chen et al., 2007	KY397979.1
<i>Diplazium caudatum</i>	Wei et al., 2015	KP318923.1	<i>Dipteris conjugata</i>	Christenhusz et al., 2013	U05620.1	<i>Drynaria quercifolia</i>	Janssen et al., 2014	AY529873.1
<i>Dipteris conjugata</i>	Pryer et al., 2004	AY612696.1	<i>Dracoglossum plantagineum</i>	Christenhusz et al., 2013	KC914563.1	<i>Dryopteris aemula</i>	Geiger et al., 2003	AY268881.1
<i>Dracoglossum plantagineum</i>	Christenhusz et al., 2013	KC914564.1	<i>Drynaria quercifolia</i>	Kim et al., 2012	JX103650.1	<i>Dryopteris filix-mas</i>	Lehtonen et al., 2010	HQ680978.1
<i>Drynaria quercifolia</i>	Janssen et al., 2004	AY529873.1	<i>Dryopteris aemula</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF452033.1	<i>Equisetum variegatum</i>	Gaillon et al., 2003	AJ583691.1
<i>Dryopteris aemula</i>	Geiger et al., 2005	AY268881.1	<i>Dryopteris filix-mas</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463391.1	<i>Gymnocarpium oyamense</i>	Li et al., 2011	JN168095.1
<i>Dryopteris filix-mas</i>	Henry et al., 2013	KF186514.1	<i>Equisetum variegatum</i>	Speer et al., 2013	KC893869.1	<i>Histiopteris incisa</i>	Shang et al., 2018	MH289685.1
<i>Dryopteris ganachica</i>	Sessa et al., 2012	JN188973.1	<i>Gymnocarpium oyamense</i>	Rothfels et al., 2012	JF832166.1	<i>Homalosorus pycnocarpus</i>	Smith et al., 2002	AF425154.1
<i>Equisetum variegatum</i>	Des Marais et al., 2003	AY232814.1	<i>Histiopteris incisa</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463374.1	<i>Hymenophyllum tunbrigense</i>	Hennsquin et al., 2010	GU200695.1
<i>Gymnocarpium oyamense</i>	Hasebe et al., 1994	U05626.1	<i>Homalosorus pycnocarpus</i>	Rothfels et al., 2012	JF832168.1	<i>Hymenophyllum wilsonii</i>	Hennsquin et al., 2010	GU200693.1
<i>Histiopteris incisa</i>	Näta et al., 2016	KY099807.1	<i>Hymenophyllum tunbrigense</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463449.1	<i>Hypodematum crenatum</i>	Smith et al., 2002	AF425151.1
<i>Homalosorus pycnocarpus</i>	Henry et al., 2013	KF186518.1	<i>Hypodematum crenatum</i>	Wei et al., 2017	KY427351.1	<i>Laurus nobilis</i>	Zhang et al., 2016	KY085912.1
<i>Hymenophyllum tunbrigense</i>	Hennsquin et al., 2009	AB496579.1	<i>Laurus nobilis</i>	Savolainen et al., 2000	AJ235518.1	<i>Leptopteris wilkesiana</i>	Metzgar et al., 2008	EF588761.1
<i>Hymenophyllum wilsonii</i>	Hennsquin et al., 2010	GU200669.1	<i>Leptopteris wilkesiana</i>	Pryer et al., 2004	AY612699.1	<i>Lindaea quadrangularis</i>	Lehtonen et al., 2010	GU478653.1
<i>Hypodematum crenatum</i>	Rothfels et al., 2012	JF832072.1	<i>Leucostegia pallida</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463425.1	<i>Lomariopsis pollicina</i>	Hennsquin et al., 2010	HM748162.1
<i>Laurus nobilis</i>	Pearse et al., 2015	KM360844.1	<i>Lindaea quadrangularis</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463478.1	<i>Lygodium japonicum</i>	Korall et al., 2006	AM176515.1
<i>Leptopteris wilkesiana</i>	Pryer et al., 2004	AY612678.1	<i>Lomariopsis pollicina</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463481.1	<i>Lygodium microphyllum</i>	McCulloch et al., 2018	MG761729.1
<i>Leucostegia pallida</i>	Tsutsui et al., 2006	AB22389.1	<i>Lygodium japonicum</i>	Pryer et al., 2001	AF313549.1	<i>Macrothelypteris torresii</i>	Smith et al., 2002	AF425172.1
<i>Lindaea quadrangularis</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463232.1	<i>Lygodium microphyllum</i>	McCulloch et al., 2018	MG761729.1	<i>Marsilea crenata</i>	Nagalingam et al., 2007	GU536331.1
<i>Lomariopsis pollicina</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463235.1	<i>Lygodium radiatum</i>	Lehtonen, 2014	KJ167381.1	<i>Microlepis spelunca</i>	Luo et al., 2018	MK052119.1
<i>Lygodium japonicum</i>	Hasebe et al., 1994	U05632.1	<i>Macrothelypteris torresiana</i>	Rothfels et al., 2012	JF832170.1	<i>Microsorium musifolium</i>	Schnecker et al., 2004	AY362636.1
<i>Lygodium microphyllum</i>	Ebhara et al., 2010	AB574733.1	<i>Marsilea crenata</i>	Nagalingam et al., 2007	DQ643262.1	<i>Nephrolepis biserrata</i>	Hennsquin et al., 2010	HM748170.1
