

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

MARIELE CRISTINE TESCHE KÜSTER

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA E FILOGENÉTICA DO COMPLEXO *Asplenium*
claussenii NO RIO GRANDE DO SUL-RS**

Dissertação de Mestrado

**SÃO GABRIEL
2022**

MARIELE CRISTINE TESCHE KÜSTER

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA E FILOGENÉTICA DO COMPLEXO *Asplenium*
clausenii NO RIO GRANDE DO SUL-RS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Filipe de Carvalho Victoria

SÃO GABRIEL

2022

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

K97	<p>Küster, Mariele Cristine Tesche ANÁLISE MORFOMÉTRICA E FILOGENÉTICA DO COMPLEXO Asplenium clausenii NO RIO GRANDE DO SUL - RS / Mariele Cristine Tesche Küster. 62 p.</p> <p>Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2022. "Orientador: Filipe de Carvalho Victoria".</p> <p>1. Sistemática Filogenética. 2. Taxonomia de Embryophyta. 3. Samambaias. 4. Espécies Cripticas. 5. Flora. I. Título.</p>
-----	--

MARIELE CRISTINE TESCHE KÜSTER

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA E FILOGENÉTICA DO COMPLEXO *Asplenium
claussenii* NO RIO GRANDE DO SUL-RS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: dia, mês e ano.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Filipe de Carvalho Victoria
Orientador
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. João Paulo Santos Condack
(PUC-RIO)

Dr. Rafael Plá Matielo Lemos
UNIPAMPA

AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradeço a Universidade Federal do Pampa e o Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas pela bolsa de Mestrado da CAPES.

Agradeço a compreensão e dedicação com os cuidados de todos os curadores dos herbários aos quais consegui empréstimo de exsicatas: ICN, HAS, HUCS, HVAT, PACA e SMDB.

Agradeço imensamente aos meus pais, Enor (Papai Noel) e Sandra, e meu irmão Igor, que sempre estiveram ao meu lado, me auxiliando a procurar minhas espécies, indo comigo em campos. E por sempre, em qualquer lugar que fossem, mencionaram minha busca e mobilizaram outros amigos e conhecidos.

Aos meus amigos do grupo “Xovem”, Bruna Laindorf, Marina Falcão, Fernando Bertazzo e Lilian Maggio que propiciaram grandes momentos hilários e aos quais estiveram ao meu lado a todo o momento, bons e péssimos, com uma grande prova de parceria.

Agradeço a Tia Mara e Tia Ane, grandes amigas de minha mãe, a fazer vídeo chamadas para eu não faltar às reuniões.

As gurias da pensão, Sara Santos, Daniela, Gabriela, Josiane e Naiara por toda a parceria, jantas, conspirações e lives de shows durante a pandemia.

Ao Gerefson Metz, que sempre me auxiliou, incentivou, instruiu e me botavam para cima quando precisa, pelos puxões de orelha e discussões, e sobretudo pela parceria de qualquer hora, jantas, jogos, saídas de campo e locaiadas.

Agradeço a professora Lana Sylvestre que me recebeu na UFRJ pela sua orientação e incentivo. Ao Jardim Botânico do Rio de Janeiro que disponibilizou o herbário referência do país para a pesquisa e a Claudine Mynssen, pelas suas instruções e auxílio.

Agradeço o professor Andrés pelo seu tempo e paciência, e disponibilizar seu laboratório para experimentos.

Ao orientador Prof^o Dr^o Filipe de Carvalho Victória que sempre fez o melhor para me instruir e ajudar a resolver meus problemas não importando a hora, só tenho a agradecer pelo seu incentivo e pela grande paciência e tolerância comigo.

Aos demais amigos e colegas não citados nominalmente, que de alguma forma ou outra me auxiliaram.

O meu sincero muito obrigado!

RESUMO

As pteridófitas são conhecidas por serem as primeiras plantas vasculares e o mais diverso de plantas vasculares depois do grupo de briófitas. A família Aspleniaceae é uma das mais numerosas das samambaias leptosporangiadas, a sexta mais diversa do Brasil (possuindo dois gêneros) e a sétima com maior número de endemismo. O gênero *Asplenium* L., sendo ricamente numeroso, apresenta diversas linhagens (morfológica e filogenética) resultando em muitos complexos de difícil circunscrição. Os eventos de poliploidia e hibridação das plantas criam essas incertezas taxonômicas, como o complexo *Asplenium clausenii*, com seis espécies reconhecidas para o Brasil, sendo elas *Asplenium clausenii* Hieron., *A. kunzenanum* Klotzsch ex Rosenst., *A. mourai* Hieron., *A. regulare* Sw., *A. sellowianum* C. Presl ex Hieron.) Hieron. e *A. ulbrichtii* Rosenst. Este complexo possui uma homogeneidade morfológica, onde os caracteres se sobrepõem, e no estado do Rio Grande do Sul encontra-se três destas espécies do complexo: *Asplenium ulbrichtii*, *Asplenium sellowianum* e *Asplenium clausenii*. Suas diferenças mais significativas baseiam-se no tamanho em geral da planta. Destaca-se também a falta de informações moleculares. Desta forma, propõem-se se análises morfométricas e moleculares podem delimitar diferenças biológicas passíveis para a distinção entres essas espécies. Foram avaliadas 25 exsicatas por espécie, selecionadas previamente através dos bancos de dados. Foi montada uma lista de caracteres morfológicos (85) quantitativos e qualitativos, destes filtrados os mais delimitadores entre as taxas para montar matriz de dados no programa Mesquite v. 3.6 e analisados por Máxima Verossimilhança e Máxima Parcimônia. Para as análises morfométricas foram mensuradas 10 frondes, 10 ápices e 50 pinas de cada espécie no software MorphoLeaf. Esporos e escamas foram observados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Folíolos não férteis foram usados para citometria de fluxo no Citômetro BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer. Para extração de DNA utilizou-se método CTAB 2%, posteriormente para as sequências foram buscados alinhamentos (Blast) contra o banco de dados GenBank, os alinhamentos das regiões CRY2, rbcL-ESRBCL, gapCpSh, rbcL-atpB, atpA e TRNG foram analisados por Máxima Verossimilhança. Também submetidos a análise de pressão de seleção dos sítios com os algoritmos GARD, FEL e FUBAR na plataforma datamonkey. O tamanho de fronde, pina e soro e a presença de gema prolífera são as maiores diferenças morfológicas entre as três espécies. Mesmo possuindo dimensões distintas, compartilham as mesmas

proporções para as frondes, tendo esse caractere uma variação considerável, relacionada ao nível de ploidia. O *A. sellowianum* foi separado em duas variações taxonômicas baseadas na forma do ápice da lâmina, sendo a variação pina radicante, que apresenta medidas morfológicas mais próximas ao *A. ulbrichtii*; a variação pina pinatífida, mais próxima ao *A. clausenii*. A perina apresenta maior ornamentação e fenestração em *A. clausenii* e em *A. ulbrichtii* do que o observado em *A. sellowianum*. Através das análises morfológicas foi elaborada uma chave taxonômica. Nas análises de dados moleculares de plastídios as regiões *AtpA* e *TRNG*, *A. ulbrichtii* aparece como ramo irmão das outras duas espécies, para as regiões *gapCPSH* e *gapCS*, *A. clausenii* é observado como ramo irmão. A região *rbclESRBCL* apresentou o maior número de sítios sob pressão diversificante. *A. clausenii* e *A. sellowianum* possuem a metade do genoma (15pg cada) de *A. ulbrichtii*, podendo este se tratar de um híbrido das outras duas espécies, levando a incoerências nas topologias. Contudo, devido às variações observadas nos caracteres morfológicos e nas filogenias não encontramos muitas evidências sobre a relação entre as três espécies deste estudo.

PALAVRAS-CHAVE: Aspleniaceae; Taxonomia; Morfometria; Filogenia; Hibridização

ABSTRACT

Pteridophytes are known to be the first vascular plants and the most diverse of vascular plants after the bryophyte group. The Aspleniaceae family is one of the most numerous of the leptosporangiate ferns, the sixth most diverse in Brazil (having two genera) and the seventh with the highest number of endemism. The genus *Asplenium* L., being richly numerous, presents several lineages (morphological and phylogenetic) resulting in many complexes of difficult circumscription. The polyploidy and hybridization events of plants create these taxonomic uncertainties, such as the *Asplenium clausenii* complex, with six species recognized for Brazil, namely *Asplenium clausenii* Hieron., *A. kunzenanum* Klotzsch ex Rosenst., *A. mourai* Hieron., *A. regulare* Sw., *A. sellowianum* C. Presl ex Hieron.) Hieron. and *A. ulbrichtii* Rosenst. This complex has a morphological homogeneity, where the characters overlap, and in the state of Rio Grande do Sul there are three of these species of the complex: *Asplenium ulbrichtii*, *Asplenium sellowianum* and *Asplenium clausenii*. Their most significant differences are based on the overall size of the plant. Also noteworthy is the lack of molecular information. In this way, it is proposed whether morphometric and molecular analyzes can delimit biological differences capable of distinguishing between these species. Twenty-five exsiccates per species, previously selected through the databases, were evaluated. A list of quantitative and qualitative morphological characters (85) was assembled, from these filtered the most delimiting between the rates to assemble a data matrix in the Mesquite v. 3.6 and analyzed by Maximum Likelihood and Maximum Parsimony. For the morphometric analysis, 10 fronds, 10 apices and 50 pinnae of each species were measured in the MorphoLeaf software. Spores and scales were observed by scanning electron microscopy (SEM). Non-fertile leaflets were used for flow cytometry on the BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer. For DNA extraction, the CTAB 2% method was used, later for the sequences alignments (Blast) were searched against the GenBank database, the alignments of the regions CRY2, rbcl-ESRBCL, gapCpSh, rbcl-atpB, atpA and TRNG were analyzed by Maximum Likelihood. Also submitted to site selection pressure analysis with the GARD, FEL and FUBAR algorithms on the datamonkey platform. The size of the frond, pinna and serum and the presence of prolific bud are the biggest morphological differences between the three species. Even having different dimensions, they share the same proportions for the fronds, with this character having a considerable

variation, related to the level of ploidy. *A. sellowianum* was separated into two taxonomic variations based on the shape of the apex of the blade, the pina radicante variation, which presents morphological measurements closer to *A. ulbrichtii*; the pina pinatífida variation, closer to *A. clausenii*. The perine presents greater ornamentation and fenestration in *A. clausenii* and *A. ulbrichtii* than that observed in *A. sellowianum*. Through morphological analysis a taxonomic key was elaborated. In the analysis of molecular data of plastids the *AtpA* and *TRNG* regions, *A. ulbrichtii* appears as a sister branch of the other two species, for the *gapCPSH* and *gapCS* regions, *A. clausenii* is observed as a sister branch. The *rbclESRBCL* region presented the highest number of sites under diversifying pressure. *A. clausenii* and *A. sellowianum* have half the genome (15pg each) of *A. ulbrichtii*, which may be a hybrid of the other two species, leading to inconsistencies in the topologies. However, due to the variations observed in morphological characters and phylogenies, we did not find much evidence about the relationship between the three species in this study.

KEYWORDS: Aspleniaceae ; Taxonomy; Morphometry; Phylogeny; Hybridization

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** – Exemplos do gênero *Asplenium* selecionadas para o presente estudo. A. *Asplenium clausenii*. B. *Asplenium ulbrichtii*. C. *Asplenium sellowianum*.....21
- Figura 02** – Caracteres morfológicos de *Asplenium clausenii*. A- Caule e raízes. B- Pinas basais. C- Pinas medianas. D- Ápice da lâmina pinatífido.33
- Figura 03** – Escamas de *Asplenium clausenii*. A- Escama do caule ovado-lanceolada; B- D. Escama do pecíolo. B- ovado-lanceolada. C-D- lanceolada; E- Escama da raque filiforme.....34
- Figura 04** – Caracteres morfológicos de *Asplenium sellowianum*. A- Caule e raízes. B- Pinas basais. C- Pinas medianas. D- Ápice da lâmina radicante. E- Ápice da lâmina pinatífido....39
- Figura 05** - Escama de *Asplenium sellowianum*. A- Escama do caule ovado-lanceolada; B-C. Escama do pecíolo. B- lanceolada. C- linear-lanceolada; D-E- Escama da raque. D- linear. E- filiforme.....40
- Figura 06** – Caracteres morfológicos de *Asplenium ulbrichtii*. A- Caule e raízes. B- Detalhe do caule com inserção das escamas. C- Pinas basais. D- Pinas medianas. E- Ápice da lâmina radicante com detalhe da gema.....44
- Figura 07** - Escama de *Asplenium ulbrichtii*. A- Escama do caule lanceolada; B-D. Escama do pecíolo. B- lanceolada. C- linear. D- linear-lanceolada; E-F- Escama da raque. E- linear. F- filiforme.....45
- Figura 08** - Mapa de ocorrência das espécies no Estado do Rio Grande do Sul-Brasil...46
- Figura 09** – Microscopia eletrônica de varredura dos esporos de *A. clausenii*. A - Esporo; B- Esporângio; C - Escama do caule; D - Escama do pecíolo.....48
- Figura 10** - Microscopia eletrônica de varredura dos esporos de *A. sellowianum*. A - Esporo; B- Esporângio; C - Escama do caule; D - Escama do pecíolo; E - Escama da raque.....49
- Figura 11** - Microscopia eletrônica de varredura dos esporos de *A. ulbrichtii*. A - Esporo; B- Esporângio; C - Escama do pecíolo; D - Escama da raque; E - Escama do caule.....49
- Figura 12** – Amostras de ápices e pinas das frondes das espécies de *Asplenium*. A. Exemplo de ápice que foi utilizado para as mensurações no MorphoLeaf. B. Pina basal da fronde de *A. clausenii*. C. Pina apical da fronde de *A. clausenii*. D. Pina basal da fronde de *A. sellowianum*. E. Pina apical da fronde de *A. sellowianum*. F. Pina basal da fronde de

A. ulbrichtii. G. Pina apical da fronde de *A. ulbrichtii*. Barra A=2cm; B,D,F= 2mm; C,E,G= 5mm.....51

Figura 13 – Análise de coordenadas principais (PCA) da morfometria das frondes das três espécies de *Asplenium*. A. PCA dos ápices das frondes de *A. clausenii*, *A. sellowianum* e *A. ulbrichtii* e seus agrupamentos observados pelos círculos. B. PCA dos caracteres mensurados nas pina e os agrupamentos observados representados pelos círculos. C. PCA da contribuição dos caracteres dos pina para as distinções e agrupamentos resultantes das análises morfométricas para as três espécies selecionadas.....52

Figura 14 – Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) para a região rbcLESRBCL. Os círculos vermelhos indicam o clado onde *A. clausenii*, *A. sellowianum* e *A. ulbrichtii* ficaram posicionados.....55

Figura 15 – Árvore filogenética com valores de Bootstrap para a região rbcLESRBCL. As linhas vermelhas indicam o clado onde *A. clausenii*, *A. sellowianum* e *A. ulbrichtii* ficaram posicionados.....56

Figura 16 – Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) para a região AtpA. Os círculos vermelhos indicam o clado onde *A. clausenii*, *A. sellowianum* e *A. ulbrichtii* ficaram posicionados.....57

Figura 17 – Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) para a região TRNG. Os círculos vermelhos indicam o clado onde *A. clausenii*, *A. sellowianum* e *A. ulbrichtii* ficaram posicionados.....58

Figura 18 – Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) para a região gapCPSH. Os círculos vermelhos indicam o clado onde *A. clausenii*, *A. sellowianum* e *A. ulbrichtii* ficaram posicionados.....59

Figura 19 – Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) para a região gapCS. Os círculos vermelhos indicam o clado onde *A. clausenii*, *A. sellowianum* e *A. ulbrichtii* ficaram posicionados.....60

Figura 20 – Estimativas de máxima verossimilhança de taxas sinônimas ($\hat{\alpha}$) e não sinônimas ($\hat{\beta}$) em cada sítio de cada códon das regiões do cpDNA utilizadas nas análises filogenéticas para as espécies de *Asplenium*. A linha mostra as estimativas sob o modelo nulo ($\alpha=\beta$). Estimativas acima de 10 são censuradas neste valor. A. Relação de substituições sinônimas e não-sinônimas (dn/dS) para a região RBCL-ESRBCL. B. Relação de substituições sinônimas e não-sinônimas (dn/dS) para a região AtpA. C. Relação de substituições sinônimas e não-sinônimas (dn/dS) para a região gapCSH/CS.

