



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

***Culcita macrocarpa* Presl.: Posición filogenética y estudio de la biología reproductiva en poblaciones naturales de un helecho amenazado**

***Culcita macrocarpa* Presl.: Posición filoxenética e estudo da bioloxía reprodutiva en poboacións naturais dun fieito ameazado**

***Culcita macrocarpa* Presl.: Phylogenetic position and study of reproductive biology in natural populations of an endangered fern**

María Hermida Vázquez

Septiembre, 2020

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

ÍNDICE

RESUMEN	1
RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	7
MATERIAL Y MÉTODOS	8
1. <i>Análisis de la viabilidad de las esporas</i>	8
2. <i>Análisis filogenético</i>	11
RESULTADOS	13
1. <i>Análisis de la viabilidad de las esporas</i>	13
2. <i>Análisis filogenético</i>	15
DISCUSIÓN	18
1. <i>Análisis de la viabilidad de las esporas</i>	18
2. <i>Análisis filogenético</i>	19
CONCLUSIONES.....	21
CONCLUSIÓN.....	21
CONCLUSIONS	21
BIBLIOGRAFÍA	22
ANEXO 1.....	26

RESUMEN

Culcita macrocarpa es un helecho relicto que se encuentra amenazado debido a la desaparición de su hábitat. En este trabajo se analiza la viabilidad de las esporas como reflejo de la *fitness* poblacional y se relaciona con el tamaño de las poblaciones. Además, se analiza la posición filogenética de la especie dentro del Orden Cyatheales, al que pertenece. La viabilidad esporal se estimó mediante la toma de dos tipos de datos: por un lado, se realizó el recuento de las no viables tras la siembra, y por otro lado 74 días después. Para el análisis filogenético, se seleccionaron secuencias pertenecientes a las regiones plastídicas *rbcL*, *atpA* y *rps4*. Los resultados indican que la población de estudio presenta diferencias en la *fitness* con respecto a otras localidades analizadas en otros trabajos con idéntica metodología. El análisis filogenético muestra, en concordancia con datos previos, que *C. macrocarpa* se enclava en un clado monofilético junto con representantes de las familias Plagiogyriaceae y Loxsomataceae.

Palabras clave: análisis filogenético, *Culcita macrocarpa*, *fitness*, viabilidad.

RESUMO

Culcita macrocarpa é un feito relicto que se atopa ameazado debido á desaparición do seu hábitat. Neste traballo analízase a viabilidade das esporas como reflexo da *fitness* poboacional e relaciónase co tamaño das poboacións. Asemade, analízase tamén a posición filoxenética da especie dentro da Orde Cuatheales á que pertence. A viabilidade estimouse mediante a toma de dous tipos de datos: (i) realizouse o reconto das esporas non viables xusto tras a sementeira en placa; (ii) repetiuse o reconto unha vez transcorridos 74 días de incubación. Para a análise filoxenética, seleccionáronse secuencias pertencentes ás rexións plastídicas *rbcL*, *atpA* e *rps4*. Os resultados indican que a poboación de estudo presenta diferenzas na *fitness* con respecto ás poboacións comparadas. A análise filoxenético amosa, en concordancia con datos previos, que *C. macrocarpa* se atopa nun clado monofilético xunto con representantes das familias Plagiogyriaceae e Loxsomataceae.

Palabras clave: análise filoxenética, *Culcita macrocarpa*, *fitness*, viabilidade.

ABSTRACT

Culcita macrocarpa is a relict fern that is threatened due to habitat loss. In this work, we analyze the viability of spores as a *proxy* for reproductive *fitness* in a natural population of this endangered plant. The obtained results are subsequently analyzed in the light of population size and previous results obtained using the same methodology. As a second aim of this work, we assess the phylogenetic position of *C. macrocarpa* within Order Chytriales.

Viability was assessed by taking two types of data: on the one hand, we estimated the percentage of non-viable spores right after showing them. A second estimate was carried after 74 days culture period by measuring the percentage of germinated spores. As regards the phylogenetic analysis, three plastid hypervariable DNA regions, *rbcL*, *atpA* and *rps4*, were used. Our results indicate that the studied population presents differences in *fitness* with regards to other *C. macrocarpa* populations. Also, the phylogenetic analysis shows that *C. macrocarpa* is included in a monophyletic clade together with representatives of the families Plagiogyriaceae and Loxsomataceae.

Keywords: *Culcita macrocarpa*, *fitness*, phylogenetic analysis, viability.

INTRODUCCIÓN

Los helechos (Superclase Moniliformopses, Kenrick & Crane) son plantas vasculares, en su mayoría herbáceas, que no producen semillas y cuya unidad de dispersión son las esporas (Frey *et al.*, 2009). Se caracterizan por tener un ciclo vital digenético haplo-diplofásico, en el que se alternan una fase esporofítica, diploide, productora de esporas haploides por meiosis y una fase gametofítica haploide, el protalo, que produce gametos mitóticos y en la que tiene lugar una fecundación por oogamia semi-interna (Díaz *et al.*, 2004; Fig. 1). La existencia de gametos masculinos flagelados y el carácter talofítico de los gametófitos son los factores que más claramente determinan la dependencia del agua en el ciclo vital de este grupo (Díaz *et al.*, 2004; Sheffield, 2008).

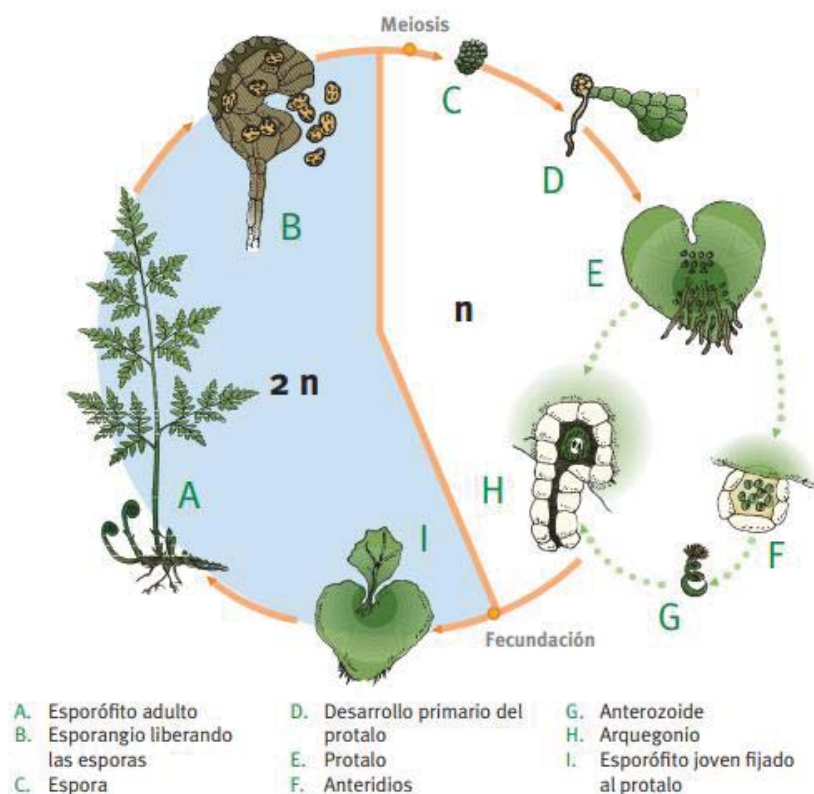


Figura 1.- Esquema del ciclo vital de un pteridófito isospóreo (tomado de Delgado & Plaza, 2006)

Filogenéticamente, los helechos monilófitos se consideran un grupo monofilético, constituido por 4 clases (Psilotopsida, Equisetopsida, Marattiopsida, Polypodiopsida), 11 órdenes y 37 familias (Smith *et al.*, 2006, Christenhusz *et al.*, 2011). La clase Polypodiopsida es con diferencia la más diversa del grupo, incluyendo siete órdenes, entre los cuales se encuentra el Orden Cyatheales que incluye a la gran mayoría de los helechos arborescentes, entre ellos los que constituyen la Familia Culcitaceae (Fig. 2).