<i>Lygodium radiatum</i>	Wäström et al., 2001	AJ303417.1	<i>Microlepis spelunca</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463377.1	<i>Nephrolepis cordifolia</i>	Hennsquin et al., 2010	HM748172.1
<i>Macrothelypteris torresii</i>	Näta et al., 2017	KY099826.1	<i>Microsorium musifolium</i>	Chen et al., 2018	MH1665013.1	<i>Nephrolepis hirsutula</i>	Hennsquin et al., 2010	HM748173.1
<i>Marsilea crenata</i>	Nagalingam et al., 2007	DQ643296.1	<i>Nephrolepis biserrata</i>	Lehtonen et al., 2015	KM114089.1	<i>Odontosoria aculeata</i>	Lehtonen et al., 2012	HQ157333.1
<i>Microlepis spelunca</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463169.1	<i>Nephrolepis cordifolia</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF452041.1	<i>Odontosoria chinensis</i>	Xu et al., 2018	MG913608.1
<i>Microsorium musifolium</i>	Haufler et al., 2002	AF470333.1	<i>Nephrolepis hirsutula</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463483.1	<i>Oleandra articulata</i>	Lehtonen et al., 2019	NC044684.1
<i>Nephrolepis biserrata</i>	Näta et al., 2017	KY099834.1	<i>Odontosoria aculeata</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463479.1	<i>Oncoclea sensibilis</i>	Smith et al., 2002	AF425159.1
<i>Nephrolepis cordifolia</i>	Hasebe et al., 1994	U05637.1	<i>Odontosoria chinensis</i>	Lehtonen, 2014	KM114074.1	<i>Ophioglossum reticulatum</i>	Zhang et al., 2020	MF524802.1
<i>Nephrolepis hirsutula</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463237.1	<i>Oleandra articulata</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463481.1	<i>Osmunda japonica</i>	Metzgar et al., 2008	EF588765.1
<i>Odontosoria aculeata</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463233.1	<i>Oleandra nerififormis</i>	Dine et al., 2014	KJ196496.1	<i>Osmunda cinnamomea</i>	Kim et al., 2014	KF22592.1
<i>Odontosoria chinensis</i>	Xu et al., 2018	MG913608	<i>Oncoclea sensibilis</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463488.1	<i>Parathelypteris noveboracensis</i>	He et al., 2012	JN572196.1
<i>Oleandra articulata</i>	Moan et al., 2013	KF667645.1	<i>Ophioglossum reticulatum</i>	Wolf et al., 1997	U93825.2	<i>Pentarthidium intermedium</i>	Wei et al., 2013	KC254505.1
<i>Oleandra nerififormis</i>	Ding et al., 2014	KJ196815.1	<i>Osmunda japonica</i>	Xu et al., 2019	MK554796.1	<i>Pilularia novae-zelandiae</i>	Nagalingam et al., 2008	EF129716.1
<i>Oncoclea sensibilis</i>	Henry et al., 2013	KF186532.1	<i>Osmunda cinnamomea</i>	Kim et al., 2014	KF22592.1	<i>Plagiogyria japonica</i>	Pryer et al., 2001	AF313597.1
<i>Ophioglossum reticulatum</i>	Pryer et al., 2001	AF313582.1	<i>Parathelypteris noveboracensis</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463549.1	<i>Polypodium vulgare</i>	Nodot et al., 1995	X84137.2
<i>Osmunda japonica</i>	Yatabe et al., 1999	AB024947.1	<i>Pentarthidium intermedium</i>	Rothfels et al., 2012	JF832175.1	<i>Pteridium aquilinum</i>	Der et al., 2009	FJ17185.1
<i>Osmunda cinnamomea</i>	Kim et al., 2014	KF22592.1	<i>Pilularia novae-zelandiae</i>	Nagalingam et al., 2008	EU269700.1	<i>Pteris sylvatica</i>	Zhou et al., 2018	MG517567.1
<i>Parathelypteris noveboracensis</i>	Henry et al., 2013	KF186531.1	<i>Plagiogyria japonica</i>	Pryer et al., 2001	AF313547.1	<i>Pteris fauriei</i>	Zhang et al., 2013	MF92830.1
<i>Pentarthidium intermedium</i>	Gastony et al., 1996	U62031.1	<i>Polypodium vulgare</i>	Schuettpetz et al., 2007	EF463510.1	<i>Regnellidium diphyllum</i>	Nagalingam et al., 2007	DQ536357.1
<i>Pilularia novae-zelandiae</i>	Nagalingam et al., 2008	EU269708.1	<i>Pteridium aquilinum</i>	Wolf et al., 1997	U93835.2	<i>Rhachidosorus blattianus</i>	Li et al., 2011	JN168097.1
<i>Plagiogyria japonica</i>	Rai et al., 2010	EU352308.1	<i>Pteris sylvatica</i>	Liu et al., 2014	KF709479.1	<i>Rhachidosorus consimilis</i>	Li et al., 2011	JN168100.1
<i>Polypodium vulgare</i>	Hirohara et al., 2000	AB044899.1	<i>Pteris fauriei</i>	Zang et al., 2017	MF972664.1	<i>Saccoloma elegans</i>		