D. relação de substituições sinônimas e não-sinônimas (dn/dS) para a região TRNG.....61

Figura 21 – Filogenia de espécies do gênero *Asplenium* utilizando as regiões RBCL-ESRBCL, TRNG, AtpA e gapCSH concatenadas e comparadas com matriz de dados morfológicos para caracteres mais usuais em diagnóstico do gênero. O alinhamento das regiões concatenadas foi realizado no RaxML e a matriz de dados morfológicos foi utilizada para a anotação das topologias. *Cyclosorus interruptus* foi utilizado como grupo externo para esta filogenia.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Lista dos caracteres taxonômicos.....	22
Tabela 02 - Tamanho dos genomas obtidos para as três espécies de <i>Asplenium</i>	64
Tabela 03 – Acessos do GENBANK/NCBI utilizados nas análises filogenéticas para as regiões AtpA, gapCpSh, rbcL e TRNG.....	73

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Classificação Geral.....	16
1.2 Família Aspleniaceae.....	16
1.3 Gênero <i>Asplenium</i> L.....	17
1.4 <i>Asplenium claussenii</i>	18
1.5 <i>Asplenium sellowianum</i>	18
1.6 <i>Asplenium ulbrichtii</i>	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Coleta de campo.....	21
3.2 Material selecionado.....	21
3.3 Análises morfológicas.....	22
3.4 Análise dos caracteres taxonômicos.....	25
3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	26
3.6 Extração de DNA e PCR.....	26
3.7 Análises moleculares.....	27
3.8 Citometria de fluxo.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Classificação geral

Nos estudos antigos, referenciava-se o termo pteridófita para plantas que se reproduzem por esporos. No entanto, novas pesquisas moleculares indicam que as pteridófitas divergem em duas linhagens evolutivas distintas: as samambaias como conhecemos, sendo a mais representativa do grupo (aproximadamente 90%); e as licófitas. Apesar de ambas serem consideradas pteridófitas no passado e tendo linhagens distintas, alguns grupos de samambaias estão mais próximas as plantas com sementes, do que com as licófitas (SMITH et al, 2006; APG I, 2016). O termo pteridófitas ainda pode ser utilizado, desde que seja informado que este grupo é parafilético, sendo utilizado na didática para auxiliar a diferenciar plantas vasculares sem sementes.

Segundo o APG I (2016), são reconhecidas: Duas classes Lycopodiopsida (licófitas) and Polypodiopsida (samambaias); quatro subclasses: Equisetidae (cavalinha), Ophioglossidae, Marattiidae e Polypodiidae (leptosporangiadas); sete ordens: Osmundales, Hymenophyllales, Gleicheniales, Schizaeales, Salviniales, Cyatheales e Polypodiales); seguindo Polypodiales dividida em 6 subordens (Saccolomatineae, Lindsaeineae, Pteridineae, Dennstaedtiineae, Aspleniineae e Polypodiineae). A subordem Aspleniineae possui onze famílias, 75 gêneros. Entre essas, a família Aspleniaceae possui dois gêneros e aproximadamente 730 espécies no mundo.

1.2 Família Aspleniaceae

De ocorrência geográfica nos trópicos e subtropicais é uma das famílias monofiléticas mais numerosas das samambaias, representada por dois gêneros: *Asplenium* L. (700 spp) e *Hymenasplenium* Hayata (30 spp). (APG I, 2016). Destas, aproximadamente 150 ocorrem no continente americano (TRYON & TRYON, 1982).

Esta família é a sexta mais rica em número de espécies do Brasil e a sétima a possuir maior número de endemismos (23 espécies), sendo observadas em até 2700 metros acima do nível do mar (SYLVESTRE & WINDISH, 2003; PRADO et al., 2015). Sua maior ocorrência prevalece em áreas de domínio da Floresta Atlântica, especificamente em florestas montanhosas da região Sul e Sudeste e ocorrendo também ao longo de matas de galeria. Preferem locais úmidos bem sombreados, troncos com húmus, beira de rios e barrancos (SYLVESTRE, 2001; SYLVESTRE & WINDISH,

2003). Esses ambientes, por serem muitas vezes microhabitats com características distintas, resultam no alto nível de endemismo no país. São plantas de hábito predominantemente epífita e rupícola, e poucas terrícolas. No Brasil são catalogados dois gêneros e 79 espécies. O gênero *Asplenium* L. é o mais numeroso (74 espécies), enquanto *Hymenasplenium* Hayata possui cinco espécies (SYLVESTRE, 2001). As espécies do gênero são reconhecidas pelos seus caracteres morfológicos de soros alongados, fixados lateralmente às nervuras e escamas clatradas (WETZEL et al., 2017; SYLVESTRE, 2003)

1.3 Gênero *Asplenium* L.

As espécies Neotropicais são vistas distintas em pequenos grupos de espécies com morfologia semelhantes, mas com muitas espécies formando vários complexos. Este é o segundo gênero mais numeroso de samambaias do Brasil (74 espécies), ficando atrás de *Elaphoglossum* (89) (APG I, 2016; FLORA DO BRASIL, 2020). Ocorre em todo o território nacional.

Asplenium é um gênero monofilético que devido aos eventos de poliploidia e hibridação, apresenta variações taxonômicas e morfológicas pouco distintas no nível intragenerico, tornando a circunscrição das espécies mais difícil (SCHNEIDER et al., 2013; WEI & DONG, 2021). Portanto, é comum a ocorrência de complexos de espécies dentro do gênero, sendo registradas em trabalhos como Schneider et al. (2013), Wei & Dong (2021), Brownsey (1976); Steinecke & Bennert (1993) e Herrero et al. (2001).

Atualmente é reconhecido um desses complexos no Brasil, como complexo *Asplenium clausenii*, sendo reconhecidas seis espécies: *Asplenium clausenii* Hieron., *A. kunzenanum* Klotzsch ex Rosenst., *A. mourai* Hieron., *A. regulare* Sw., *A. sellowianum* (C. Presl ex Hieron.) Hieron. e *A. ulbrichtii* Rosenst. (SYLVESTRE, 2001). Os caracteres que aproximam este grupo são a lâmina linear-lanceolada ou linear-elíptica, pinada, pinas opostas, patentes, numerosas, pina apical pinatífida ou prolífera, pinas proximais reduzidas, raque glabrescente, escamas do caule com ápice agudo, não prolífero, e esporos cristados. Entretanto, existe uma plasticidade morfológica entre os indivíduos destas espécies, que são principalmente identificados como *Asplenium clausenii*, como constam nas identificações nas coleções de herbários, reconhecidamente por esta ser a espécie mais coletada e mais facilmente encontrada.

Três destas espécies do complexo são abundantes no Rio Grande do Sul, onde são registradas como *A. clausseii*, *A. sellowianum* e *A. ulbrichtii*. Entretanto, é comum encontrar espécimes com morfologias intermediárias, dificultando o reconhecimento dos táxons. *A. kunzenanum*, apesar de também ocorrer no Rio Grande do Sul, possui caracteres morfológicos suficientes para o diferenciar das outras três espécies ocorrentes no estado.

1.4 *Asplenium clausseii* Hieron.

Planta terrícola, pode ser encontrada como epífita sob troncos caídos e rupícola, formam touceiras grandes e um pouco densas e frondes rosetadas. Comumente encontrada em interior de mata, mata ciliar, barrancos, locais sombreados e úmidos de 50 metros a 1650 metros de altitude.

Nativa, mas não endêmica do Brasil. Pode ser encontrada em Cuba, Porto Rico, Venezuela, Peru, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai.

No Brasil tem ocorrência nos Biomas Mata Atlântica (Floresta Ombrófila Pluvial, Floresta Ombrófila Mista) e Pampa. Abrange os estados da Bahia, Ceará, Pernambuco, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

1.5 *Asplenium sellowianum* Hieron. (Hieron.)

Planta terrícola, epífita e rupícola. Prefere locais sombreados, úmidos, mata ciliar, mata de araucária. Possui ocorrência para região litorânea, onde ocorre do nível do mar a até 950 metros de altitude, segundo os registros de herbários.

Ocorre como nativa na região sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e também no Uruguai. Encontrada nos Biomas Mata Atlântica (Floresta Ombrófila Pluvial, Floresta Ombrófila Mista) e Pampa.

1.6 *Asplenium ulbrichtii* Rosenst.

Planta de hábito terrícola, epífita e rupícola entre camadas de húmus. Frequentemente encontrada em barracos sombreados e úmidos, onde corre água, mata ciliar e de Araucária. Desde o nível do mar até 900 metros de altitude.

Registrada no Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil. Neste encontra-se como nativa nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Distribuição nos Biomas Mata Atlântica (Floresta Ombrófila Pluvial, Floresta Ombrófila Mista) e Pampa.

Em análise essas três espécies possuem hábito preferencialmente terrícola, mas podem ser encontradas sob troncos e rochas, têm lâmina pinada, pinas laterais numerosas, com base acroscópica auriculada e a basiscópica recortada até no máximo 2/3 da pina, margem das pinas serrados a denteados, nervuras simples, ala verde estreita na raque. As maiores diferenças encontram-se no tamanho das pinas. *A. ulbrichtii* possui tamanho pequeno, geralmente a base das pinas são desiguais até metade de seu comprimento e lâminas mais membranáceas (as mais jovens), segundo observações de materiais de herbários. *A. sellowianum* possui um tamanho intermediário entre as outras duas espécies, com pinas mais retangulares e ápice prolífero, sendo esta a maior diferença de *A. clausenii*, a qual possui o maior tamanho entre as três. *A. kunzenanum* Klotzsch ex Rosenst. não foi selecionado para o estudo, pois mesmo sendo incluído no Complexo apresenta caracteres passíveis de diferenciação.

Contudo, ainda se têm uma carência de distinções taxonômicas mais delimitadoras entre as espécies além do tamanho, necessitando de estudo mais aprofundado para inferir caracteres que se demonstrarem mais eficientes e estáveis para o correto diagnóstico dos taxa a fim de delimitar uma identificação mais precisa tanto morfológicamente.

Os estudos de análises moleculares, como nível de ploidia, alinhamento de sequências e análises de genomas inteiros devem ser incorporadas pois podem contribuir na distinção dos caracteres e na resolução da identificação de híbridos e de espécies consideradas crípticas, pois ajudam a definir quais caracteres podem ser considerados como próprios para o diagnóstico das espécies e quais são reflexo de morfologia intermediária entre híbridos (REICHSTEIN, 1981, 1984; NYHUS 1987; JESSEN 1995).

Pergunta norteadora da presente proposta de pesquisa: As espécies *A. sellowianum*, *A. claussenii* e *A. ulbrichtii* são realmente táxons distintos ou trata-se apenas de um táxon com diferentes fenótipos devido a recombinação ou hibridização?

Hipótese: Existem diferenças morfológicas e moleculares delimitadoras que permitem distinguir as espécies *Asplenium ulbrichtii*, *Asplenium sellowianum* e *Asplenium claussenii*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Inferir diferenças morfológicas e moleculares entre as três espécies de samambaias, *Asplenium claussenii*, *Asplenium sellowianum* e *Asplenium ulbrichtii* (Aspleniaceae).

2.2 Objetivos específicos

- Criar matrizes de caracteres morfológicos de cada uma das três espécies de *Asplenium*;
- Delimitar e comparar os caracteres morfológicos distintos para diferenciação entre as três espécies;
- Validar caracteres morfológicos através de análises moleculares e citometria de fluxo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta em campo

As coletas ocorreram nas seguintes localizações no estado do Rio Grande do Sul - Brasil: *Asplenium claussenii* no município de Santa Cruz do Sul (29°40'49.7"S 52°25'55.3"W), *Asplenium sellowianum* no município de Santo Antônio da Patrulha (29°55'09.0"S 50°30'38.0"W) e *Asplenium ulbrichtii* no município de Santa Margarida do Sul (30°20'50.5"S 54°07'12.0"W) (Fig 01). Para as extrações de DNA genômico, retirou-se a pina através do auxílio de uma pinça de frondes jovens transferidas para microtubo de 1.5 mL e levadas à freezer -20 °C. Foi realizada a herborização das amostras de acordo com Fidalgo (1989), e, posteriormente catalogadas no Herbário Bruno Edgar Irgang (HBEI) sob número de tombo 1636, 1637 e 1635, respectivamente. As duplicatas foram doadas aos herbários HUCS, HVAT e ICN.

Um mapa de ocorrência das espécies foi elaborado no Programa QGIS (2022).

Figura 01 – Exemplos do gênero *Asplenium* selecionadas para o presente estudo:

A. *Asplenium claussenii*. **B.** *Asplenium ulbrichtii*. **C.** *Asplenium sellowianum*.



Fonte: Küster et al (2022)

3.2 Material selecionado

Foram selecionadas previamente material do tipo exsicata através dos bancos de dados do SpeciesLink e REFLORA. A forma de filtragem do material se deu por: Região (estado RS), Determinadores com nome conhecido e Material completo (fronde; pinas férteis e inférteis, jovens e maduras com base e ápice não quebrados; caule; pecíolo; raque).

O empréstimo foi solicitado aos seguintes herbários: Herbário da Universidade de Caxias do Sul (HUCS), Herbário do Vale do Taquari (HVAT), Herbário do Instituto de

Ciências Naturais (ICN), Herbário Anchieta (PACA-AGP), Herbário da Universidade Federal de Santa Maria (SMDB), Herbário Prof. Dr. Alarich Rudolf Holger Schultz (HAS) e Herbário Universidade do Rio Grande (HURG). A pedido dos herbários, também foram enviadas amostras de exsicatas indeterminadas do gênero *Asplenium* a fim de contribuir com a identificação e coleção do herbário.

Dentre os materiais enviados foram selecionadas 25 (vinte e cinco) exsicatas por espécies, sendo de material mais completo (fronde; pinas férteis e inférteis, jovens e maduras com base e ápice não quebrados; caule; pecíolo; raque).

3.3 Análises morfológicas

Para as descrições taxonômicas foi elaborada uma lista com 85 caracteres morfológicos quantitativos e qualitativos (Tab 01). As medidas de comprimento foram tiradas com paquímetro digital (MTX-316119) ou régua. As análises micro e macroscópicas foram registradas com o auxílio dos equipamentos Microscópio Estereoscópio Binocular Zeiss Modelo KL 300 LED e Microscópio Óptico Zeiss Modelo Axio Imager.A2.

Tabela 01 – Lista dos caracteres taxonômicos. * Caracteres selecionados

(31) Caracteres Morfométricos	(53) Caracteres Morfológicos
(01) Diâmetro do caule (cm)	(32) Revestimento das raízes
(02) Comprimento das escamas do caule (cm)*	(33) Forma das escamas da raque
(03) Largura das escamas do caule – porção mediana (cm)	(34) Revestimento do caule
(04) Largura das escamas do caule – base (cm)	(35) Abundância relativa do revestimento do caule*
(05) Tamanho do pecíolo – comprimento (cm)*	(36) Tipos de tricomas do caule
(06) Espessura do pecíolo (cm)	(37) Tipos de escamas do caule
(07) Tamanho do caule (larg. x comp. Cm)	(38) Forma das escamas do caule*

(08) Comprimento da escama do pecíolo*	(39) Margem da escama do caule
(09) Comprimento da escama do pecíolo (cm)	(40) Base da escama do caule*
(10) Largura da escama do pecíolo – porção mediana	(41) Ápice da escama do caule*
(11) Largura da escama do pecíolo – base (cm)*	(42) Presença de costa na escama do caule
(12) Comprimento da lâmina foliar (cm)*	(43) Presença de margem com diferenciação celular
(13) Largura da lâmina foliar na base (cm)*	(44) Tipo de tricoma do pecíolo
(14) Largura da lâmina – porção mediana (cm)	(45) Tipo de escama do pecíolo
(15) Comprimento das escamas da raque (cm)	(46) Abundância relativa do revestimento do pecíolo*
(16) Número de pares de pinas*	(47) Forma da escama do pecíolo*
(17) Comprimento da pina lateral (cm)*	(48) Margem da escama do pecíolo
(18) Largura da pina lateral (cm)*	(49) Base da escama do pecíolo*
(19) Espaço entre pina lateral mediana (cm)*	(50) Ápice da escama do pecíolo*
(20) Comprimento da pina apical (cm)	(51) Presença de costa na escama do pecíolo
(21) Largura da pina apical – porção mediana*	(52) Presença de margem com diferenciação celular na escama do pecíolo
(22) Comprimento da pina basal (cm)*	(53) Presença da ala na raque
(23) Largura da pina basal (cm)*	(54) Forma geral da lâmina*
(24) Comprimento do soro proximal na porção acoscópica (cm) da pina lateral*	(55) Ápice da lâmina*

(25) Comprimento do soro distal na porção acroscópica (cm) da pina lateral*	(56) Aurícula pina lateral proximal*
(26) Comprimento do soro proximal na porção basiscópica (cm) da pina lateral*	(57) Aurícula pina lateral mediana*
(27) Comprimento do soro distal na porção basiscópica (cm) da pina lateral*	(58) Base pina lateral mediana desenvolvida*
(28) Largura mediana da lâmina - porção proximal*	(59) Revestimento da raque
(29) Largura mediana da lâmina - porção distal*	(60) Abundância relativa do revestimento da raque*
(30) Comprimento do soro*	(61) Tipos de tricoma da raque
(31) Número de soros por segmento*	(62) Tipos de escamas da raque
	(63) Forma das escamas da raque*
	(64) Base das escamas da raque
	(65) Ápice da escama da raque*
	(66) Presença de costa mediana
	(67) Forma da base basiscópica da pina lateral*
	(68) Forma do ápice da pina lateral*
	(69) Forma da margem da pina lateral*
	(70) N° dentes na pina lateral proximal AC*
	(72) N° dentes na pina mediana AC*
	(73) N° dentes na pina mediana BA*

	(74) N° dentes na pina lateral distal AC*
	(75) N° dentes na pina lateral distal BA*
	(76) Ângulo das nervuras em relação à costa
	(77) Número de nervuras lado basiscópico*
	(78) Número de nervuras lado acroscópico*
	(79) Presença de revestimento na superfície
	(82) Soro na aurícula*
	(83) Ângulo do soro em relação à costa
	(84) Consistência do indúcio
	(85) Margem do indúcio

Fonte: Küster et al. (2022)

No caractere 21, o comprimento da pina apical, quando na forma pinatífida, foi medido a partir da inserção fim do último par de pina, onde não tem mais separação das pinas, até o ápice. Quando a pina era de forma radicante, não ocorria a medição.