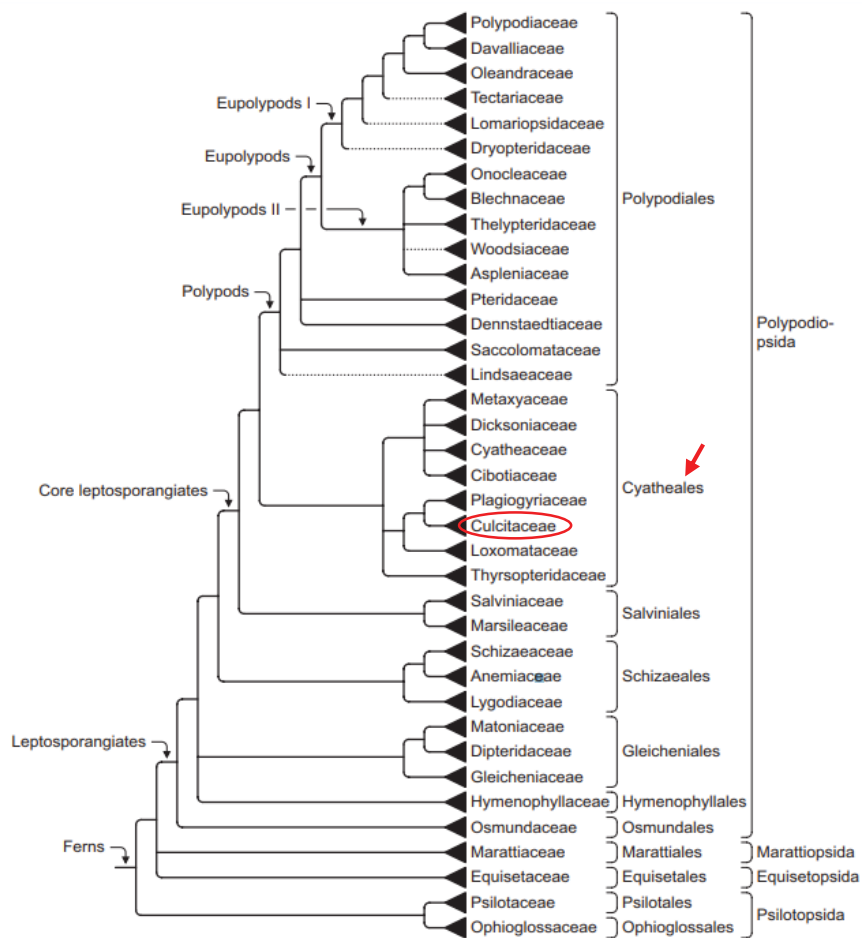


Figura 2.- Filogenia de los Pteridófitos (Tomado de Smith *et al.*, 2006)

El Orden Cyatheales es un grupo monofilético, que comprende 8 familias, con aproximadamente 500 especies. Se distribuyen principalmente en zonas tropicales, subtropicales y, en menor medida, templadas del Hemisferio Sur; siendo muy raros en las regiones templadas o frías del hemisferio norte (Christenhusz *et al.*, 2011). La familia Culcitaceae se caracteriza por presentar grandes frondes (hasta tres metros de longitud), 4-5 pinnado-pinnatífidas y con nervios bifurcados dicotómicamente. Los soros son marginales, con indusio bivalvo; los esporangios son piriformes y las esporas triletas y tetraedro globosas (Castroviejo, 1986; Ranker & Haufler, 2008). Se trata de una familia monogénica con tres especies, dos actuales [*Culcita macrocarpa* K.Presl y *C. conifolia* (Hooker) Maxon] y una fósil (*Culcita remberi*, Pinson, Manchester & Sessa, del Mioceno, hace 16-15.4 Ma; Pinson *et al.*, 2018).

Culcita macrocarpa, por sus características morfológicas y el nivel de amenaza al que está sometida, es considerada como una de las especies más significativas dentro de los relictos macaronésicos (Quintanilla *et al.*, 2000). Éstos, a nivel general, son especies de helechos que presentan afinidades climáticas subtropicales, y que han resistido en refugios templados los distintos

procesos de cambio climático que han tenido lugar en el S de Europa (Quintanilla *et al.*, 2000).

Presenta una distribución discontinua a lo largo de la zona Atlántica de la Península Ibérica (poblaciones de Cádiz, Norte de Portugal, Galicia, Asturias, Cantabria y Euskadi) y en la Macaronesia (Islas Canarias, Azores y Madeira; Fig. 3). Requiere hábitats con elevada humedad y temperaturas suaves durante todo el año, por ello se puede encontrar en bosques de ribera en laderas orientadas al norte, en valles generalmente cerrados, a baja altitud y a una distancia relativamente cercana a la costa (Quintanilla *et al.*, 2004).



Figura 3.- Mapa de distribución de *Culcita macrocarpa* (www.iucn.org)

La especie neotropical *Culcita connifolia* presenta un hábito postrado, raramente erecto y puede alcanzar de 1 a 3 m de largo. Crece principalmente en laderas montañosas y bosques nublados y húmedos, ocupando un rango entre 2000-3000m de altitud. Se distribuye por C y S América (Fig. 4): S. México, Mesoamérica, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia, S. Brasil, Antillas mayores excepto Puerto Rico (Tryon & Tryon, 1982).



Figura 4.- Mapa de distribución de *Culcita connifolia* (www.gbif.org)

Culcita macrocarpa es una especie protegida a nivel mundial por encontrarse en peligro de extinción (Bañares *et al.*, 2004, IUCN 2006), ya que factores ambientales y genéticos condicionan su supervivencia (Bañares *et al.*, 2004, Martín *et al.*, 2008, IUCN 2006). Además, la falta de conocimiento preciso sobre su ciclo vital limita las actuaciones para favorecer su conservación (Quintanilla *et al.*, 2000). Entre los factores más importantes que llevan a la desaparición de sus poblaciones están la fragmentación y alteración de sus hábitats y el cambio global del clima. En el caso particular de la Península Ibérica, la plantación intensiva de eucaliptos, la tala masiva de árboles que eliminan el dosel arbóreo o los incendios forestales provocan la disminución y fragmentación de sus poblaciones, provocando la erosión genética y disminuyendo así su adaptabilidad a los cambios ambientales (Quintanilla *et al.*, 2007). La manifestación fenotípica de este proceso puede ser la pérdida de *fitness* en los individuos y, por lo tanto de sus poblaciones, entendiendo esta pérdida como la disminución de la probabilidad de reproducción (Orr, 2009). Sin embargo, la respuesta a este fenómeno es especie-específica, y dependerá de las características de la historia vital del taxón (Rueda *et al.*, 2015).

Para poder conservar las especies es importante conocer las causas y los procesos que han originado los diferentes patrones de diversidad, es decir, la distribución y diversificación de sus poblaciones y linajes genéticos. Los avances en biología evolutiva van unidos al desarrollo de técnicas de análisis molecular que permiten profundizar en la genética de las poblaciones y establecer sus relaciones de parentesco (Ben-Menni, 2019). En el caso de los pteridófitos, el genoma cloroplástico ha resultado ser un marcador molecular muy útil para este tipo de estudios (Smith *et al.*, 2006, Christenhusz *et al.*, 2011). El análisis de los procesos reproductivos será también preciso para abordar con garantías los trabajos de conservación de las especies, especialmente de aquellas fases que resulten más limitantes para el desarrollo del ciclo.

En el presente trabajo se analizará, utilizando distintas regiones del genoma cloroplástico, la posición filogenética de *Culcita macrocarpa* (y la Familia Culcitaceae en general) con respecto a otros taxones dentro del Orden Cyatheales. Además, se analizará la viabilidad de las esporas de *C. macrocarpa* como aproximación a la *fitness* de la población. Los resultados obtenidos se compararán con los procedentes de otras poblaciones ibéricas de esta especie.