3.4 Análise dos caracteres morfológicos

Os caracteres morfométricos e morfológicos que apresentaram mais diferenciação numérica entre os taxa (*Tabela 01) foram selecionados para montar uma matriz de dados no programa Mesquite v. 3.60 (MADDISON & MADDISON, 2018), sendo analisados através da Máxima Verossimilhança e Máxima Parcimônia. Os demais caracteres constam na descrição morfológica das espécies.

Análises morfométricas adicionais como tamanho de medidas das frondes, pinas e paice das frondes foram realizadas com material fresco obtidas de coletas mencionadas no item 3.1. Foram selecionados e mensuradas 10 frondes, 10 ápices e 50 folíolos de cada

espécie com o auxílio do software MorphoLeaf (BIOT et al., 2016). Os resultados destas análises foram submetidos a Avaliação das Coordenadas Principais (PCA) por meio do pacote factoextra, rodado em ambiente R (R Core Team, 2020).

3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para observar a perina do esporo, as escamas (caule, pecíolo e raque), foram feitas imagens em microscopia eletrônica de varredura – Espectroscopia de Energia Dispersiva EVO® LS 10 – Zeiss. O preparo dos esporos e escamas consistiu na sua hidratação em água destilada por 4-6 horas e, posteriormente transferido para etanol 100% (SCHNEIDER & PRYER, 2002).

As amostras de esporos e frondes foram fixadas em stubs de alumínio com fita de carbono, metalização com recobrimento de ouro (Metalizador Quorum Q150 R ES) e posterior observação por MEV com realização de aumento de 2000x, utilizando energia de 10 kV pelo método de alto vácuo.

3.6 Extração de DNA e PCR

Para extração de DNA com amostras frescas, usou-se frondes jovens, preferencialmente sem soros, ou realizava-se a raspagem destes quando presentes. O método de extração utiliza CTAB 2% (DOYLE & DOYLE, 1987) adaptado. Inicialmente, pesou-se 50 mg de material vegetal, sendo inserido em um microtubo 2 mL contendo 2 *beads* (bolinha) de aço e deixando em repouso no nitrogênio líquido por ± 7 minutos. Para a maceração usou-se o equipamento Tissue Lyser 2 vezes por 30 segundos com 30.0 de velocidade. Ao fim, adicionou-se 1 mL do tampão de extração (2% CTAB, 100 mM Tris – HCl, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 1.0% PVP) (pré-aquecido em banho-maria à 65 °C por 10 minutos) + 5 μ L de β -mercaptoetanol. Para cada amostra se adicionou 3 μ L de Proteinase K + 2 μ L de RNase, e após um vórtex (5 segs.), a amostra foi posta em banho-maria à 60 °C por 1 hora. Os microtubos foram invertidos gentilmente 4-5 vezes nesse período. Após, centrifugados a 14000 rpm por 5 minutos e transferido o sobrenadante para um novo microtubo de 1.5 mL. se adicionou 1.5x o volume do material em isopropanol gelado (-20 °C) e levou-se ao freezer -20 °C por 1 hora. Após, foi aspirado o sobrenadante sem mexer no pellet, se adicionou 800 μ L de álcool 70% gelado (-20 °C) e a amostra foi centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos. Após retirar todo o sobrenadante sem mexer no pellet e repetir esta etapa novamente, se adicionou 800 μ L de álcool absoluto gelado (-20 °C) e deixou-se em repouso por 3 minutos, verteu-se este

álcool fora e deixou-se secar a amostra por aproximadamente 10 minutos para após eluir em 30 μ L de TE (Tris-HCl e EDTA - ácido etilenodiaminotetracético).

A extração de DNA de amostras de herbário seguiu a metodologia de Pinter et al. (2002). Em um tubo microtubo de 2ml com duas beads, se inseriu 50 mg de frondes jovens sem soros. Deixar em nitrogênio líquido por ± 7 minutos e levar para macerar no Tissue Lyser 2 vezes por 1 minuto em 30.0 de frequência. Adicionar o tampão de 500 μ L CTAB 2% + 50 μ L de sarkosyl (10% N-lauryl sarcosine, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA) + 5 μ L de β -mercaptoetanol. Incubar por 1 hora em 60 °C. Após adicionar volume igual de CIA (555 μ L) misturando bem com “up and down” e centrifugar à 13000 rpm por 3 minutos. Transferir o sobrenadante para um novo tubo microtubo 1.5 mL adicionando juntamente 2/3 do volume de isopropanol gelado (-20 °C) e incubar no freezer -20 °C por 60 minutos. Ao fim, centrifugar a 13000 rpm por 3 minutos. Descartar o álcool sem mexer no pellet e deixando secar na bancada. Adicionar 500 μ L de etanol 70% e dar spin brevemente. Descartar o álcool e secar o tubo com cuidado. Ressuspender o pellet com 30 μ L de água ultrapura ou TE. Os resultados das extrações foram visualizados no equipamento Espectrofotômetro NanoVue™ Plus.

As reações de PCR foram feitas com o Invitrogen Platinum™ SuperMix seguindo as instruções do fabricante para realizar as amplificações, exceto para a temperatura de anelamento. Na qual, seguiu-se a temperatura indicada para cada tipo de marcador moleculas segundo seu fabricante (Invitrogen). As amplificações ocorreram no termociclador BIO-RAD C1000 Touch™ com a programação para o PCR do marcador CRY2 e rbcl-ESRBCL (1F e 1361R) em 52 °C na fase de anelamento; e para os marcadores gapCpSh, rbcl-atpB, atpA (flSR e rAVA), TRNG (1 F e 22R) o anelamento se deu com 50°C. O produto da PCR foi pipetado em gel de agarose 1.5% diluído em TBE 1X (Tris, Ácido Bórico e EDTA), a 80-100 Volts. A visualização foi mediada por GelRed™ (Invitrogen) e marcador ladder 100PB (Ludwig) e a observação desde através do programa LPix EX-2.6-PGR - Locus Biotecnologia. Os pares de oligonucleotídeos escolhidos para esta etapa do trabalho foram sintetizados com base nos conjuntos de primers validados por Schuettpelz et al. (2006), Kuo et al. (2011) e Xu et al. (2019).

3.7 Análises moleculares

Todos os produtos do PCR foram preparados com o *PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit* para sequenciamento na plataforma ABI

3500 (*Applied Biosciences*, Massachusetts, EUA). As sequências resultantes foram triadas e corrigidas manualmente, com base nos cromatogramas, para obtenção das sequências consenso utilizando o software Chromas 2.5 (*Technelysium*, South Brisbane, Australia) e SnapGene Viewer (*Insightful Science*, disponível em snapgene.com).

As sequências resultantes foram utilizadas como query para buscas de homólogos em outros grupos de samambaias (Tab 03), por meio de alinhamentos globais (Blast) contra o banco de dados GenBank (NCBI Resource Coordinators, 2016). Foram selecionados somente os *hits* que obtiveram mais de 70% de cobertura da query e com e-value superior a $1e-10$.

Cada conjunto de homólogos para as regiões selecionadas no presente trabalho foram submetidas a alinhamentos locais usando a ferramenta MAFFT (YAMADA et al., 2016), sendo os alinhamentos ajustados para manutenção somente das regiões conservadas com o auxílio do AliView (LARSSON, 2014). Cada um dos alinhamentos das regiões (CRY2, rbcl-ESRBCL, gapCpSh, rbcl-atpB, atpA e TRNG) foram utilizados para a construção de árvores de máxima verossimilhança com o auxílio da ferramenta FastTree (PRICE et al., 2010) e corrigidas na plataforma IqTree (TRIFINOPOULOS et al., 2016). Para os marcadores e FERmatk (fEDR e rAGK) os amplicons obtidos não passaram no controle de qualidade para o sequenciamento, desta forma foram excluídos da análise final do presente trabalho.

Cada um dos alinhamentos foi submetido a análise de pressão de seleção dos sítios conservados a fim de verificar os números de substituições sinônimas/não sinônimas e de possível recombinação entre as sequências nos alinhamentos. Para tal foram utilizadas os algoritmos GARD (Genetic Algorithm for Recombination Detection), FEL (Fixed Effects Likelihood) e FUBAR (Fast, Unconstrained Bayesian Approximation for inferring Selection) disponíveis na plataforma datamonkey (POND & FROST, 2005; POND et al., 2006; MURREL et al., 2013; WEAVER et al., 2018).

Por fim, foi realizada a análise filogenética dos alinhamentos sem indícios de maior pressão diversificadora por meio da concatenação das regiões, submetidas a alinhamentos múltiplos no MAFFT e com construção da árvore filogenética no IQTree. Os dados morfométricos mais relevantes foram utilizados para a anotação desta árvore global.

Todas as árvores filogenéticas geradas foram editadas e anotadas na plataforma ITOL (LETUNIC & BORK, 2021).

3.8 Citometria de Fluxo

Fragmentos (2 cm²) de folíolos não férteis foram cortados com lâmina de barbear nova em uma placa de petri contendo 1 mL de buffer Barany I (100 mM Ácido Cítrico, 0,5 % (v/v) Triton X-100) (BARANYI & GREILHUBBER, 1995) modificado com a adição de 1% (v/v) PVP 40. A suspensão foi filtrada em filtro de nylon de 40 µm (Corning® Cell Strainer) e centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retido em um novo tubo onde foi adicionado tampão de Fosfato de sódio 400mM pH 8.9 (PELLICER & LEITCH, 2014) na proporção de 1:4. Cada suspensão foi corada com 5 µL de Iodeto de propídio e após incubação de 15 minutos foi utilizado o Citômetro BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises morfométricas e revisão de material de herbário.

Para fim de distinção das amostras de herbário e daquelas coletadas em campo como alvo da presente dissertação foi desenvolvida uma chave taxonômica para o complexo *Asplenium clausenii*. Para as outras espécies foram utilizados dados de Sylvestre (2001) para a montagem da chave.

Chave dicotômica para identificação das espécies de *Asplenium* ocorrentes na flora do Rio Grande do Sul.

- | | | |
|-----|--|---------------------------------|
| 1.1 | Ápice pinatífido..... | 2 |
| 1.2 | Ápice radicante..... | 4 |
| 2.1 | Pinas 12-30 pares, ápice das pinas obtuso..... | <i>Asplenium mourai</i> |
| 2.2 | Pinas 35-50 pares..... | 3.1 |
| 3.1 | Lâmina elíptica a linear-elíptica, pinas de forma lanceolada (lembra uma foice) com ápice agudo, escamas do caule..... | 1. <i>Asplenium clausenii</i> |
| 3.2 | Lâmina oblonga-lanceolada, membranácea a cartácea pina com ápice obtuso..... | <i>Asplenium regulare</i> |
| 3.3 | Lâmina lineal-elíptica, pinas oblongas, ápice das pinas obtuso a agudo, escamas do caule..... | 2. <i>Asplenium sellowianum</i> |

4.1 Raque alada em toda a sua extensão, a ala geralmente é tão larga quanto a raque..... *Asplenium kunzeanum*

4.2 Raque pouco visível..... 5

5.1 Lâmina membranácea, fina e flexível, escamas do caule, pecíolo e raque castanha-douradas brilhantes; base basiscópica atenuada de 1/3 a 2/3 do tamanho da pina; aurícula presente, pouco desenvolvida e podendo apresentar até 1 soro..... 2 *Asplenium sellowianum*

5.2 Lâmina herbácea, bastante fina com textura macia, escamas do caule, pecíolo e raque castanhas a castanha-douradas foscas; base basiscópica atenuada em até 2/3 do tamanho da pina, algumas vezes pode passar essa fração; aurícula pouco evidente, mas pode apresentar até 2 soros..... 3 *Asplenium ulbrichtii*

Descrição taxonômica das espécies

1. *Asplenium clausenii* Hieron.

Figura 02A-D

Figura 03A-E

Figura 09A-D

Raízes delgadas revestidas por pelos castanho-dourados. **Caule** curto, ereto, sem tricomas, revestido por escamas em média/grande abundância (0.17 a 0.48 comp., 0.01 a 0.07 cm larg), possuem forma lanceolada a ovado-lanceolada, clatrada, castanho-dourada, brilhante, com margem lisa, base cordada, às vezes truncada, ápice cuneado, raramente acuminado,. **Pecíolo** de 4-18 cm comp., cinza-escuro fosco, apresenta poucos tricomas esparsos, revestido por escamas (0.16-0.43 comp., 0.02 a 0.04 cm larg) de forma lanceolada, linear-lanceolada ou ovado-lanceolada, clatradas, castanha-douradas, brilhante, com margem lisa, base truncada ou cordada, ápice cuneado a acuminado, unicostal. **Raque** alada, fosco escura, ala contínua de 0.5 cm larg., diminuindo até o ápice da lâmina, revestimento da raque de média/baixa abundância de escamas lineares, margem lisa, base truncada, ápice redondo, raramente acuminado, clatradas, castanha-douradas,

brilhante (0.06-0.13 cm comp.), mais abundantes nas axilas das pinas, tricomas escassos. **Lâmina** pinada, forma geral elíptica a linear-elíptica, 32-58 cm de comp., 0.4-3 larg. na base, 3-4.5 cm larg. mediana, 2.2-3.3 cm larg. meio da lâmina porção proximal, 2-3.3 cm larg. meio da lâmina porção distal, coloração verde escura opaca, ápice prolífero. **Pinas** 28-48 pares, lanceoladas, ligeiramente arqueadas em direção ao ápice da lâmina, lembrando a forma de uma foice, ápice agudo, sub-opostas na porção proximal da raque a alternas em direção a porção distal da lâmina, glabras ou com poucos tricomas esparsos, possuem 1.6-2.2 cm comp. mediana, 0.4-0.68 cm larg. Pina basal auriculiforme com 0.9-1.8 cm comp., 0.2-0.6 cm larg. Base basiscópica atenuada, mas não chega a 1/3 do comprimento da pina, ápice da pina lateral perpendicular ou inclinado em direção ao ápice, agudo a agudo-arredondado, margem crenado a crenado-denteado, as pinas medianas possuem metade do lado acroscópico paralelo a raque e outra metade distal inclinada ao ápice, aurícula mais evidente nas pinas medianas. Número de dentes na pina lateral proximal acroscópica de 9-17, número de dentes na pina lateral proximal basiscópica de 11-17, número de dentes na pina lateral mediana acroscópica de 8-11 (alguns exemplares podem chegar a até 16), número de dentes na pina lateral mediana basiscópica de 4-7, número de dentes na pina lateral distal acroscópica de 8-12, número de dentes na pina lateral distal basiscópica de 4-6 (raramente 7). **Nervuras** simples, exceto na aurícula acroscópica sendo no máximo 1-furcada, castanho-escuras, glabras, número de nervuras pina mediana no lado acroscópico 6-10, número de nervuras pina mediana no lado basiscópico 4-6 (pode apresentar 7). **Soros** elípticos, medianos medindo 0.15-0.55 cm comp., número de 1-12 por pina, raramente chega a 13, normalmente em pinas maiores, podendo ter 1-2 soros na aurícula; soro proximal na porção acroscópica 0.2-0.3 (podendo chegar a até 0.36 cm comp.) cm comp., soro distal na porção acroscópica 0.15-0.18 (chega a até 0.25 cm comp.) cm comp., soro proximal na porção basiscópica 0.2-0.35 cm comp. (raramente chega a até 0.58 cm comp.), soro distal na porção basiscópica 0.15-0.25 cm comp. Podem ser presentes até nas últimas pinas do ápice da lâmina. indúsio oblongo, margem lisa a ondulada, mebranáceo e hialino. **Esporos** oblongos ($\pm 35 \times 25 \times 15 \mu\text{m}$), com perina cristada, alas não anastomosadas, irregulares, superfície espiculada, espinhos pontiagudos, compridos, finos e numerosos, perina com perfurações desde a superfície até ao longo das cristas.

- **Origem:** Nativa, não endêmica do Brasil. Ocorre na Mata Atlântica e Pampa.

- **Ecologia:** terrestre, mas pode ser encontrada como epífita e rupícola com acúmulo de húmus. Ocorre entre uma altitude de 50 m a até 1400 m acima do nível do mar (RS). Prefere locais sombreados e úmidos, encontrada em mata ciliar e barrancos em forma de densas touceiras. Catalogada amplamente por todo o estado, desde solo arenoso a solo mais rico em húmus (solo preto), sendo neste mais encontrado. Desenvolve-se bem em locais antropizados.
- **Distribuição geográfica:** Brasil (Bahia, Ceará, Pernambuco, Mato Grosso, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), Uruguai, Argentina, Paraguai, Bolívia, Peru, Porto Rico e Cuba.
- **Estado de conservação (IUCN):** Não avaliada quanto à ameaça (NE).

Material examinado: Brasil, Rio Grande do Sul: *Tenente Portela*, Parque Estadual do Turvo, próximo ao Salto do Jucumã, 04 Jul 1986, *M. H. Bassan & J. Pilla* 436 (HAS 55944); *Taquari*, Granja Taipa, 08 Ago 1993, *L. S. Kern* 26 (HAS 66904); *Nova Petrópolis*, proximidade da cidade, Mar 1959, *J. Mattos s.n.* (HAS 54691); *Novo Hamburgo*, Parque Municipal Henriue Luis Roessler, 04 de Nov 2005, *R. Fleck & G. S. Monteiro* (PACA 105893); *Frederico Westphalen*, 08 Ago 2002, *P. G. Windish* 9756 (PACA 87721); *Caxias do Sul*, Ana Rech, 10 Dez 1999, *A. Kegler* 448 (HUCS 14495); *Caxias do Sul*, Ana Rech, Faxinal, 10 Dez 1999, *L. Scur* 290 (HUCS 14599); *São Francisco de Paula*, Instituto Nacional do Pinto, 14 Jan 1952, *A. Sehnem* 5881 (HUCS 19045); *Caxias do Sul*, Ana Rech, 12 Fev 2000, *A. Kegler* 650 (HUCS 20216); *Monte Belo do Sul*, 19 Jun 2011, *E. Valduga* 52 (HUCS 37178); *Bento Gonçalves*, Vale dos Vinhedos, 01 Ago 2011, *E. Valduga* 77 (HUCS 37359); *Santa Tereza*, Linha Pederneira, reserva Brum, 07 Jan 2012, *F. Gonzatti* 305 (HUCS 37918), *Nova Prata*, Fazenda Tupy, 16 Fev 1884, *L. Troian et alii s.n.* (HUCS 81), *Flores da Cunha*, 29 Jul 1984, *V. Dal Pont et alii s.n.* (HUCS 227); *Santa Maria*, Reserva Biológica do Ibicuí-Mirim, 07 de Jul 1993, *N. Silveira* 11333 (HAS 35562); *Tavares*, Fazenda Boiadeiro, 08 Out 2013, *F. Gonzatti* 924 (HUCS 40864); *Barra do Ribeiro*, RPPN Barba Negra, Morro da Formiga, 15 Jul 2013, *F. Gonzatti* 761 (HUCS 41146); *São Francisco de Paula*, Linha Juá, 22 Fev 2016, *F. Gonzatti* 2302 (HUCS 49630); *Canela*, Linha São Paulo/Canastra, 08 Jul 1998, *S. Diesel* (PACA 72520); *Farroupilha*, Parque dos Pinheiros, 25 Mar 2019, *F. Gonzatti*

5093 (HUCS 49632); São Francisco de Paula, José Velho, 18 de Nov 2001, R. Wasum 1242 (PACA 87730); Saporanga, Picada Verão, 17 Mai 1998, A. Silva Jr s.n. (PACA 87728); Pinhal da Serra, Vale do Rio Pelotas, junto a divisa com o Estado de Santa Catarina, coordenadas estimadas: 27° 45'S, 51° 10'W, 8 Mar 2000, P. G Windish & W. Oliveira 9549 (PACA 87727); Santa Cruz do Sul, Pinheiral, 26 Dez 1946, A. Sehnem s.n. (PACA 72623).

OBS: as amostras estão ordenadas em ordem de análise.

Figura 02 - Caracteres morfológicos de *Asplenium claussenii*. A- Caule e raízes. B- Pinais basais. C- Pinas medianas. D- Ápice da lâmina pinatífido.

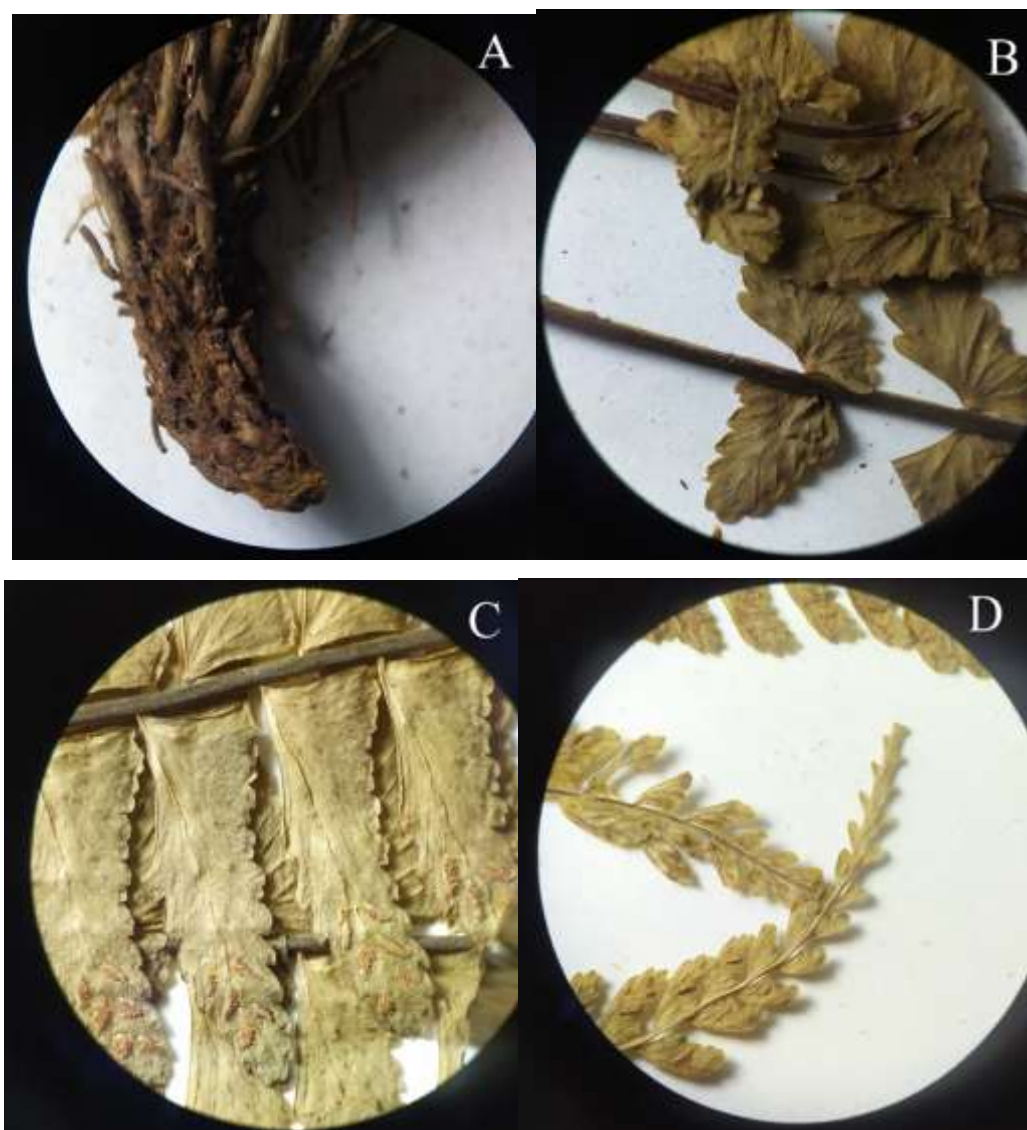
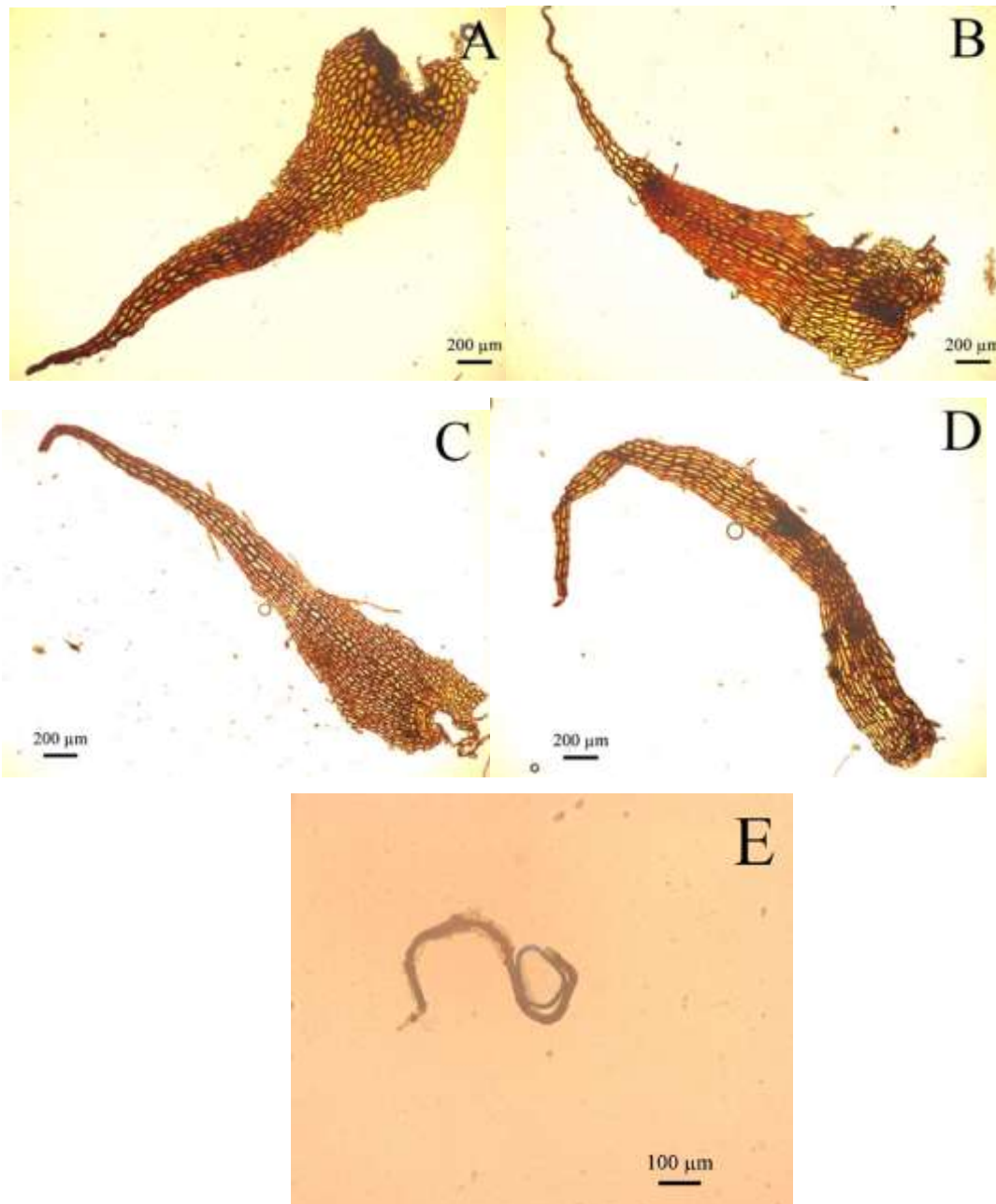


Figura 03 – Escamas de *Asplenium clausenii*. A- Escama do caule ovado-lanceolada; B- D. Escama do pecíolo. B- ovado-lanceolada. C-D- lanceolada; E- Escama da raque filiforme.



2. *Asplenium sellowianum* C. Presl ex Hieron.

Figura 04 A-E

Figura 05 A-E

Figura 10 A-E

Raízes delgadas revestidas por pelos castanho-dourados. **Caule** curto, ereto, sem tricomas, revestido por escamas em grande abundância (0.15 a 0.48 comp., 0.02 a 0.07 cm larg), possuem forma lanceolada a ovado-lanceolada, clatradas, castanho-douradas, brilhantes, com margem lisa, base cordada ou truncada, ápice acuminado a cuneado, unicostal. **Pecíolo** de até 2-12 cm comp., cinza-escuro fosco, apresenta poucos tricomas esparsos tricomas, revestido por escamas (0.1 a 0.39 comp., 0.008 a 0.039 cm larg) de forma lanceolada, linear ou ovado-lanceolada, clatradas, castanho-douradas, brilhantes, com margem lisa, base truncada ou cordada, ápice cuneado a acuminado, unicostal. **Raque** alada, fosco escura, ala contínua de 0.5 cm larg., diminuindo até o ápice da lâmina, revestimento da raque de de escamas lineares, raramente filiformes, margem lisa, base truncada, ápice redondo, pouco cuneado, clatradas, castanha-douradas, brilhantes (0.07-0.16 cm comp.), mais abundantes nas axilas das pinas, tricomas esparsos. **Lâmina** pinada, forma linear a linear-elíptica, 13-44.5 cm de comp., 0.1-2 larg. na base, 1.7-4 cm larg. mediana, 1.5-2.8 cm larg. meio da lâmina porção proximal, 1.7-2.5 cm larg. meio da lâmina porção distal, coloração verde escura opaca, ápice pinatífido ou radicante com gema inserida próxima ao último par de pinas. **Pinas** 26-46 pares, oblongas, ápice obtuso a agudo, perpendiculares à raque, sub-opostas na porção proximal da raque a alternas em direção a porção distal da lâmina, glabras ou com poucos tricomas esparsos, medem de 1-2 cm comp. mediana, 0.36-0.45 cm larg., poucas vezes chega a até 0.6 cm. Pina basal auriculiforme com 0.2-0.8 cm comp., 0.2-0.35 cm larg., pode chegar a até 1.3 cm comp e 0.6 cm de larg. Base basiscópica atenuada a até 1/3 do comprimento da pina, poucas vezes chega a 2/3, ápice da pina lateral perpendicular a raque, lateral obtuso a agudo-arredondado, margem crenado a crenado-denteado, as pinas medianas possuem lado acroscópico paralelo a raque, aurícula pouco desenvolvida. Número de dentes na pina lateral proximal acroscópica de 6-13, número de dentes na pina lateral proximal basiscópica de 3-6, número de dentes na pina lateral mediana acroscópica de 7-14, número de dentes na pina lateral mediana basiscópica de 4-6, número de dentes na pina lateral distal acroscópica de 6-10, número de dentes na pina lateral distal basiscópica de

3-5. **Nervuras** simples, exceto na aurícula acroscópica sendo no máximo 1-furcada, castanho-escuras a negras, glabras, número de nervuras pina mediana no lado acroscópico 4-7, número de nervuras pina mediana no lado basiscópico 2-8. **Soros** elípticos, medianos medindo 0.1-0.3 cm comp., raramente chegando a 4 cm comp., número de 1-9 por pina, raramente chega a 11, normalmente em pinas maiores, ocasionalmente pode ter um soro na aurícula; soro proximal na porção acroscópica 0.2-0.33 cm comp., soro distal na porção acroscópica 0.15-0.24 cm comp., soro proximal na porção basiscópica 0.18-0.4 cm comp., soro distal na porção basiscópica 0.15-0.3 cm comp. Podem ser presentes até nas últimas pinas do ápice da lâmina. indúscio oblongo, margem lisa a ondulada, mebranáceo e hialino. **Esporos** oblongos ($\pm 34 \times 28 \times 18 \mu\text{m}$), com perina cristada, alas não anastomosadas, irregulares, superfície espiculada, espinhos pontiagudos, curtos, numerosos e próximos, perina com perfurações na superfície do esporo até a base das cristas, não ultrapassando o comprimento destas.