OBJETIVOS

1. Comparar la viabilidad de las esporas estimada mediante su análisis óptico directo frente a lo observado en pruebas de germinación controlada.
2. Comprobar la relación entre tamaños poblacionales y viabilidad de las esporas, comparando lo observado en este trabajo con resultados previos procedentes de otras poblaciones.
3. Analizar la posición filogenética de *Culcita macrocarpa* en el contexto de las familias de helechos pertenecientes al Orden Cyatheaales, para poner de manifiesto su relación con otras especies próximas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Análisis de la viabilidad de las esporas

1.1. Materia vegetal

El material utilizado en este estudio se obtuvo de una población de *Culcita macrocarpa* situada en Landoi (Cariño, A Coruña; Tabla 1). Se ha escogido esta localidad por albergar la mayor población de esta especie existente en toda su área de distribución ibérica (Betancourt, 2018), además de presentar unas características ambientales especialmente adecuadas para el desarrollo de helechos relictos, encontrándose cuando menos otras 4 especies en esta zona (Amigo, 2005). Esta localidad se caracteriza por presentar un clima Atlántico Europeo según la clasificación de Allué (Estación Meteorológica de A Estaca de Bares; Carballeira *et al.*, 1983). En lo que se refiere a su geología, el cauce del río Landoi discurre por la ladera N de la Sierra da Capelada, que muestra una gran complejidad geológica y en la que dominan gneises y eclogitas del Precámbrico-Cámbrico (IGME, 1974). La roca subyacente y las características climatológicas determinan la existencia de un suelo de tendencia ácida (pH: 4-6; Departamento de Edafología e Química Agrícola da Universidade de Santiago, rgis.cesga.es). Los suelos de la localidad a estudio son poco desarrollados, de tipo cambisol úmbrico o regosol úmbrico (Macías & Calvo de Anta, 2011).

Tabla 1. Descripción de la población de *C. macrocarpa* seleccionada para el estudio. El número de placas hace referencia al número de individuos cuyas esporas fueron sembradas.

Localidad	Coordenadas	Altitud	Tamaño población	Nº placas	Fecha siembra
Landoi (Cariño)	43°41'58"N 7°54'28"O	280m	+5000ram	13	09/03/2020

Los individuos fueron recolectados en su hábitat natural el día 15/01/2020. Se recogieron un total de 15 fragmentos de frondes con los soros todavía inmaduros, presentando un color verdoso-pardo. Los fragmentos se guardaron en sobres de papel individuales. Al llegar al laboratorio, dichos fragmentos de frondes se colocaron entre hojas de papel de filtro con un ligero peso encima y a temperatura ambiente, lo que favorece la apertura de los soros y la liberación de las esporas. Una vez transcurrida una semana, se procedió a filtrar las esporas obtenidas mediante un tamiz de 100 µm de diámetro con el objetivo de eliminar restos vegetales, fundamentalmente restos de esporangios. Finalmente,

las esporas se guardaron en tubos de plástico estériles debidamente etiquetados y se conservaron en el congelador a -40° hasta el momento de la siembra.

1.2. Cultivo de las esporas *in vitro*

El cultivo de esporas (Fig. 5) se realizó en placas de Petri en medio mineral (Dyer, 1983), que incluye: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,51 g/l); $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,44 g/l); KNO_3 (0,12 g/l); KH_2PO_4 (0,25 g/l); $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,017 g/l). Se añadió 1,5% de agar y 10 U/ml del antifúngico Nistatina disuelta en 1ml de Dimetilsulfóxido (Quintanilla *et al.*, 2002).

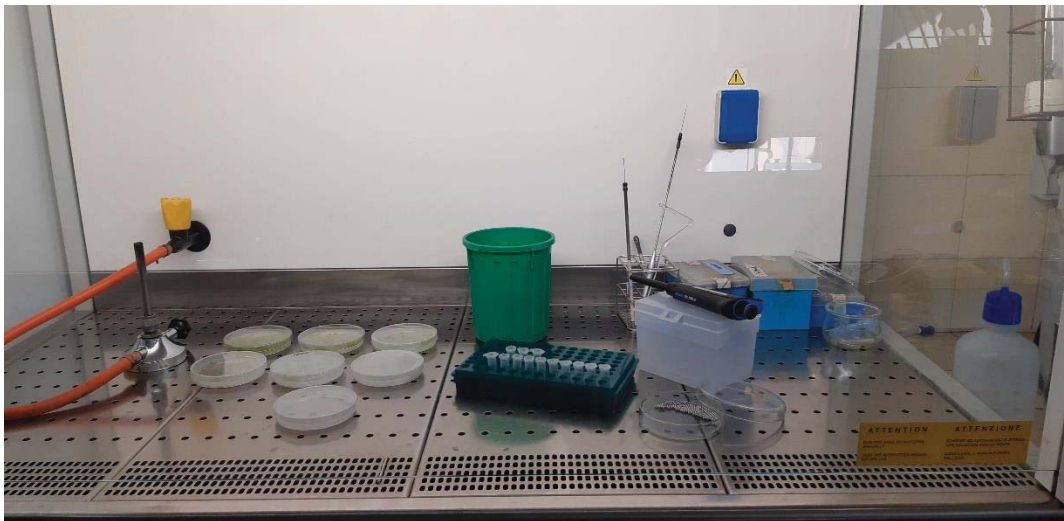


Figura 5.- Material utilizado para el cultivo en cámara de flujo laminar.

Las siembras se realizaron con un preparado de esporas (inóculo) de cada individuo de la población. Con este inóculo se pretende la dispersión de las esporas, paso imprescindible, pues nos ayudará posteriormente al recuento de las mismas. El inóculo se elaboró en tubos *ependorf*, a los que se añadió 1ml de medio de cultivo líquido, una pequeña cantidad de detergente (*tween*, que permite la disgregación de las esporas rompiendo su hidrofobia) y las esporas. Este contenido se vertió en las placas de Petri y se repartió de manera uniforme utilizando esferas de vidrio estériles autoclavadas. El proceso de siembra se realizó en cámara de flujo laminar para evitar la contaminación. Antes de la siembra se igualó la concentración de esporas de los distintos inóculos mediante diluciones seriadas y mediante el uso de una cámara de Neubauer. Aproximadamente, se sembraron 7,5 mg de esporas por placa.

Una vez realizada la siembra, las placas se llevaron a la cámara de cultivo, donde se mantuvieron a 24°C .

1.3. Análisis de viabilidad

La viabilidad de las esporas se empleó como aproximación a la *fitness* de la población de *C. macrocarpa*, en línea con lo ya realizado en previos estudios del laboratorio de Flora Terrestre de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña (Fernández- Martínez, 2019; Martínez-Veiga, 2020). La viabilidad se estimó mediante la toma de dos tipos de datos: (i) En un primer momento, justo tras la siembra de las esporas, se realizó el recuento de aquellas claramente no viables por estar rotas o malformadas (Fig. 6), siguiendo el procedimiento indicado por Quintanilla *et al.* (2002). (ii) Posteriormente, al cabo de 74 días desde el inicio del cultivo, se observaron los porcentajes de germinación mediante el recuento de 100 esporas por placa con la ayuda de un microscopio estereoscópico. En el recuento, se consideraron germinadas (Fig. 7) aquellas esporas en las que ya se habían producido las primeras divisiones celulares.



Figura 6.- Esporas viables y no viables

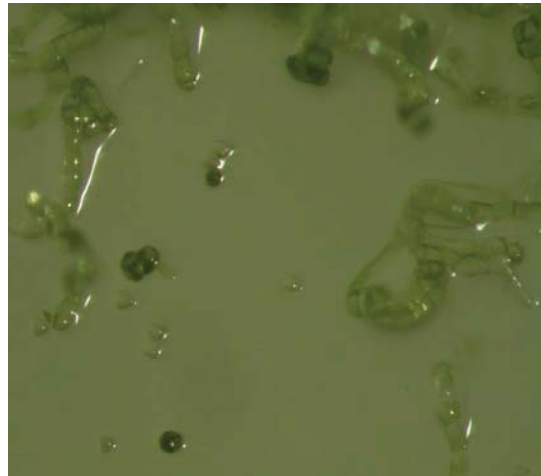


Figura 7.- Esporas germinando

1.4. Análisis de datos

Los datos recogidos para los individuos de la población analizada fueron objeto de un análisis exploratorio básico que incluyó la estima de la media, mediana, desviación típica y coeficiente de variación. Asimismo, se realizó un análisis gráfico de los datos mediante la construcción de un diagrama de cajas. Habiéndose realizado el análisis de una única población debido a las limitaciones impuestas en el mes de marzo por la pandemia de Sars-Covid-19. Se llevó a cabo la comparación con datos previos obtenidos en otros trabajos realizados por Martínez-Veiga (2020) y Fernández-Matínez (2019).