- **Origem:** Nativa, não endêmica do Brasil. Ocorre na Mata Atlântica e Pampa.
- **Ecologia:** terrestre, rupícola sobre húmus. Ocorre desde o nível do mar a até 950 metros de altitude. Comumente encontrada em mata ciliar, sombreada e úmida, mata de araucária. Tem preferência por solo arenoso, sendo também amplamente catalogado na região litorânea, em capões de vegetação próximos a dunas.
- **Distribuição geográfica:** Endêmica das regiões sul da América do Sul, sendo no Brasil restrita à região Sul (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), Uruguai, Argentina e Paraguai.
- **Estado de conservação (IUCN):** Não avaliada quanto à ameaça (NE).

Material examinado: Brasil, Rio Grande do Sul: *Santana da Boa Vista*, Fazenda Passo da Chácara, 29 Mar 1975, A. Sehnem s.n. (PACA 73401); *Santa Vitória do Palmar*, Hermegenildo, 16 Mar 2014, F. Gonzatti 1065 (HUCS 41134); *Barra do Ribeiro*, Morro da Formiga, RPPN Barba Negra, 15 Jun 2013, F. Gonzatti 762 (HUCS 41145a); *Piratini*, 04 Jul 1994, C. Kazmirczak s.n. (ICN 107199); *Bagé*, Casa de Pedra, 04 Jul 1991, I. Fernandes 915 (ICN 103808); *Barra do Ribeiro*, Morro da Formiga, RPPN

Barba Negra, 15 Jul 2013, *F. Gonzatti 762* (ICN 176196); *Canguçu*, Assentamento Arroio das Pedras, 24 Nov 2000, *R. M. Senna s.n.* (HAS 46576); *São Lourenço do Sul*, Estrada para o Pontalzinho- Ponte, *F. Gonzatti 729* (ICN 176156); *Rio Grande*, Mato Costa Verde, 26 de Mai 1997, *Madir, Alberto, Stela & Fernando* (HURG 1459); *Rio Grande*, Mato Costa Verde, 04 de Ago 1997, *L. Fernando* (HURG 1482); *Herval*, Parque de Exposições (fund.), 8 de Jan 1980, *A. Sehnem* (PACA 73409); *Pelotas*, Estância do Sr. Ary Alcântara, 18 de Jun 1959, *G. L. Brauner 128* (PACA 703406); *Cachoeira do Sul*, Mina Iruí, Abr 1985, *M. Sobral 3820* (ICN 67919); *Herval*, Projeto de Assentamento Santa Alice, 13 de Abr 2007, *M. Grings 1335* (ICN 168435); *Encruzilhada do Sul*, 25 de Nov 2011, *F. D. Silva 7* (ICN 176921); *Cristal*, Margem do Rio Camaquã, 23 de Mai 2014, *F. Gonzatti 1204* (HUCS 41522); *Pelotas*, Horto Botânico, UFPel, 27 de Mai 2014, *F. Gonzatti 1262* (HUCS 41471); *Eldorado do Sul*, Estação Experimental Agronômica da UFRGS, Arroio Calombo, 19 de Out 2001, *J. L. Waechter & C. Giongo 211* (ICN 124949); *Caçapava do Sul*, Guaritas, 27 de Ago 1998, *C. Mondin et alii 1430* (PACA 87750); *São Lourenço do Sul*, Arroio do Pinto, 3 de Jun 2013, *F. Gonzatti 699* (ICN 176166); *Rio Grade*, Ilha do Leonídio, 18 de Mar 2014, *F. Gonzatti 1107* (HUCS 41132); *Palmares do Sul*, mata oeste da Lagoa Porteira, 27 de Mai 2012, *F. Gonzatti 519* (HUCS 38879); *Bagé*, Casa de Pedra, 03 de Nov 1989, *I. Fernandes 730* (ICN 89887); *Rio Grande*, Ilha do Leonídio, 18 de Mar 2014, *F. Gonzatti 1105* (HUCS 41133); *Santana da Boa Vista*, Ponte sobre o Arroio Areião, 12 de Jan 2010, *M. A. Kieling-Rubio 669* (ICN 183409); *São Francisco de Paula*, Linha Juá, 06 Abr 2016, *F. Gonzatti 2303* (HUCS 49629); *Bom Jesus*, Fazenda do Cilho, 11 Set 2011, *F. Gonzatti 143* (HUCS 37474); *Santa Cruz do Sul*, Passo da Mangueira, 1900/1905, *C. Jüergens & A. Stier 21a* (HUCS 23422); *Nova Prata*, Fazenda Tupi, 22 Fev 1985, *V. Dal Pont et al s.n.* (HUCS 565); *Tavares*, Fazenda Boiadeiro, 08 Out 2013, *F. Gonzatti 924a* (HUCS 40863); *Farroupiha*, Nova Sardenha, 06 Abr 2013, *R. Wasum 5168* (HUCS 40084); *Viamão*, Beco do Capitão, no Sítio das Vassouras, 10 Mai 1988, *C. Mondin 371* (HAS 54631); *Caçapava do Sul*, 26 Fev 1994, *E. M. Silva s.n.* (ICN 107192); *Morro Santana*, 26 Set 1981, *R. M. Bueno s.n.* (ICN 68768); *Nova Roma do Sul*, Ponte Velha, 20 Ago 2005, *J. Andreoni 62* (HUCS 26972); *Tavares*, Estrada para Praia do Farol, 7 Out 2013, *F. Gonzatti 903* (HVAT 825); *Viamão*, Bairro Tarumã região de entorno do Lago Tarumã, 18 Set 2008, *P. J. S. Silva Filho 1013* (ICN 168232); *Porto Alegre*, Morro São Pedro, Lado Oeste, 06 Mai 1980, *L. Aguiar et L. Martau 342* (HAS 11817); *Tenente Portela*, Parque Estadual do Turvo no rio Calixto, 13 Set 1990, *N. Silveira 9012* (HAS 54660);

Guaíba, Estação Experimental Agronômica, 13 Ago 1987, *C. Mondin 190* (HAS 54710); *Campo Bom*, Bairro Mônaco, 17 Nov 2010, *M. H. Nervo 629* (PACA 112344); *Santo Antônio Da Patrulha*, 27 de Abr 2014, *F. Gonzatti 1163* (HUCS 41359); *Santo Antônio Da Patrulha*, 27 de Abr 2014, *F. Gonzatti 1188* (SMDB 17270); *Vacaria*, Parque das Cachoeiras, Refugiados, 26 de Mar 2017, *F. Gonzatti 3464* (HUCS 47469); *Nova Prata*, Fazenda Palmeira Alta, 31 de Mai 1987, *R. Wasum et alii* (HUCS 2820); *Nova Roma do Sul*, Linha Pasuch, 26 de Jul 2005, *J. Andreoni 42* (HUCS 26971); *Santo Antônio Da Patrulha*, 27 de Abr 2014, *F. Gonzatti 1188* (HUCS 41360); *Céu Azul*, Parque Nacional do Iguaçu, 22 de Ago 2004, *E. Barbosa & E.F. Costa 983* (HUCS 26841); *Lajeado*, Campus Univates, 24 de Abr 2013, *F. Lucheta* (HVAT 4737).

OBS: as amostras estão ordenadas em ordem de análise.

Figura 04 – Caracteres morfológicos de *Asplenium sellowianum*. A- Caule e raízes. B- Pinas basais. C- Pinas medianas. D- Ápice da lâmina radicante. E- Ápice da lâmina pinatífido.

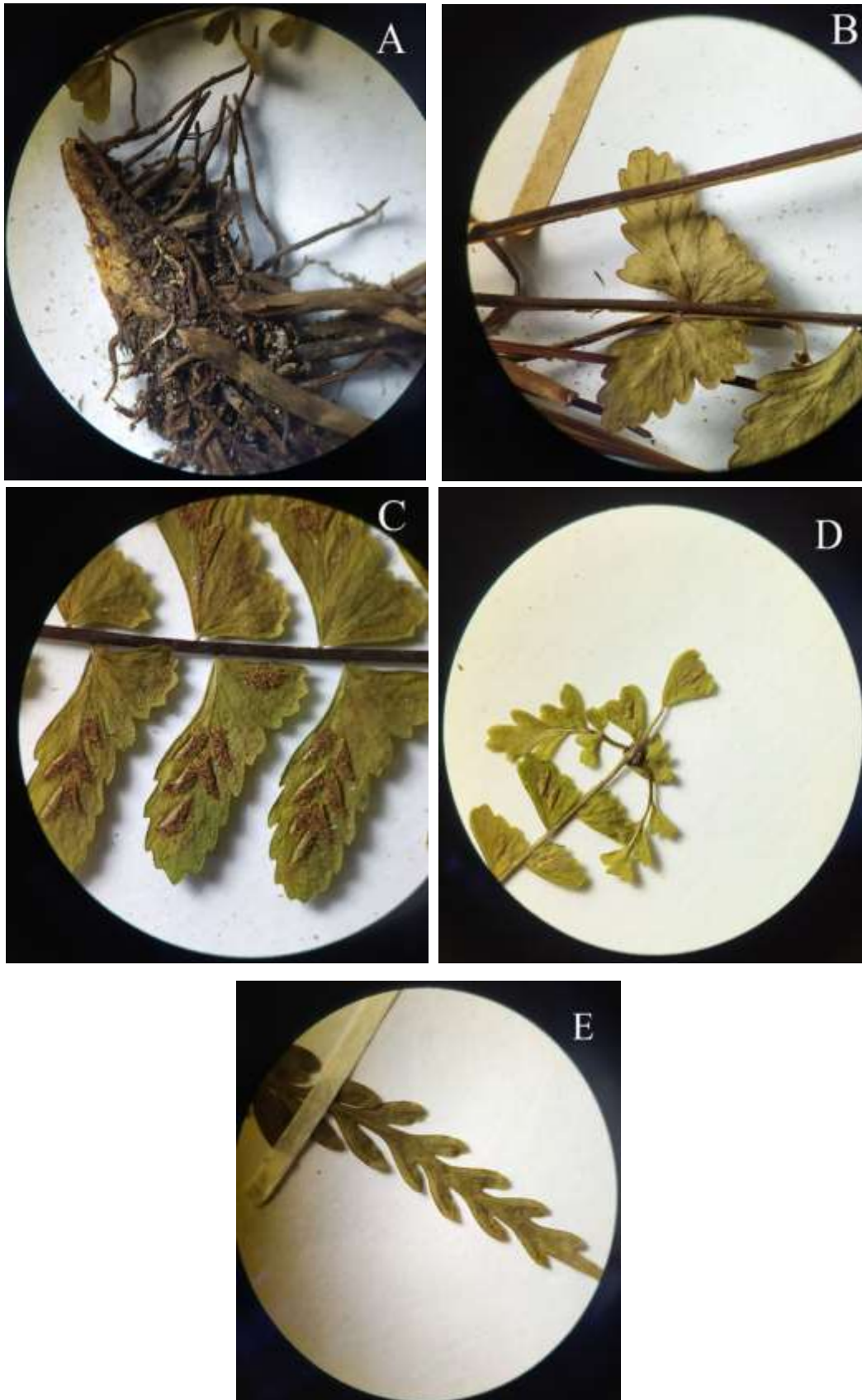
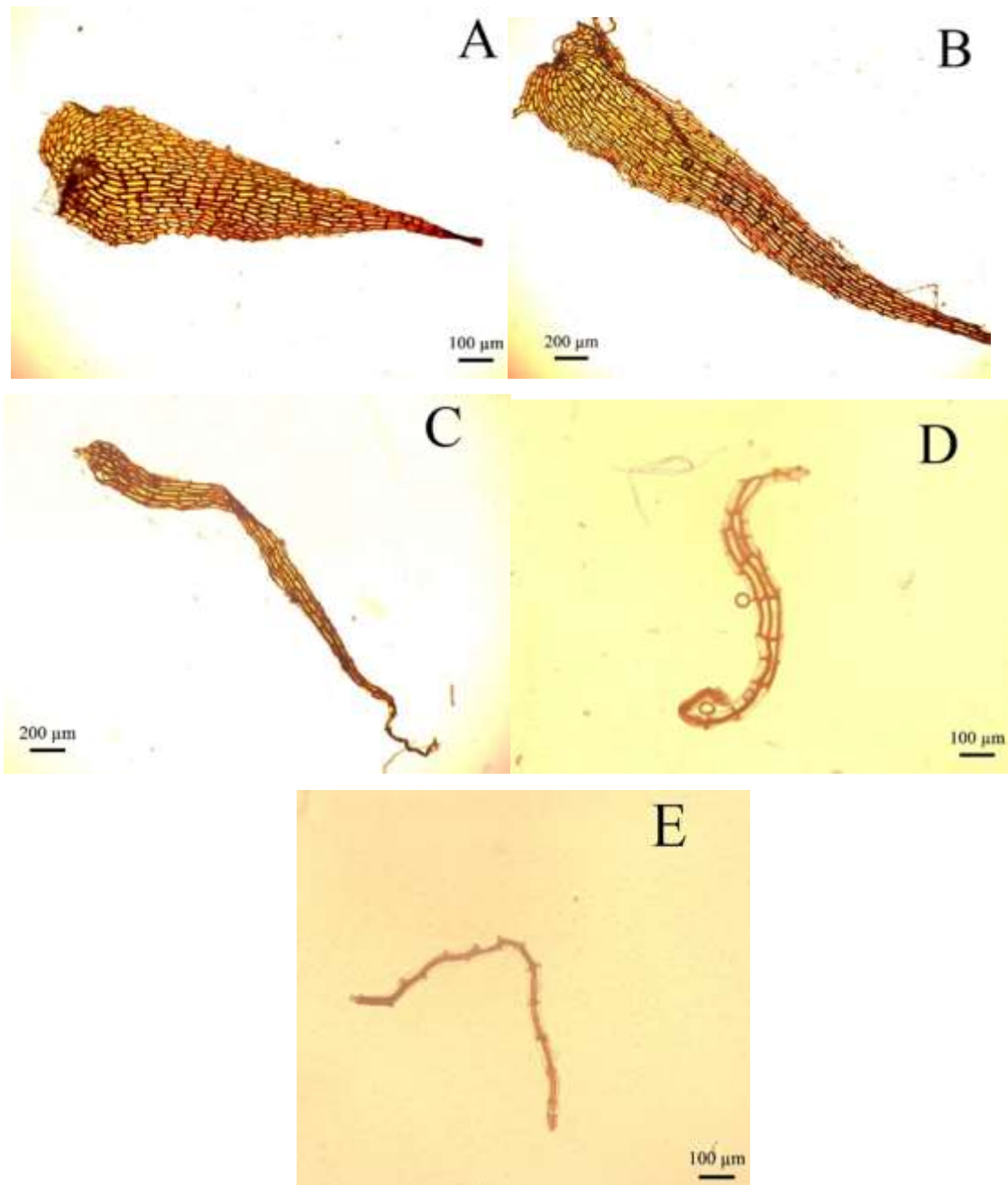


Figura 05- Escama de *Asplenium sellowianum*. A- Escama do caule ovado-lanceolada; B-C. Escama do pecíolo. B- lanceolada. C- linear-lanceolada; D-E- Escama da raque. D- linear. E- filiforme.



3. *Asplenium ulbrichtii* Rosenst.

Figura 06A-E

Figura 07A-F

Figura 11A-E

Raízes delgadas revestidas por pelos castanho-dourados; **Caule** curto, ereto, sem tricomas, revestido por escamas em abundância (0.04 a 0.35 comp., 0.02 a 0.048 cm larg.), forma lanceolada a ovado-lanceolada, clatradas, castanha a castanha-douradas, foscas, com margem lisa, base cordada, às vezes truncada, ápice acuminado, unicostal. **Pecíolo** curto de até 2.2 cm comp., cinza-escuro fosco, poucos tricomas, revestido por escamas (0.012 a 0.26 comp., 0.01 a 0.08 cm larg) de forma lanceolada, linear, linear-lanceolada ou ovado-lanceolada, clatradas, castanha a castanha-douradas, não brilhantes, com margem lisa, base truncada, às vezes cordada, ápice cuneado a acuminado, unicostal. **Raque** alada, fosco escura, ala contínua de 0.5 cm larg., diminuindo até o ápice da lâmina, presença de poucas escamas lineares, filiformes ou linear-lanceolada, margem lisa, base truncada, ápice cuneado ou redondo, clatradas, castanha a castanha-douradas, foscas (0.07-0.24 cm comp.), mais abundantes nas axilas das pinas, tricomas escassos. **Lâmina** pinada, forma linear a linear-elíptica, 5-18 cm de comp., 0.2 a 1.3 larg. na base, 1.1-2.3 cm larg. mediana, 0.8-2 cm larg. meio da lâmina porção proximal, 0.7-2 cm larg. meio da lâmina porção distal, verde-clara a escura, ápice radicante com gema inserida próxima ao último par de pinas, ocasionalmente também pinatífido. **Pinas** 19-38 pares, oblongas, alternas a sub-opostas na porção proximal da raque a opostas em direção a porção distal da lâmina, glabras ou com poucos tricomas esparsos, medem de 0.5-1.1 cm comp., 0.2-0.4 cm larg., pina basal auriculiforme com 0.2-0.34 cm comp., 0.1-0.5 cm larg., base basiscópica atenuada até 2/3 do comprimento da pina, agudo a agudo-arredondado, algumas vezes cuspidado, ápice da pina lateral perpendicular à raque ou levemente inclinado para o ápice da lâmina, margem denteado a crenado-denteado, as pinas medianas possuem lado acroscópico paralelo a raque, aurícula pouco desenvolvida. Número de dentes na pina lateral proximal acroscópica de 4-7, número de dentes na pina lateral proximal basiscópica de 1-4, número de dentes na pina lateral mediana acroscópica de 4-7, número de dentes na pina lateral mediana basiscópica de 2-4, número de dentes na pina lateral distal acroscópica de 3-6, número de dentes na pina lateral distal basiscópica de 1-4. **Nervuras** simples, exceto na aurícula acroscópica sendo no máximo

1-furcada, castanho-escuras a negras, glabras, número de nervuras pina mediana no lado acroscópico 1-5, número de nervuras pina mediana no lado basiscópico 1-4. **Soros** elípticos, medianos medindo 0.07-0.21 cm comp., número de 1-6 por pina, raramente chega a 8, normalmente em pinas maiores, ocasionalmente pode ter um soro na aurícula; soro proximal na porção acroscópica 0.06-0.25 cm comp., soro distal na porção acroscópica 0.05-0.25 cm comp., soro proximal na porção basiscópica 0.1-0.25 cm comp., soro distal na porção basiscópica 0.05-0.18 cm comp. Podem se desenvolver até nas últimas pinas da lâmina. Indúcio oblongo, margem lisa a ondulada, membranáceo e hialino. **Esporos** oblongos ($\pm 34 \times 23 \times 14 \mu\text{m}$), com perina cristada, alas não anastomosadas, irregulares, superfície espiculada a lisa em algumas regiões, espinhos cônicos e espaçados, perina com perfurações restritas a superfície do esporo, não ocorrendo nas cristas.

- **Origem:** Nativa, não endêmica do Brasil. Ocorre na Mata Atlântica e Pampa.
- **Ecologia:** terrestre, epífita, ou rupícola sobre húmus. Ocorre desde o nível do mar a até 1000 metros de altitude. Comumente encontrada em mata ciliar, mata de araucária, locais sombreados, barrancos úmidos, onde corre pequenos córregos, entre raízes de árvores e musgos. Encontrada em solo arenoso e sobre rochas de arenito com acúmulo de húmus. Desenvolve-se bem em locais antropizados.
- **Distribuição geográfica:** Endêmica das regiões sul da América do Sul, sendo no Brasil restrita à região Sul (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo), Uruguai, Argentina e Paraguai.
- **Estado de conservação (IUCN):** Pouco preocupante (LC)

Material examinado: Brasil, Rio Grande do Sul: *Mostardas*, 09 Out 2013, *F. Gonzatti* 937 (HUCS 40866); *São Francisco de Paula*, Parque Estadual do Tainhas, Passo do S, *s.c. s.n.* (HAS 45503); *São Francisco de Paula*, Passo do Inferno, 10 Nov 1999, *R. M. Senna s.n.* (HAS 93167); *Bom Jesus*, Fazenda do Cilho, 11 Set 2011, *F. Gonzatti* 142 (HUCS 37473); *Caxias do Sul*, Desvio Rizzo, 20 Out 2011, *F. Gonzatti* 221 (HUCS 37915); *Jaquirana*, 13 de Out 2007, *P. G. Windish* 10218 (PACA 101758); *Nonoai*, Posto

Jacutinga, 14 Jan 1994, *R. Bueno s.n.* (HUCS 48398); *Caxias do Sul*, Criúva, Cascata da Mulata, 15 Ago 2016, *F. Gonzatti 2577* (HUCS 49631); *Encantado*, Linha Pinheirinho, 25 Jul 2014, *E. Freitas 927* (HVAT 4250); *Roca Sales*, Linha Bento Gonçalves, 06 Set 2013, *G. L. Ely Jr s.n.* (HVAT 4759); *Roca Sales*, Linha Fernando Abott, 17 Dez 2013, *N. Dameto s.n.* (HVAT 4853); *Santa Cruz do Sul*, Mar 1897, *J. Dutra 240* (ICN 14240); *Mostardas*, 09 Out 2013, *F. Gonzatti 937* (ICN 161359), *Guaíba*, Fazenda São Maximiano, 17 Mar 2010, *M. A. Kieling-Rubio 1016* (ICN 167384); *Dom Pedrito*, Várzea do Rio Santa Maria, 45km E de Dom Pedrito, matinho de galeria, 15 Out 1971, *J.C. Lindeman, B.E Irgang & J.F.M. Valls s.n.* (ICN 8590); *Santana da Boa Vista*, Fazenda Passo da Chácara, 29 Mar 1975, *A. Sehnem 14583* (PACA 73377); *Lageado*, Júlio de Castilhos, Jan 1937, *A. Sehnem 855* (PACA 73386); *São Francisco de Paula*, Rio Tainhas, 5 Ago 1962, *A. Sehnem 8087* (PACA 73390); *Gravataí*, Barro Vermelho, *J. Dutra 71* (ICN 14071); *Rio Pardo*, Fazenda Leitão, 8 Fev 1904, *Schoenwald, Deutrich s.n.* (ICN 18364); *Turvo*, 15 Jan 1982, *R. Bueno s.n.* (ICN 68717); *Tainhas*, 9 Fev 1957, *A. R. Schultz 1684* (ICN 1684); *Nova Palma*, 12 Mar 1981, *A. Alvarez s.n.* (SMDB 11220); *Quilombo*, Linha Manoel Mayer, 24 de Dez 2012, *F. Gonzatti 295* (SMDB 14411).

OBS: as amostras estão ordenadas em ordem de análise.

Figura 06 – Caracteres morfológicos de *Asplenium ulbrichtii*. A- Caule e raízes. B- Detalhe do caule com inserção das escamas. C- Pinas basais. D- Pinas medianas. E- Ápice da lâmina radicante com detalhe da gema.

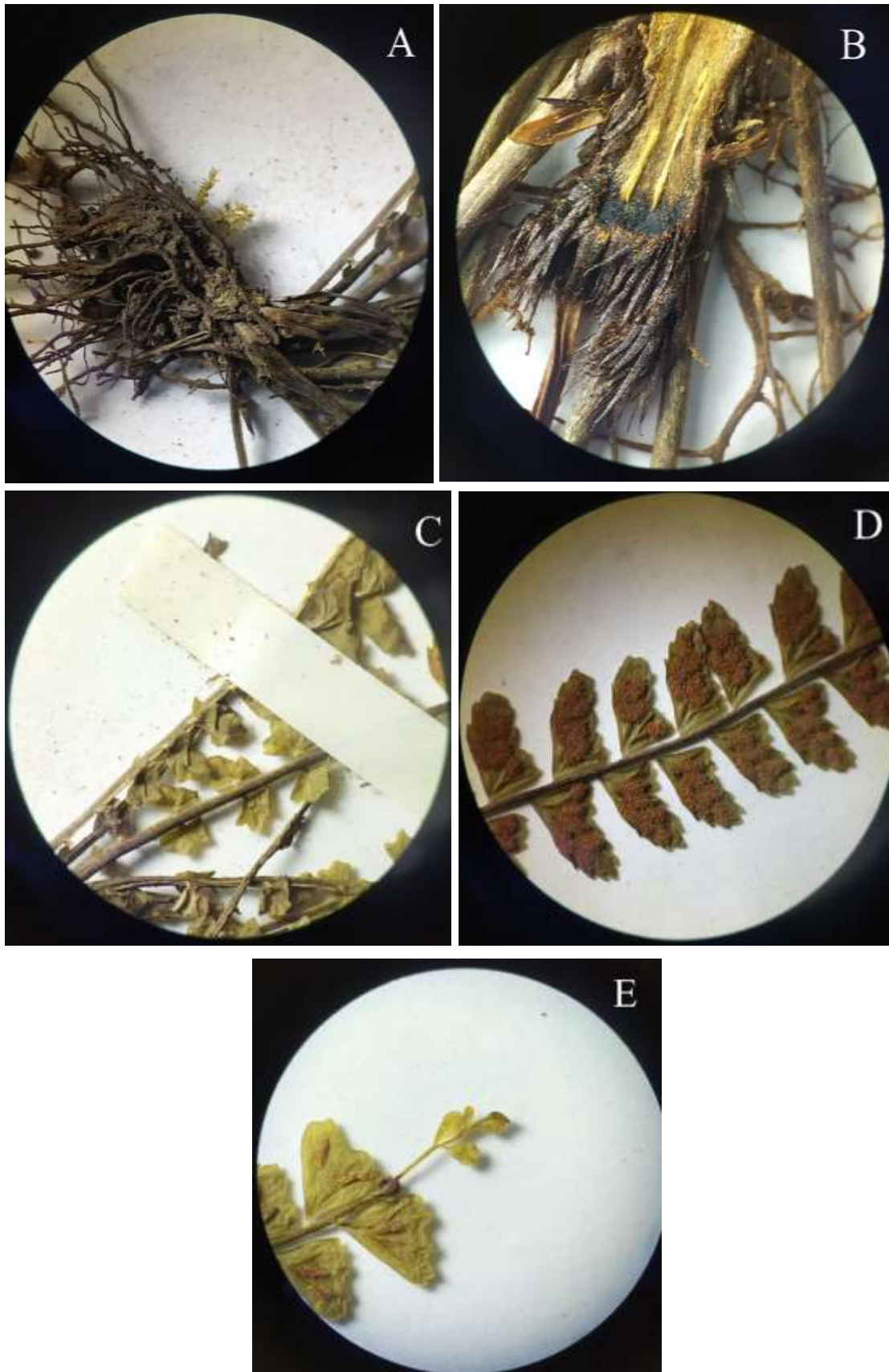
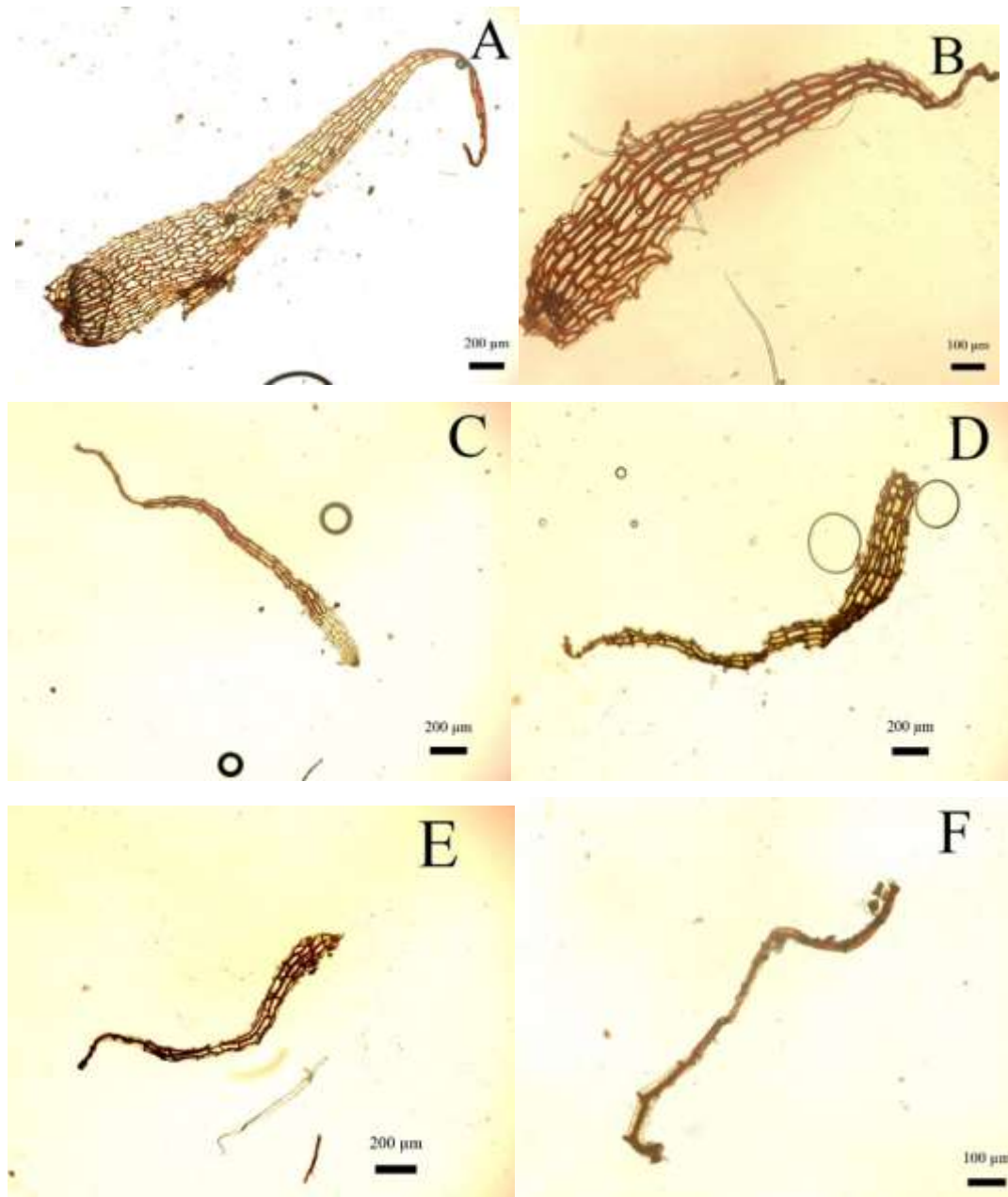


Figura 07 - Escama de *Asplenium ulbrichtii*. A- Escama do caule lanceolada; B-D. Escama do pecíolo. B- lanceolada. C- linear. D- linear-lanceolada; E-F- Escama da raque. E- linear. F- filiforme.