2. Análisis filogenético

2.1. Obtención de las secuencias

Para realizar el análisis filogenético, se seleccionaron secuencias pertenecientes a las regiones plastídicas *rbcL*, *atpA* y *rps4*. Se escogieron estas regiones por tener una buena representación en repositorios públicos (principalmente GenBank) para la C1. Polypodiopsida, la más diversa dentro de los helechos modernos (Frey *et al.*, 2009). En total se descargaron 198 secuencias de GenBank, pertenecientes a las mismas regiones para 69 especies del Orden Cyatheaales, al que pertenece el género *Culcita*. En concreto, 6 secuencias correspondientes al género *Culcita*, 3 para *C. macrocarpa* y 3 para *C. conifolia*, como grupo externo se escogió el género *Polypodium* (Polypodiopsida, Polypodiales), que ocupa una posición externa, pero próxima a las Cyatheaales (Qi *et al.*, 2018). Las secuencias empleadas en el estudio se incluyen en el Anexo 1.

Las secuencias obtenidas se ordenaron en matrices independientes (una para cada uno de los genes). El análisis filogenético preliminar realizado mostró que no existían diferencias topológicas entre las filogenias, por lo que las secuencias fueron concatenadas empleando el programa Mesquite (Maddison & Maddison, 2019) y analizadas conjuntamente siguiendo a Lema-Suárez *et al.* (2018).

2.2. Análisis realizados

Las secuencias obtenidas, en formato FASTA, se alinearon mediante el servidor web MAFFT (Nakamura *et al.*, 2018) y el algoritmo FFT-NS-1. Una vez alineadas, se utilizó el programa mesquite v. 3.61 (Maddison & Maddison, 2019).

Tal y como se indicó anteriormente, las filogenias se hicieron sobre las matrices de regiones individuales (*rbcL*, *atpA* y *rps4*) y sobre la matriz plastídica concatenada. Se realizaron dos tipos de análisis filogenéticos, el de máxima parsimonia, para el que se empleó el software PAUP*4.0b10 (Swofford., 2002) y el análisis bayesiano, para el que utilizamos el programa MrBayes-3.2.7 (Roquist *et al.*, 2012). Se emplearon las dos metodologías para verificar la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Los análisis de Máxima Parsimonia realizados en PAUP*4.0b10 (Swofford., 2002) incluyeron una búsqueda heurística de los árboles más parsimoniosos donde se analizaron los valores de *bootstrap* frente a 1000 repeticiones. Los árboles más parsimoniosos se construyeron mediante el método del *stepwise addition*, que añade secuencias de manera aleatoria y emplea una permutación de ramas tipo TBR (*tree bisection reconnection*). Consideramos que las ramas tienen un fuerte apoyo estadístico cuando el porcentaje de *bootstrap* es $\geq 90\%$.

El análisis Bayesiano requiere el establecimiento previo de *priors* que integran la información de la que se dispone alrededor de nuestras secuencias,

estimándose la probabilidad *a posteriori* de las distintas topologías posibles mediante el uso de cadenas de Markov (MCMC). Se realizaron dos análisis independientes empleando en cada uno de ellos cuatro cadenas de Markov. La convergencia de los resultados se comprobó mediante el propio programa MrBayes. Se utilizó el programa MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004) para seleccionar el modelo de evolución de las secuencias. El modelo de sustitución fue el GTR (*General Time Reversible*)+I+G para todas las regiones. El análisis bayesiano se efectuó en el servidor *Cipres Science Gateway* (San Diego Supercomputer Center; <https://www.phylo.org/portal2/login!input.action>, accedido el 13/07/20 y 14/07/20). Los árboles filogenéticos obtenidos fueron editados con el programa FigTree v. 1.4.4 (Rambaut, 2010).

RESULTADOS

1. Análisis de la viabilidad de las esporas

En la tabla 2 se muestran los datos de esporas no viables observadas al principio del estudio, es decir, en el recuento realizado 2 días después de sembrar las 13 placas. En esta población la media de esporas no viables, resultado de la observación visual directa, sería del 25,15% aunque se detectaron diferencias entre los distintos individuos sembrados (Tabla 2, Fig. 8). De estos datos se deduce que podrían germinar un elevado porcentaje de esporas, en torno al 75%.

Tabla 2.- Porcentaje de esporas no viables (2 días después de la siembra) y germinadas (74 días tras la siembra) en los 13 individuos analizados de la población de Landoi (Cariño).

Individuos analizados	% esporas no viables (2 días siembra)	% esporas germinadas (74 días siembra)
C2.1	14	72
C2.2	18	41
C2.3	22	92
C2.4	24	78
C2.5	31	90
C2.6	28	91
C2.7	16	96
C2.8	24	91
C2.9	29	38
C2.10	27	14
C2.11	32	59
C2.12	35	62
C2.13	27	93
media	25,15	70,54

En la observación de la germinación 74 días después de la siembra (Tabla 2, Figura 8), la media de germinación es ligeramente inferior a la pre-establecida inicialmente, del 70,5% frente al 75% (Tabla 2). Asimismo se puede comprobar que el porcentaje de esporas germinadas presenta una elevada variabilidad entre las distintas placas y que no siempre los individuos que presentan valores bajos de esporas no viables tendrán porcentajes de germinación elevados (p. ej. individuo 2 y 9, Fig. 8).

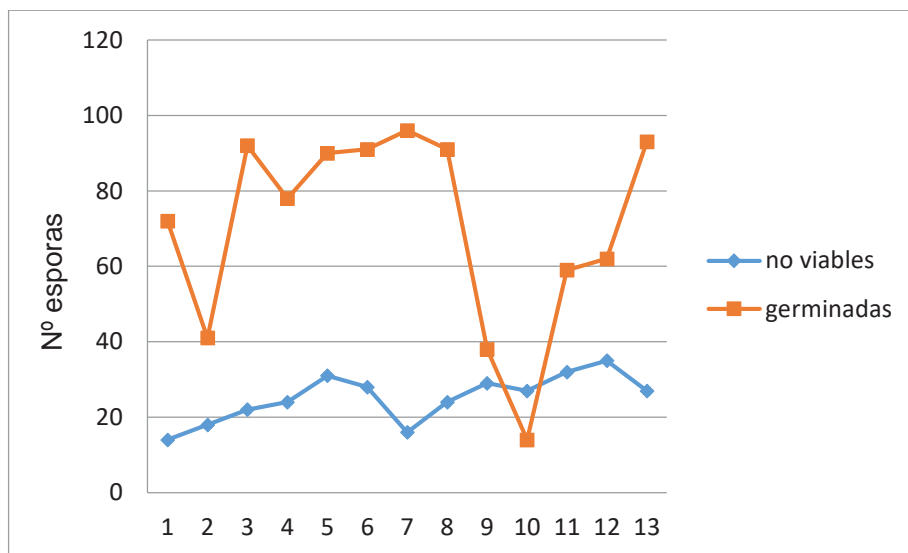


Figura 8.- Diagrama de dispersión comparando porcentajes de viables y germinadas entre los 13 individuos de la población de Landoi (2020).

Con los datos reales de germinación, es decir, los observados al cabo de 74 días, se estimó la media, la desviación estándar y el intervalo de confianza al 95% (Tabla 3). Estos resultados reflejan el variable funcionamiento de los individuos analizados en esta población. Si se comparan estos datos con los observados por Martínez-Veiga*¹ (2020) en una población de Galicia y otra en el País Vasco, o con Fernández-Martínez *² (2019) en la misma población de Landoi se pone de manifiesto la elevada variabilidad en cuanto a la capacidad de germinación de las esporas en las poblaciones gallegas con respecto a las vascas. Los nuevos datos obtenidos para la población de Landoi son coincidentes con los de 2019, aunque la media es más elevada (70,5% frente al 59%), es un valor que entraría dentro del intervalo de confianza esperado (Tabla 3, Fig. 9).

Tabla 3.- Análisis exploratorio de la viabilidad de esporas comparado con Martínez-Veiga*¹ (2020) y Fernández-Martínez*² (2019). Desv. Est.= desviación estándar, Int. Cf.= intervalo de confianza

Población	Media	Desv. Est.	Int. Cf.
Landoi (Cariño)	0.705	0.026	0,563-0,841
Rego de Caldeliñas, Parque Natural das Fragas do Eume* ¹	0.274	0.097	0,189-0,359
Artike (Bermeo, Vizcaya)* ¹	0.904	0.002	0,902-0,906
Landoi* ²	0.590	0.120	0,550-0,630

Aunque no se pueden establecer comparaciones dado el número de muestras y los pocos individuos analizados, en la Figura 9 se observa que las poblaciones gallegas del Eume y de Landoi presentan mayor dispersión de sus valores, siendo la población del Eume la que tiene mayor diversidad y una mediana más baja. La población de Landoi presenta valores extremos amplios pero los datos de los individuos se encuentran más concentrados en un rango menor. Por otro lado, la población de Artike en el País Vasco, tiene un rango de variabilidad bajo, estando muy concentrados sus valores, además de presentar una mediana más elevada que las otras dos poblaciones.