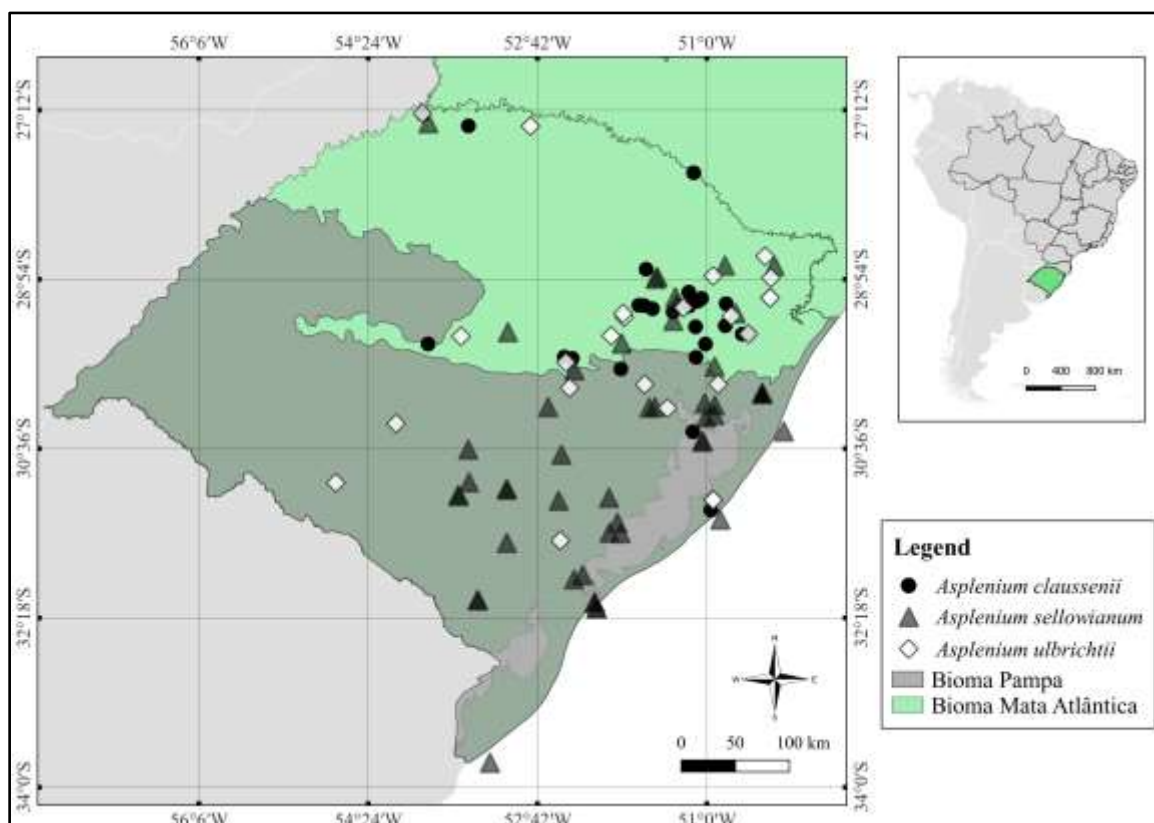
Ecologia e distribuição

Em relação a distribuição no estado, *A. clausenii* é o que possui a mais ampla ocorrência, seguido de *A. ulbrichtii*, sendo catalogados por todo o estado na Mata Atlântica e Pampa; em áreas úmidas, próximos a rios/córregos, em barrancos, beira e interior de mata. Já *A. sellowianum*, têm sua ocorrência mais restrita à Região Litorânea

(Fig. 08). Também tendo preferências por áreas úmidas e barrancos. Ambas as espécies se desenvolvem em solo arenoso, porém em *A. clausenii* tem-se observado uma preferência por solo mais rico em húmus onde desenvolve-se em grandes touceiras com as numerosas frondes distribuídas em forma de rosetas, sempre encontra-se com acúmulo de terra, galhos e folhas de árvores entre as frondes. *A. ulbrichtii* é mais observado com hábito epífita e rupícola em rochas de arenito com acúmulo de húmus, ou comumente crescendo na base de árvores e em pequenos/grandes barrancos abertos pelo fluxo da água da chuva. Quase sempre próximos a fontes de água. Enquanto, *A. sellowianum* é mais registrado em solo arenoso, em interior de matas e capões (próximos a dunas), barrancos onde também acumula húmus entre as frondes rosetadas, mas dispostas com menos volume que *A. clausenii*.

Para as informações de ecologia e distribuição, dependeu-se das informações fornecidas nas fichas catalográficas de coleta dos herbários, os quais muitas vezes não continham nenhuma informação adicional, predominando apenas nome de espécie, local e data.

Figura 08 – Mapa de ocorrência das espécies no Estado do Rio Grande do Sul-Brasil



Fonte: QGIS (2022)

Dados morfológicos

Como descrito por Sylvestre (2001; 2010), as diferenças morfológicas entre as três espécies do estudo são em grande parte relacionadas ao seu tamanho (fronde, pina, soro) e a presença de gema no ápice da lâmina. Observando as amostras de *A. sellowianum*, muitas não apresentavam gema, portanto foi separado em dois tipos de amostra: com gema na pina apical (*A. sellowianum* - radicante) e sem gema, com o ápice pinatífido (*A. sellowianum*). Entre as três espécies, consideram-se caracteres delimitantes o tamanho do pecíolo, espaço entre pina lateral, largura pina basal, largura meio da lâmina e comprimento do soro. Onde, *A. claussenii* possui as maiores medidas. Em relação ao *A. ulbrichtii*, que possui as menores medidas, os caracteres delimitantes são o tamanho do pecíolo, largura lâmina foliar porção da basal, largura lâmina foliar porção mediana e espaço entre pina lateral.

Entre *A. sellowianum* radicante e pinatífido, o primeiro apresenta medidas mais próximas ao *A. ulbrichtii*, e o segundo, ao *A. claussenii*. Mas, ambos ainda mantêm as características da espécie, ou seja, o ápice radicante torna-se um carácter nem sempre presente.

Análises de ultraestrutura dos órgãos e tecidos vegetativos e reprodutivos foram realizadas para buscar caracteres que pudessem ajudar a diferenciar ambas as espécies estudadas. Em relação as escamas dos caules e pecíolos (Fig 03C-D, Fig 05C-E, Fig 07C-E), em todas as três espécies estas são muito parecidas mesmo em microscopia eletrônica, o que dificulta a análise deste carácter e não contribuiu para a diagnose de identificação. A preparação do material, ou mesmo o protocolo de ponto crítico para a MEV alteram a ultra estrutura das escamas. O mesmo acontece com análise dos leptosporângios (Fig 09B, Fig 10B e Fig 11B), não sendo úteis as imagens deste tecido para a diferenciação das três espécies.

Os esporos de ambas as espécies apresentam uma grande semelhança entre si. As diferenças consistem na abundância de protuberâncias espinhosas da perina proeminente e perfurações nas dobras e superfície deste. *A. claussenii* possui maior abundância de superfície espinhosa, com espinhos mais finos e altos, e perfurações abundantes nas dobras e superfícies, de vários diâmetros (Fig. 09A). Já *A. ulbrichtii* tem uma perina com poucas protuberâncias espinhosas, chegando até a ser liso em algumas regiões, em geral

esses espinhos são mais cônicos e espaçados (Fig. 11A). As perfurações na perina também são menos numerosas, se restringindo mais a superfície e pouco presente nas dobras da perina. Diferentemente, *A. sellowianum* possui uma perina com protuberâncias espinhosas a denteadas, não altas, numerosas e próximas (Fig. 10A). Entretanto, as perfurações na perina são presentes da superfície e/ou até a base das dobras, não ultrapassando ao longo do comprimento destas.

Wei & Dong (2012) revisando os aspectos taxonômicos do gênero *Asplenium* sect. *Thamnopteris* já reportava que a ornamentação e fenestração dos esporos são os caracteres mais úteis para a delimitação das espécies desta seção que é uma das mais difíceis do gênero. Outros autores também ressaltam a importância deste caráter para a distinção das espécies (BRAGGINS & LARGE, 1990; SHAH et al., 2020; IRFAN et al. 2022), o que nos sugere que pelo menos *A. sellowianum* possui caracteres suficientes para uma diagnose mais precisa para a identificação deste táxon. Porém, como as análises de ultramicroscopia foram necessárias para vislumbrarmos essas diferenças, decidimos investir em análises mais profundas de morfometria.

Figura 09 – Microscopia eletrônica de varredura de *A. clausenii*. A - Esporo; B- Esporângio; C - Escama do caule; D - Escama do pecíolo.

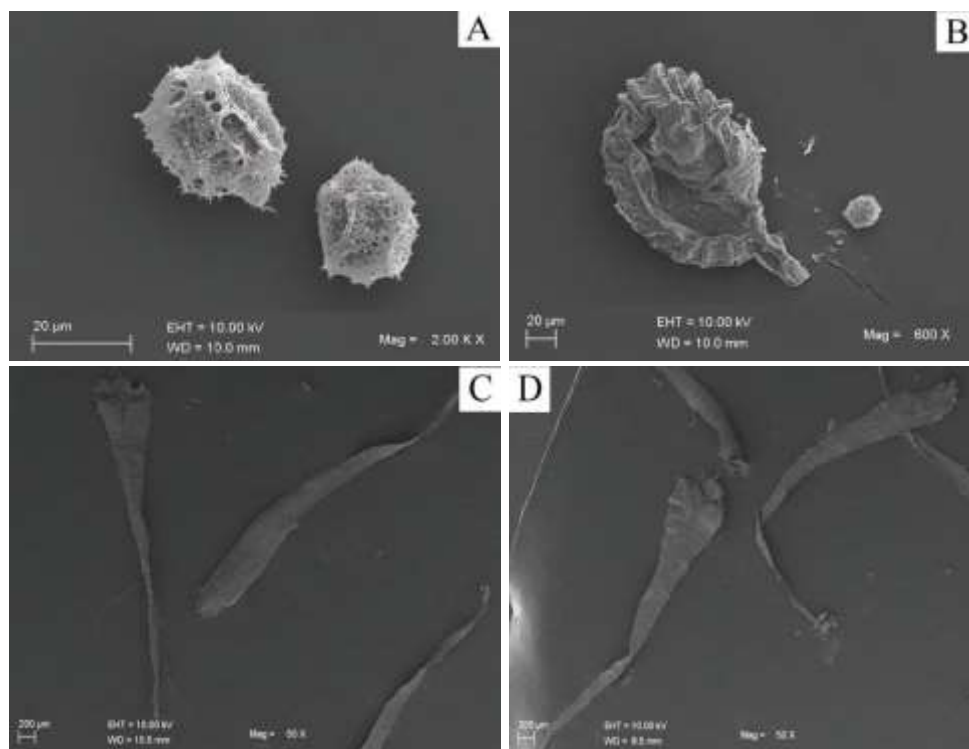


Figura 10 - Microscopia eletrônica de varredura de *A. sellowianum*. A - Esporo; B- Esporângio; C - Escama do caule; D - Escama do pecíolo; E - Escama da raque.

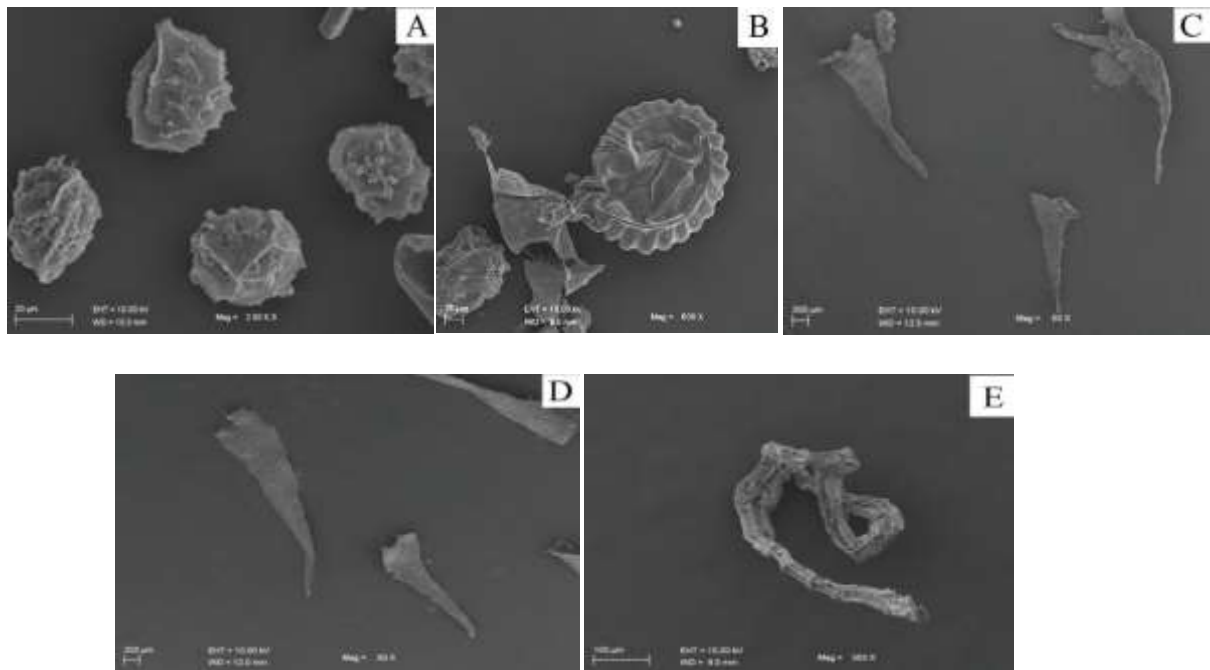
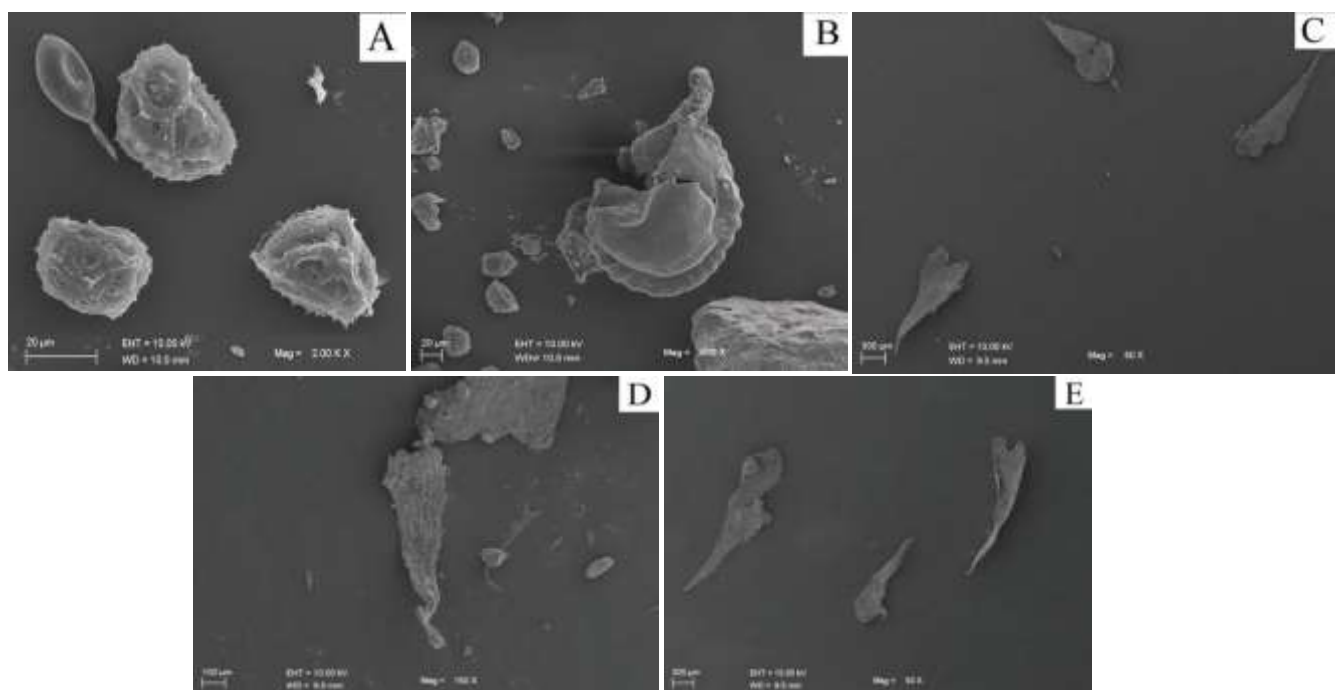


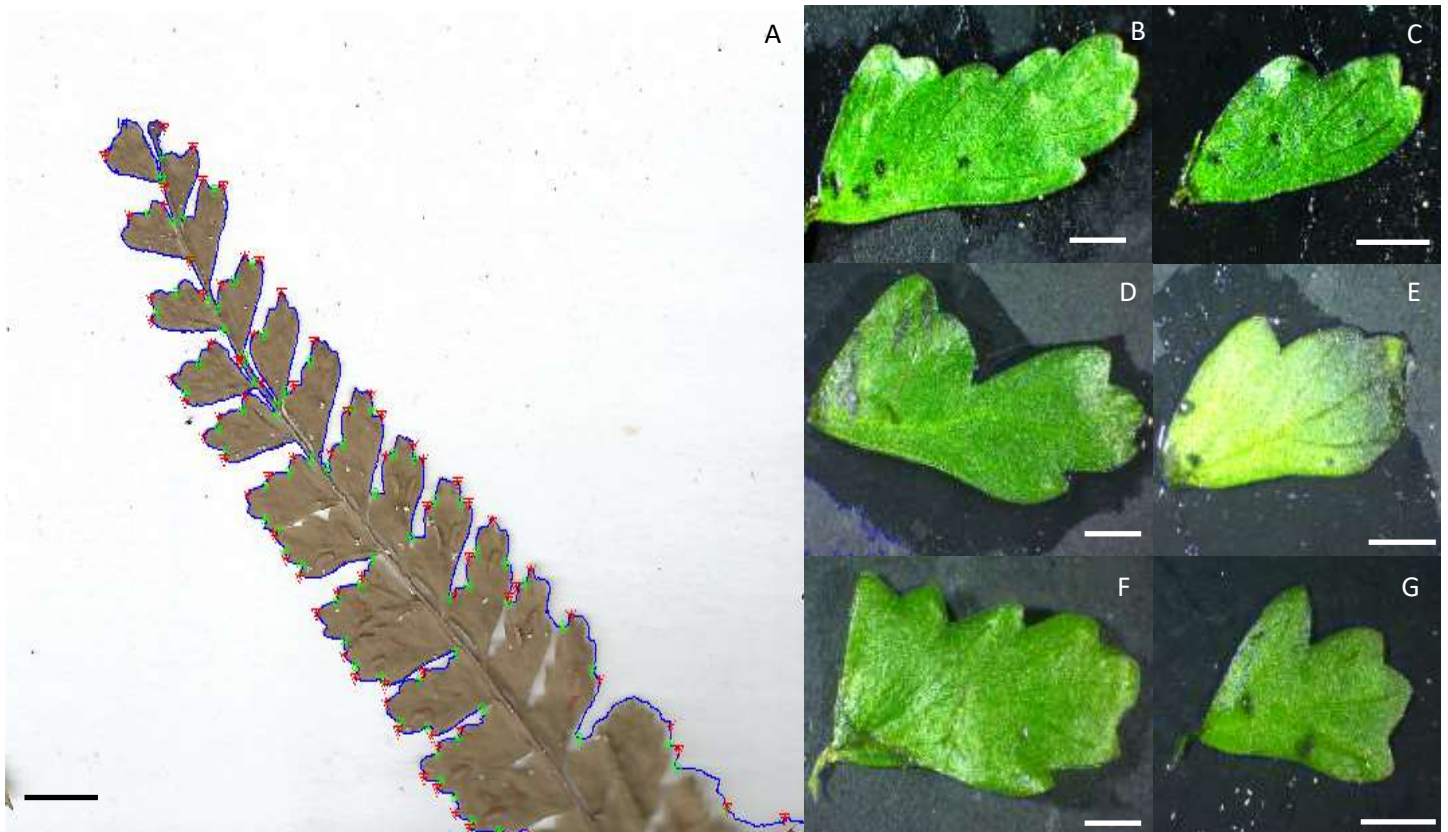
Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura de *A. ulbrichtii*. A - Esporo; B- Esporângio; C - Escama do pecíolo; D - Escama da raque; E - Escama do caule.