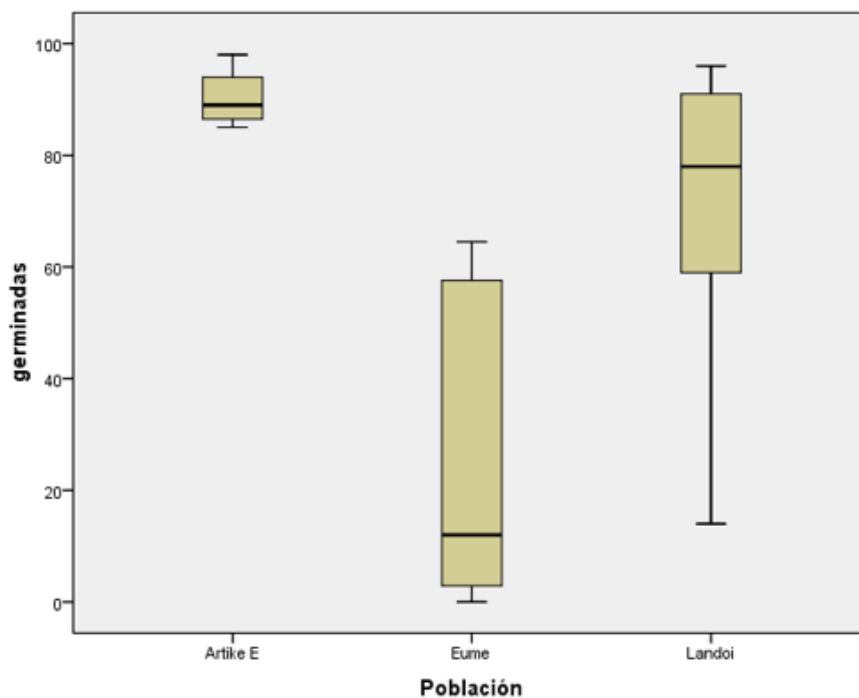


Figura 9.- Diagrama de cajas comparando la *fitness* de tres poblaciones de *Culcita macrocarpa*.

2. Análisis filogenético

Los resultados obtenidos en el análisis filogenético concatenando tres genes plastídicos (*atpA*, *rbcL* y *rps4*), para 71 especies de pteridófitos, y aplicando Máxima Parsimonia y Estadística Bayesiana son coincidentes. Por ello, para representar los resultados se seleccionó el árbol elaborado en base al análisis Bayesiano que presenta un mejor apoyo estadístico en sus clados (Fig. 10) y concuerda con las filogenias publicadas para pteridófitos (Qi *et al.*, 2018). En la Figura 10 se indican en color rojo las ramas que presentaron un *bootstrap* inferior al 80%.

Dentro del Orden Cyatheaales se separan dos clados hermanos (A y B; Fig. 10), apareciendo como grupo basal a todo el Orden la especie *Thyrsopteris elegans* (Kunze). Los clados A y B son monofiléticos. En el clado A se incluyen los representantes de la Familia Culcitaceae, como hermana de la Familia Plagiogyriaceae y como grupo basal a ambas familias aparecen taxones de la Familia Loxsomataceae.

En el clado B se produce una politomía, en la que se establecen 4 subgrupos (B1, B2, B3 y B4) todos ellos coincidentes con familias de pteridófitos reconocidas en la actualidad como monofiléticas. El subgrupo B1 constituido por la familia Dicksoniaceae, junto a los representantes de los géneros *Calochaena* y *Lophosoria*, que en este árbol aparece como hermano dentro de Dicksoniaceae. Una de las secuencias bajadas de *C. coniiifolia* se incluye en este clado (junto con *Calochaena*). Sin embargo, la realización de una prueba de semejanza de secuencias (Blast; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mostró que se trata de un problema de identificación de muestras. El clado B2 está constituido únicamente por los taxones de la familia Cibotiaceae, que es monogenérica e incluye solo el género *Cibotium* y el clado B3 por los representantes de la familia Metaxyaceae, también monogenérica con el género *Metaxya*. Por último, estaría el amplio subgrupo, B4 formado por taxones pertenecientes a 4 géneros (*Sphaeropteris*, *Alsophila*, *Cyathea* y *Gymnosphaera*) pertenecientes a la familia Cyatheaaceae.



Figura 10.- Árbol filogenético procedente del análisis Bayesiano con la matriz concatenada de los genes *rbcL*, *rps4* y *atpA*. En color rojo las ramas que presentan un *bootstrap* inferior al 80%.

DISCUSIÓN

1. Análisis de la viabilidad de las esporas

Los pteridófitos suelen vivir en ambientes con unas condiciones de temperatura y humedad muy concretas, que si sufren grandes cambios, afectan a la supervivencia de sus poblaciones (Delgado & Plaza, 2006). Se sabe que la producción y germinación de las esporas está muy influenciada por la temperatura, la humedad y la cubierta arbórea (Arens, 2001). Por esto, a pesar de que los helechos producen gran cantidad de esporas, lo que les permitiría ocupar amplias áreas, la germinación de las mismas podría ser el primer factor limitante para aumentar su distribución y la densidad de sus poblaciones (Quintanilla *et al.*, 2000).

En el análisis realizado con *Culcita macrocarpa* se observó que el porcentaje medio de esporas no viables, tras la observación de la morfología de las esporas al comienzo del estudio, fue del 25,15% (Tabla 2). Este resultado es superior al observado por Martínez-Veiga (2020), que señala porcentajes del 19,57% para una población en el País vasco (Artike) y del 19,6% para otra en Galicia (Fragas do Eume). En cambio el número de esporas germinadas en la población estudiada al cabo de 74 días de cultivo fue del 70,5%, un valor bastante más elevado si se compara con lo observado por Martínez-Veiga (2020) para la población de Galicia (Fragas do Eume), con 27,4% y más bajo con relación a la población del País Vasco (Artike) con un 90,4% (Tabla 3).

En ambos casos, las dos poblaciones gallegas, tanto la del estudio como los datos obtenidos por Martínez-Veiga (2020) indican un rango de variación amplio en su capacidad de germinación, mientras que la población vasca es más homogénea (Fig. 9). Estas diferencias observadas se podrían explicar por las poblaciones de Galicia (junto con las de Asturias) presentan una baja diversidad genética y una alta clonalidad con respecto a las poblaciones vascas (Delgado & Plaza, 2006), las cuales muestran una mayor diversidad, lo que hace que tengan una mayor capacidad de respuesta frente a variaciones ambientales. La discrepancia de viabilidad de esporas observadas entre las dos poblaciones gallegas (Landoi frente a Eume) se podría explicar por las diferencias medioambientales existentes en ambas localidades (Quintanilla *et al.*, 2000). Así por ejemplo, nos encontramos con dos localidades a diferentes altitudes (Landoi a 280m y Fraga Pequeña a 90m), y es sabido que la amplitud térmica se incrementa con la altitud (Carballeira *et al.*, 1983), por lo que los individuos de la población de Landoi estarían más condicionados en su capacidad reproductiva. No obstante, hay que tener en cuenta que aunque la temperatura juega un papel crucial en la viabilidad de las esporas del género *Culcita* hay otros factores ambientales importantes que también cabe resaltar, como son la humedad, la pendiente y la exposición a la luz, además de las causas genéticas, que no se

han tenido en cuenta en este estudio y que en su conjunto pueden tener más influencia que únicamente la temperatura (Quintanilla *et al.*, 2000).

2. Análisis filogenético

Los antiguos linajes de plantas y animales que hoy en día se distribuyen por el hemisferio sur, son considerados reliquias del supercontinente Gondwana, el cual comenzó a dividirse hace unos 145-110 millones de años (Noben, 2017). Un ejemplo de esto, son los helechos arbóreos pertenecientes al Orden Cyatheaales, cuyo registro fósil indica un origen en el Jurásico tardío (163- 145 Ma), o incluso en el Triásico temprano (252-247 Ma), donde los helechos arbóreos de este orden eran componentes importantes de las comunidades vegetales (Noben, 2017). Según el resultado obtenido, los representantes del Orden Cyatheaales incluidos en este estudio conforman un grupo monofilético hermano del Orden Polypodiales. Este resultado coincide con otros estudios filogenéticos publicados utilizando distintas secuencias de genes plastídicos y nucleares (Schuettpelz & Pryer 2007, Qi *et al.*, 2018). Sin embargo, aunque el Orden está bien definido genética, morfológica y biogeográficamente, no se han identificado sinapomorfías morfológicas evidentes que permitan caracterizar los distintos clados “monofiléticos” que se establecen dentro del Orden. Estos grupos definen las familias pero en ellas se incluyen especies con diferentes características morfológicas, así hay especies que tienen tallos formando un tronco erguido y otras con rizomas rastreros, algunas con pelos en tallos y hojas y otras tienen escamas, los esporangios se agrupan en soros que pueden ser marginales o abaxiales y que pueden estar protegidos por indusio o no, así mismo, las esporas pueden ser globosas o tetraedro-globosas triletas (Smith *et al.*, 2006).

Las relaciones filogenéticas obtenidas entre las dos especies del género *Culcita* (*C. macrocarpa* y *C. conifolia*) incluidas en este estudio, con especies de otros géneros del Orden Cyatheaales (Fig. 10), están en concordancia con las observadas por otros autores (Korall 2006, Adjie 2014, Wolf 2018, Schuettpelz & Pryer 2007, Smith *et al.*, 2006, Sosa *et al.*, 2016). Así, aunque estas dos especies fueron incluidas anteriormente en la Familia Dicksoniaceae, los resultados filogenéticos apoyan su separación independiente formando Culcitaceae. Además están estrechamente relacionadas con especies de la Familia Plagiogyriaceae (*Plagiogyria japonica*, *P. euphledia*, *P. pectinata*) y tienen como grupo basal las especies de la Familia Loxsomataceae (*Loxsuma cunninghamii*, *Loxsomopsis pearcei*) formando en su conjunto un clado monofilético; esta observación ya fue señalada por otros autores (Schuettpelz & Pryer 2007, Korall *et al.*, 2006, Sosa *et al.*, 2016). Pero, al igual que ocurre con el Orden Cyatheaales, el estudio genético que apoya este clado monofilético, que incluye las 3 familias, no se ve apoyado ni por características morfológicas ni por

su distribución geográfica. La Familia Culcitaceae (2 especies) se distribuye por el suroeste de Europa y las regiones macaronésica y neotropical, presenta rizomas postrados o ascendentes, solenostélicos con pelos articulados, esporas tetraedro-globosas y soros al final de las venas con parafisis, protegidos por indusio. La familia Plagiogyriaceae (11-42 especies) se distribuye en las regiones tropicales y cálido-templadas de Asia y América, presenta rizomas postrados o erectos sin pelos ni escamas, soros sin indusio y esporas tetraédricas triletas. La Familia Loxsomataceae (2 especies) se distribuye por los andes sudamericanos, el sur de América central y Nueva Zelanda, presenta rizomas rastreros, solenostélicos con pelos, soros marginales con indusio y esporas tetraédricas triletas (Smith *et al.*, 2006).

Uno de los aspectos que más llama la atención es la distribución geográfica discontinua que presentan las dos especies del género *Culcita* (Fig. 3 y 4). Para explicar este fenómeno, hay que tener en cuenta que los helechos actuales son el remanente que ha llegado a nuestros días de aquellos primeros vegetales con sistema vascular, hace unos 500 millones de años, y que posteriormente fueron desplazados por las plantas con flor por su mayor eficacia biológica (Amigo, 2005), quedando los helechos como un grupo en recesión. *Culcita* forma parte de un colectivo florístico, considerado relicto macaronésico, es uno de los representantes de la flora subtropical que debió cubrir también Galicia durante el período Terciario, cuando existían unas condiciones climáticas más cálidas y húmedas que las actuales, pero que fue desplazada por las glaciaciones posteriores, quedando sólo unas pocas poblaciones (reliquias o relictos) en lugares con condiciones medio-ambientales similares al original (Amigo, 2005). Sermolli *et al.* (1988) indican una serie de especies que tenían diferentes afinidades biogeográficas y que estaban presentes en el mediterráneo durante el Terciario. Así definen dos grupos de taxones: aquellos de marcado carácter paleotropical, que sobreviven en lugares relictos en donde las condiciones ecológicas son similares a las reinantes en el Mioceno como es el caso de *C. coniiifolia* y aquellos que sufrieron un proceso de especiación probablemente durante el Mioceno en la Región Mediterránea, como *C. macrocarpa*, que constituyen los denominados “relictos macaronésicos”. La remota proximidad de los archipiélagos al continente africano y europeo permitió durante un período climático propicio la colonización de dichas islas por este tipo de flora continental. Los posteriores eventos climáticos y geológicos han restringido estos elementos a donde existen condiciones ecológicas similares a las del Mioceno.

CONCLUSIONES

1. Existen diferencias entre el número de esporas no viables observadas inicialmente y el número de esporas germinadas tras pruebas controladas, además, el comportamiento de los individuos dentro de la población es muy variable.
2. Observamos que existen diferencias entre el tamaño poblacional y la viabilidad de las esporas si comparamos nuestra población con otras ya estudiadas, lo que podría deberse tanto a factores endógenos como ambientales.
3. El análisis filogenético muestra que *C. macrocarpa* está estrechamente relacionada con especies de la Familia Plagiogyriaceae y tienen como grupo basal especies de la Familia Loxomataceae formando en su conjunto un clado monofilético, de complejas afinidades biogeográficas y morfológicas.

CONCLUSIÓNS

1. Existen diferenzas entre o número de esporas non viables observadas inicialmente e o número de esporas xerminadas tralo período de incubación. Ademais, o comportamento dos individuos dentro da poboación é moi variable.
2. Observamos que existen diferenzas entre o tamaño poboacional e a viabilidade das esporas se comparamos a nosa poboación con outras xa estudadas.
3. A análise filoxenética amosa que *C. macrocarpa* está estreitamente relacionada con especies da Familia Plagiogyriaceae, e ambas teñen como grupo basal especies da Familia Loxomataceae formando no seu conxunto un clado monofilético, de complexas afinidades bioxeográficas e morfolóxicas.

CONCLUSIONS

1. A big difference was observed between the percentage of viable spores observed at the beginning and at the end of the culture period (74 days). Besides, the behavior of the different specimens analyzed is very variable.
2. There are differences between population size and spore viability if we compare our population with others already studied.
3. *Culcita macrocarpa* forms a monophyletic clade with Families Plagiogyriaceae and Loxomataceae. This latter family is sister to the other two.

BIBLIOGRAFÍA

- Adjie, B., & Lestary, W. S. (2014). A phylogenetic placement of Dicksonioid fern *Calochlaena javanica* (Dicksoniaceae). *Floribunda*. 5:17-20.
- Amigo, J. (2005). Los helechos en el noroeste ibérico y su interés para la conservación. Lugo, Galicia: Instituto de Biodiversidad Agraria y Desarrollo Rural. 2:11-22.
- 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.
- Bañares, Á., Blanca, G., Güemes, J., Moreno, J.C., & Ortiz, S. (2004). *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid.
- Ben-Menni, S. S. (2019). Diversidad genética y modelo bioogeográfico de cuatro especies de helechos relictos del Terciario. Universidad de Granada. Granada.
- Betancourt, Z. (2018). Descripción, caracterización del biotopo e identificación de amenazas de los núcleos poblacionales de la especie de helecho *Culcita macrocarpa*, relicto macaronésico del Parque Natural Fragas do Eume (Trabajo de Fin de Máster). Universidade da Coruña. A Coruña.
- Carballeira, A., Devesa, C., Retuerto, R., Santillán, E., & Uceda, F. (1983). *Bioclimatología de Galicia* (2 vols.). Fundación Pedro Barrié de la Maza. A Coruña.
- Castroviejo, S., Lainz, M., López-González, G., Montserrat, P., Muñoz Garmendia, F., Paiva, J., & Villar, L. (Eds) (1986). *Flora ibérica*. Madrid: Real Jardín Botánico. 1: 79-80.
- 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.
- Delgado, A. J. & Plaza, L. (2006). *Helechos amenazados de Andalucía*. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía. Sevilla.
- Díaz, S., Hodgson, J. G., Thompson, K., Cabido, M., Cornelissen, J. H. C., Jalili, A., Montserrat-Martí, G., Grime, J. P., Zarrinkamar, F., Asri, Y., *et al.* (2004). The plant traits that drive ecosystems: evidence from three continents. *Journal of Vegetation Science*. 15: 295–304.
- 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- Martínez, E. (2019). Análisis de la viabilidad de las esporas en poblaciones del helecho relicto amenazado *Culcita macrocarpa*. Trabajo fin de grado. Universidade da Coruña. A Coruña.

Frey, W., Stech, M., & Fischer, E. (2009). *Syllabus of Plant Families. Bryophytes and Vascular Plants*. Borntraeger.

Instituto Geológico y Minero de España. (1974). Mapa geológico de España Hoja 6- 2. Gobierno de España. Madrid.

IUCN. 2006. Fichas de caracterização ecológica e de gestão/Flora. Available at: http://www.icn.pt/psrn2000/caract_flora.htm.

Korall, P., Pryer, K. M., Metzgar, J. S., Schneider, H., & Conant, D. S. (2006). Tree ferns: monophyletic groups and their relationships as revealed by four protein-coding plastid loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 39: 830-845.

Lema-Suárez, I., Sahuquillo, E., Loureiro, J., Castro, S. & Pimentel, M. (2018). A taxonomic and evolutionary review of the South American Hierochloë section Monoecie (Poaceae: Anthoxanthinae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 186(3): 389-413.

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.

Macías Vázquez F. & Calvo De Anta, R. (2011). Los suelos. *Atlas de Galicia*. 1: 642-2001.

Maddison, W. P. & D. R. Maddison. (2019). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.61 <http://www.mesquiteproject.org>.

Martín, J. L., Arechavaleta, M., Borges, P. A. V., Faria, B. (eds). (2008). Top 100. Las 100 especies amenazadas prioritarias de gestión en la región europea biogeográfica de la Macaronesia [100 threatened species for priority actions in the European biogeographic region of Macaronesia]. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial, Gobierno de Canarias. 500 pp.

Martínez- Veiga, E. (2020). Los helechos relictos del Terciario en Galicia: Análisis y estudio ecológico de las poblaciones de *Culcita macrocarpa* Presl. en la Península Ibérica. Trabajo fin de grado. Universidade da Coruña. A Coruña.

Nakamura, Yamada, Tomii, Katoh. (2018). (*Bioinformatics* 34: 2490-2492) Parallelization of MAFFT for large-scale multiple sequence alignments.

Noben, S., Kessler, M., Quandt, D., Weigand, A., Wicke, S., Krug, M., & Lehnert, M. (2017). Biogeography of the Gondwanan tree fern family Dicksoniaceae- A

tale of vicariance, dispersal and extinction. *Journal of Biogeography*. 44: 2648-2659.

Nylander, J. A. A. (2004). Mr Modeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Orr, H. A. (2009). Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nature Reviews Genetics*. 10(8): 531–539.

Pichi Sermolli R. E. G., España, L., & Salvo, E. (1988). El valor biogeográfico de la pteridoflora ibérica. *Lazaroa*. 10: 187-205.

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.

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.

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., 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 España: 662-663. 2a Ed. Dirección General para la Biodiversidad. MMA. 1069 pp.

Quintanilla, L. G., Pajarón, S., Pangua, E., & Amigo, J. (2000). Effect of temperature on germination in northernmost 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 Systematic and Evolution*. 263: 135-144.

Rambaut, A. (2010). FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.

Ranker, T. A. & Haufler, C. H. (2008) Biology and evolution of ferns and lycophytes. Cambridge University Press.

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark P, Ayres, D. L., Darling A, Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models *Syst. Biol.* May, 61(3): 539-42. doi: 10.1093/sysbio/sys029.

- Rueda, M., Saiz, J. C. M., Morales-Castilla, I., Albuquerque, F. S., Ferrero, M., & Rodríguez, M. Á. (2015). Detecting fragmentation extinction thresholds for forest understory plant species in Peninsular Spain. *PloS ONE*, 10(5): e0126424.
- Schuettpelz, E. & Pryer, K. M. (2007). Fern phylogeny inferred from 400 leptosporangiate species and three plastid genes. *56* (4):1037-1050.
- Sheffield E. (2008). Alternation of generations. In Ranker T. A. & Haufler C. H. (eds.) *Biology and evolution of ferns and lycophytes*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Smith, A. R., Pryer, K. M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H., & Wolf, P. G. (2006). A classification for extant ferns. *55*: 705-731.
- Sosa, V., Ornelas, J. F., Ramírez-Barahona, S., & Gándar, E. (2016) Historical reconstruction of climatic and elevation preferences and the evolution of cloud forest-adapted tree ferns in Mesoamerica. *PeerJ* 4: e2696.
- Swofford, D. L. (2002) *PAUP* Version 4.0 b10. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)*. Sinauer, Sunderland.
- Tryon, R. M. & Tryon, A. F. (1982). *Ferns and Allied Plants. With Special Reference to Tropical America*. Springer, New York.
- Wolf, P. G., Robinson, T. A., Johnson, M. G., Sundue, M. A., Testo, W. L., & Rothfels, C. J. (2018). Target sequence capture of nuclear-encoded genes for phylogenetic analysis in ferns. *Applications in Plant Sciences*. 6: e1148.

ANEXO 1.- Secuencias empleadas en el estudio filogenético

atpA		rbcl		rps4	
Especie	GenBank	Especie	GenBank	Especie	Genbank
<i>Alsophila alata</i>	EF463636	<i>Alsophila alata</i>	EF463164	<i>Alsophila alata</i>	-----
<i>Alsophila bryophila</i>	EF463626	<i>Alsophila bryophila</i>	AM177320	<i>Alsophila bryophila</i>	AM176476
<i>Alsophila capensis</i>	EF463627	<i>Alsophila capensis</i>	AM177321	<i>Alsophila capensis</i>	AM176477
<i>Alsophila colensoi</i>	AM176422	<i>Alsophila colensoi</i>	AM177322	<i>Alsophila colensoi</i>	AM176478
<i>Alsophila cuspidata</i>	EF463629	<i>Alsophila cuspidata</i>	AM177323	<i>Alsophila cuspidata</i>	AM176479
<i>Alsophila foersteri</i>	EF463631	<i>Alsophila foersteri</i>	AM177324	<i>Alsophila foersteri</i>	AM176480
<i>Alsophila havilandii</i>	FN667541	<i>Alsophila havilandii</i>	AM410189	<i>Alsophila havilandii</i>	FN667560
<i>Alsophila hooglandii</i>	EF463632	<i>Alsophila hooglandii</i>	AM177325	<i>Alsophila hooglandii</i>	AM176481
<i>Alsophila imrayana</i>	FN667542	<i>Alsophila imrayana</i>	AM410202	<i>Alsophila imrayana</i>	FN667561
<i>Alsophila pachyrrhachis</i>	FN667543	<i>Alsophila pachyrrhachis</i>	AM410186	<i>Alsophila pachyrrhachis</i>	FN667562
<i>Alsophila podophylla</i>	JF303984	<i>Alsophila podophylla</i>	KY858748	<i>Alsophila podophylla</i>	-----
<i>Alsophila stelligera</i>	EF463635	<i>Alsophila stelligera</i>	AM410198	<i>Alsophila stelligera</i>	FN667564
<i>Alsophila tricolor</i>	FN667544	<i>Alsophila tricolor</i>	AM410199	<i>Alsophila tricolor</i>	FN667565
<i>Calochlaena villosa</i>	EF463658	<i>Calochlaena villosa</i>	AM177327	<i>Calochlaena villosa</i>	AM176484
<i>Cibotium arachnoideum</i>	-----	<i>Cibotium arachnoideum</i>	JX485690	<i>Cibotium arachnoideum</i>	-----
<i>Cibotium barometz</i>	AM176429	<i>Cibotium barometz</i>	KY858723	<i>Cibotium barometz</i>	AM176485
<i>Cibotium chamissoi</i>	AM176430	<i>Cibotium chamissoi</i>	AM177329	<i>Cibotium chamissoi</i>	AM176486
<i>Cibotium glaucum</i>	AM176431	<i>Cibotium glaucum</i>	U05913	<i>Cibotium glaucum</i>	AM176487
<i>Cibotium schiedei</i>	EF463624	<i>Cibotium schiedei</i>	AM177331	<i>Cibotium schiedei</i>	AM176489
<i>Culcita conifolia</i>	EF463625	<i>Culcita conifolia</i>	AM177333	<i>Culcita conifolia</i>	AM176491
<i>Culcita macrocarpa</i>	AM176436	<i>Culcita macrocarpa</i>	AM177334	<i>Culcita macrocarpa</i>	AM176492
<i>Cyathea arborea</i>	AM176438	<i>Cyathea arborea</i>	AM177336	<i>Cyathea arborea</i>	AM176493
<i>Cyathea australis</i>	AM176419	<i>Cyathea australis</i>	AM177319	<i>Cyathea australis</i>	AM176475
<i>Cyathea degrei</i>	EF463630	<i>Cyathea degrei</i>	-----	<i>Cyathea degrei</i>	-----
<i>Cyathea dejecta</i>	EF463641	<i>Cyathea dejecta</i>	AF101301	<i>Cyathea dejecta</i>	-----
<i>Cyathea divergens</i>	AM176439	<i>Cyathea divergens</i>	KP985728	<i>Cyathea divergens</i>	AM176494
<i>Cyathea gibbosa</i>	AM176462	<i>Cyathea gibbosa</i>	AM177354	<i>Cyathea gibbosa</i>	AM176510
<i>Cyathea grandifolia</i>	AM176434	<i>Cyathea grandifolia</i>	AM177332	<i>Cyathea grandifolia</i>	AM176490
<i>Cyathea horrida</i>	EF463637	<i>Cyathea horrida</i>	KR082850	<i>Cyathea horrida</i>	FN667566
<i>Cyathea howeana</i>	FN667545	<i>Cyathea howeana</i>	AM410188	<i>Cyathea howeana</i>	FN667567
<i>Cyathea multiflora</i>	EF463638	<i>Cyathea multiflora</i>	AM410197	<i>Cyathea multiflora</i>	FN667568
<i>Cyathea parvula</i>	EF463639	<i>Cyathea parvula</i>	AM177338	<i>Cyathea parvula</i>	AM176495
<i>Cyathea poeppigii</i>	EF463640	<i>Cyathea poeppigii</i>	AF313585	<i>Cyathea poeppigii</i>	FN667569
<i>Cyathea senilis</i>	FN667546	<i>Cyathea senilis</i>	AM410203	<i>Cyathea senilis</i>	FN667570
<i>Cyathea speciosa</i>	AM176441	<i>Cyathea speciosa</i>	AM177339	<i>Cyathea speciosa</i>	AM176496
<i>Dicksonia antarctica</i>	EF463659	<i>Dicksonia antarctica</i>	EU352301	<i>Dicksonia antarctica</i>	KP244092
<i>Dicksonia arborescens</i>	AM176443	<i>Dicksonia arborescens</i>	AM177340	<i>Dicksonia arborescens</i>	AM176497
<i>Dicksonia fibrosia</i>	AM176444	<i>Dicksonia fibrosia</i>	AM177341	<i>Dicksonia fibrosia</i>	-----
<i>Dicksonia gigantea</i>	AM176445	<i>Dicksonia gigantea</i>	AM177342	<i>Dicksonia gigantea</i>	AM176498
<i>Dicksonia lanata</i>	AM176446	<i>Dicksonia lanata</i>	AM177343	<i>Dicksonia lanata</i>	-----
<i>Dicksonia squarrosa</i>	AM176447	<i>Dicksonia squarrosa</i>	AM177344	<i>Dicksonia squarrosa</i>	AM176499
<i>Dicksonia thyrsopteroides</i>	AM176448	<i>Dicksonia thyrsopteroides</i>	AM177345	<i>Dicksonia thyrsopteroides</i>	AM176500
<i>Gymnosphaera ramispina</i>	EF463633	<i>Gymnosphaera ramispina</i>	AM177326	<i>Gymnosphaera ramispina</i>	AM176482
<i>Gymnosphaera salvinii</i>	EF463634	<i>Gymnosphaera salvinii</i>	AM410184	<i>Gymnosphaera salvinii</i>	FN667563
<i>Lophosoria quadripinnata</i>	EF463660	<i>Lophosoria quadripinnata</i>	KY684768	<i>Lophosoria quadripinnata</i>	AM176502
<i>Loxosoma cunninghamii</i>	EF463779	<i>Loxosoma cunninghamii</i>	AY612679	<i>Loxosoma cunninghamii</i>	AY612664
<i>Loxosomopsis pearceii</i>	EF463780	<i>Loxosomopsis pearceii</i>	AY612680	<i>Loxosomopsis pearceii</i>	AY612665
<i>Metaxya lanosa</i>	JF303985	<i>Metaxya lanosa</i>	AF317701	<i>Metaxya lanosa</i>	KP244099
<i>Metaxya rostrata</i>	EF463791	<i>Metaxya rostrata</i>	KM114189	<i>Metaxya rostrata</i>	KP244118
<i>Plagiogyria euphlebia</i>	JF303986	<i>Plagiogyria euphlebia</i>	LC496634	<i>Plagiogyria euphlebia</i>	-----
<i>Plagiogyria japonica</i>	EF463797	<i>Plagiogyria japonica</i>	EU352308	<i>Plagiogyria japonica</i>	-----
<i>Plagiogyria pectinata</i>	AM176455	<i>Plagiogyria pectinata</i>	AM177347	<i>Plagiogyria pectinata</i>	-----
<i>Polypodium vulgare2</i>	JF832137	<i>Polypodium sibiricum</i>	KF909061	<i>Polypodium sibiricum</i>	-----
<i>Polypodium vulgare</i>	EF463841	<i>Polypodium vulgare</i>	-----	<i>Polypodium vulgare</i>	-----
<i>Sphaeropteris novaecaledoniae</i>	AM176459	<i>Sphaeropteris novaecaledoniae</i>	AM177351	<i>Sphaeropteris novaecaledoniae</i>	AM176507
<i>Sphaeropteris aeneifolia</i>	FN667547	<i>Sphaeropteris aeneifolia</i>	AM410185	<i>Sphaeropteris aeneifolia</i>	FN667571
<i>Sphaeropteris auriculifera</i>	AM176456	<i>Sphaeropteris auriculifera</i>	AM177348	<i>Sphaeropteris auriculifera</i>	AM176504
<i>Sphaeropteris brunei</i>	AM176457	<i>Sphaeropteris brunei</i>	AM177349	<i>Sphaeropteris brunei</i>	AM176505
<i>Sphaeropteris capitata</i>	EF463642	<i>Sphaeropteris capitata</i>	AM410192	<i>Sphaeropteris capitata</i>	FN667572
<i>Sphaeropteris celebica</i>	EF463643	<i>Sphaeropteris celebica</i>	AM410195	<i>Sphaeropteris celebica</i>	FN667573
<i>Sphaeropteris cooperi</i>	JF690125	<i>Sphaeropteris cooperi</i>	KP337976	<i>Sphaeropteris cooperi</i>	-----
<i>Sphaeropteris glauca</i>	FN667548	<i>Sphaeropteris glauca</i>	AM410193	<i>Sphaeropteris glauca</i>	FN667574
<i>Sphaeropteris horrida</i>	EF463644	<i>Sphaeropteris horrida</i>	AM410200	<i>Sphaeropteris horrida</i>	FN667575
<i>Sphaeropteris medullaris</i>	EF463645	<i>Sphaeropteris medullaris</i>	AM177350	<i>Sphaeropteris medullaris</i>	AM176506
<i>Sphaeropteris megalosora</i>	EF463646	<i>Sphaeropteris megalosora</i>	AM410190	<i>Sphaeropteris megalosora</i>	FN667576
<i>Sphaeropteris polypoda</i>	FN667549	<i>Sphaeropteris polypoda</i>	AM410191	<i>Sphaeropteris polypoda</i>	FN667577
<i>Sphaeropteris robusta</i>	EF463647	<i>Sphaeropteris robusta</i>	AM410187	<i>Sphaeropteris robusta</i>	FN667578
<i>Sphaeropteris tomentosissima</i>	AM176460	<i>Sphaeropteris tomentosissima</i>	AM177352	<i>Sphaeropteris tomentosissima</i>	AM176508
<i>Thyrsopteris elegans</i>	EF463900	<i>Thyrsopteris elegans</i>	AM177353	<i>Thyrsopteris elegans</i>	AM176509