Análises Morfométricas das frondes e folíolos

As análises morfométricas das frondes e dos folíolos das três espécies de *Asplenium* selecionadas para o presente estudo (Fig 12A-G), foram realizadas utilizando tanto de amostras de herbário e de coletadas em campo buscando evidenciar eventuais diferenças entre as espécies. As análises das frondes, ápices e folíolos geraram um quantitativo de 2161 fatias, onde dos dados da largura, comprimento, perímetro (posição/largura/comprimento de indentações basais, superiores e terminais) demonstraram que as três espécies, apesar de serem de dimensões distintas, compartilham as mesmas proporções para as frondes, em especial pela amplitude das dimensões observadas nas amostras analisadas (Fig 13A). Já para as pinas, foi possível observar que em *A. clausenii* apresenta características morfométricas mais distinguíveis do que *A. sellowianum* e *A. ulbrichtii* (Fig 13B). Analisando os caracteres do perímetro das pinas, individualmente, observamos que a altura mediana dos dentes apicais dos folíolos contribui para estas duas últimas espécies se agrupam na análise de coordenadas principais para as características das pinas (Fig 13C).

Figura 12 – Amostras de ápices e pinas das frondes das espécies de *Asplenium*. A. Exemplo de ápice que foi utilizado para as mensurações no MorphoLeaf. B. Pina basal da fronde de *A. clausenii*. C. Pina apical da fronde de *A. clausenii*. D. Pina basal da fronde de *A. sellowianum*. E. Pina apical da fronde de *A. sellowianum*. F. Pina basal da fronde de *A. ulbrichtii*. G. Pina apical da fronde de *A. ulbrichtii*. Barra A=2cm; B,D,F= 2mm; C,E,G= 5mm.



Entretanto, a maior contribuição para a distinção das três espécies sob o viés morfométrico, ainda continua sendo os tamanhos dos folíolos maiores observados em *A. clausenii* que separa esta das demais espécies. Apesar de não encontrarmos estudos específicos que versam sobre estudos morfométricos que utilizam os caracteres foliares em *Asplenium*, os dados observados neste trabalho corroboram, em parte, os achados por Ekrt & Štech (2008), onde caracteres como tamanho das fronde separaram as espécies de *Asplenium* do grupo de *Asplenium trichomanes*. Este tipo de carácter apresenta variação considerável, em especial relacionada ao nível de ploidia variável entre as espécies deste grupo (BROWNSEY 1976, STEINECKE & BENNETT, 1993; HERRERO et al., 2001).

Figura 13 – Análise de coordenadas principais (PCA) da morfometria das frondes das três espécies de *Asplenium*. A. PCA dos ápices das frondes de *A. clausenii*, *A. sellowianum* e *A. ulbrichtii* e seus agrupamentos observados pelos círculos. B. PCA dos caracteres mensurados nas pina e os agrupamentos observados representados pelos círculos. C. PCA da contribuição dos caracteres dos pina para as distinções e agrupamentos resultantes das análises morfométricas para as três espécies selecionadas.



Análises Moleculares e tamanho dos genomas de *Asplenium clausenii*, *Asplenium sellowianum* e *Asplenium ulbrichtii*.

A análise do conjunto de dados moleculares de plastídios combinados usando ML apresentaram árvores filogenéticas com topologia semelhante, exceto para a região *rbcL*ESRBCL, onde observamos um arranjo muito diferente para três espécies de interesse (Fig 14 e 15). Em relação à topologia específica do agrupamento de *Asplenium clausenii*, *A. sellowianum* e *A. ulbrichtii*, foi difícil estimar quem seria a espécie irmã. Para as regiões *AtpA* e *TRNG* *A. ulbrichtii* aparece como ramo irmão das outras duas espécies (Fig 16 e 17), enquanto para as regiões *gapCPSH* e *gapCS*, *A. clausenii* é observado como ramo irmão das outras duas espécies (Fig 18 e 19). Entre o material de herbário revisado, apenas a região *AtpA* para uma amostra identificada como *A. sellowianum* radicante foi perfeitamente amplificada e validada na análise do amplicon obtido. Esta amostra não pareceu fazer parte do complexo estudado, pois se agrupou com *A. harpeodes* e *A. alatum*, em um ramo distante das três espécies alvo do presente trabalho. No entanto, por se tratar de material de herbário, já preservado e depositado por um tempo relativamente longo em uma coleção biológica, o DNA extraído possui qualidade questionável.

Pouco se sabe ainda sobre a herança das regiões plastídias em *Aspleniaceae*, sendo que o uso de marcadores baseados em *cpDNA* são utilizados desde o final do séc. XX (VOGEL et al., 1998).

Xu et al. (2019) apresentou um dos trabalhos mais completos até então. No mesmo trabalho, os autores reforçam a hipótese de monofilia para o gênero *Asplenium*, anteriormente postulada por estudos anteriores (KUO et al., 2011; SHEN & SHU, 2017). Para Vogel et al. (1998) o gênero pode ser agrupado em quatro superclados, baseado tanto nas informações oriundas das análises filogenéticas como dos dados macro-morfológicos. Porém, os mesmos autores reconhecem que ainda existem muitas incongruências entre os dados morfológicos e moleculares o que poderia ser explicado por eventos de hibridização ou duplicação dos genomas resultando em espécies poliplóides, como também é destacado por estudos clássicos e recentes com este gênero de samambaias (WAGNER et al., 1954; BELLEFROID et al., 2010; LEE et al., 2015)

Como cada uma das regiões apresentou agrupamento com incongruências em relação à topologia, verificou-se a pressão de seleção nas referidas regiões testadas. A região *rbcL*ESRBCL apresentou o maior número de sítios sob pressão diversificante em

relação às demais regiões plastidiais (Fig. 20A). Isso significa que houve um maior acúmulo de mutações não sinônimas nessa região, embora as funções desse gene nos processos atribuídos ao cloroplasto para o metabolismo das plantas não tenham se alterado. Assim, esta região não pode ser utilizada isoladamente como marcador para a resolução das filogenias deste grupo taxonômico, ainda mais para as espécies agrupadas em um complexo como o *Asplenium* alvo deste estudo.

Figura 14 – Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) para a região rbcL-ESRBCL. Os círculos vermelhos indicam o clado onde *A. clausenii*, *A. sellowianum* e *A. ulbrichtii* ficaram posicionados.

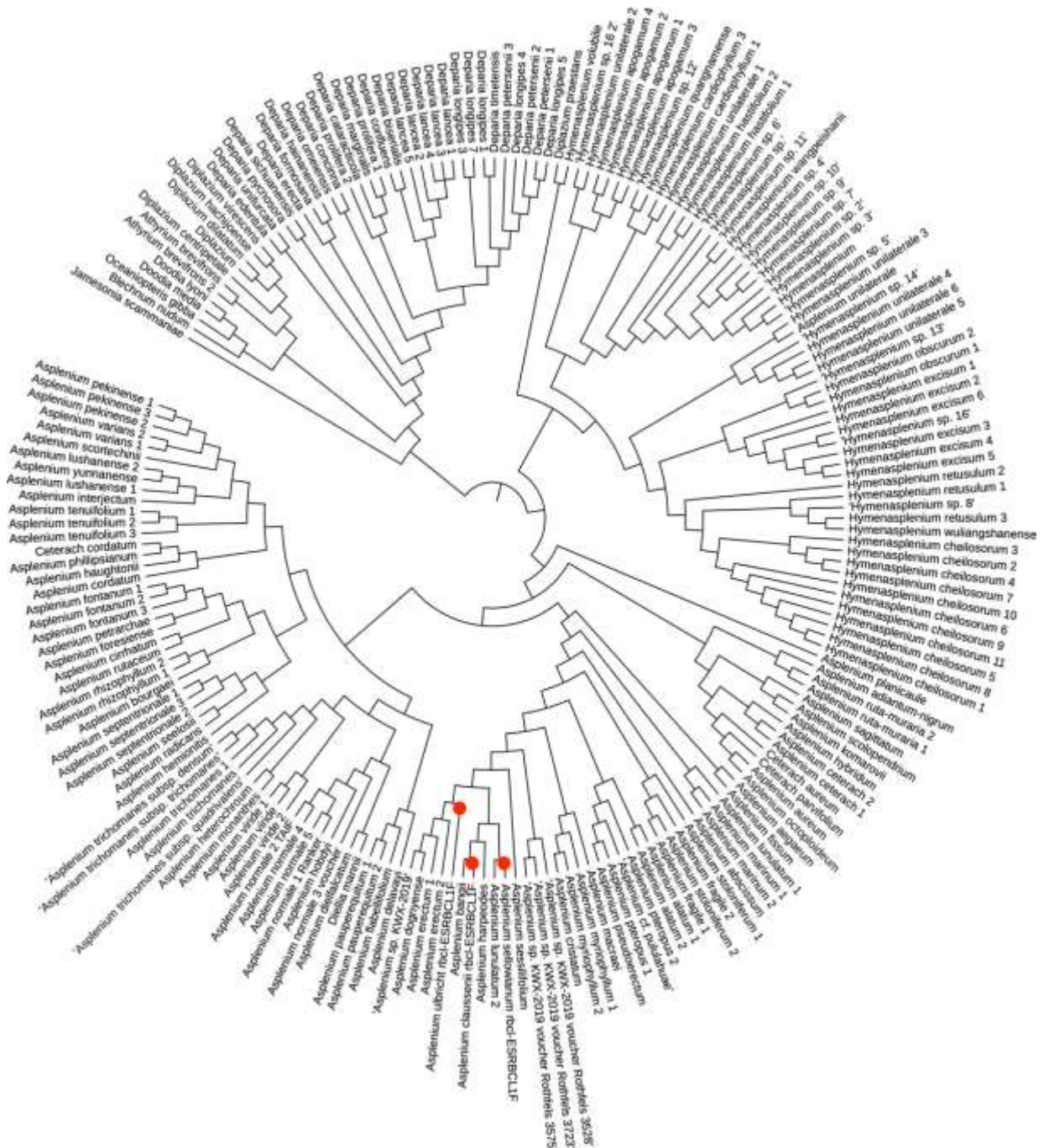


Figura 17 – Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) para a região TRNG. Os círculos vermelhos indicam o clado onde *A. clausseii*, *A. sellowianum* e *A. ulbrichtii* ficaram posicionados.



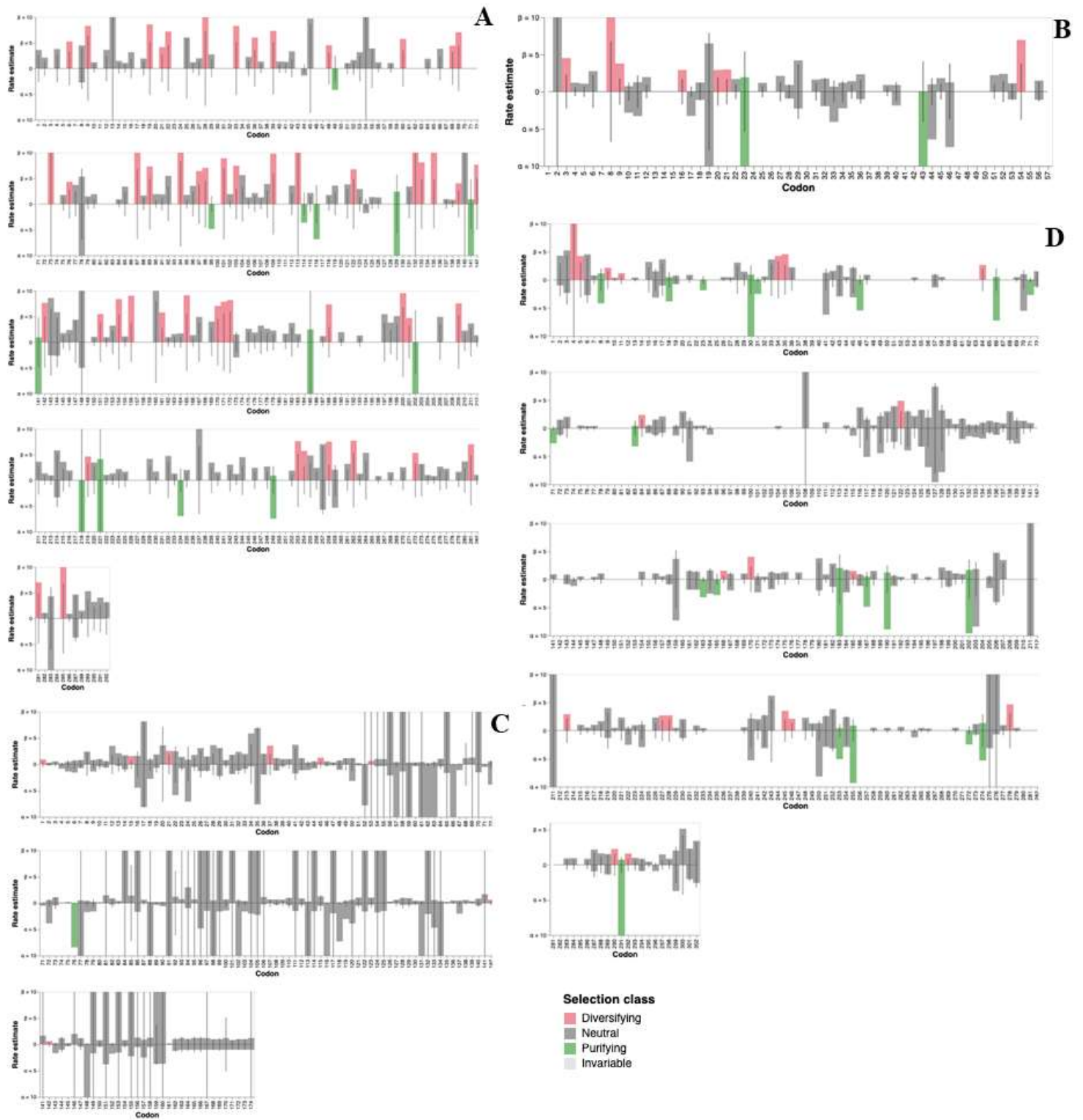
Figura 19 – Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) para a região gapCS. Os círculos vermelhos indicam os clados/grados onde *A. clausseii*, *A. sellowianum* e *A. ulbrichtii* ficaram posicionados.



A região TRNG apresentou mais sítios sob pressão purificadora (acúmulo de mais substituições sinônimas), sugerindo que, apesar desta região ter acumulado mais mutações (Fig 20B), mantêm-se os aminoácidos codificados. Por esta razão, para esta região em particular, dar-se á preferência no uso de alinhamento de sequências nucleotídicas, evitando assim o mascaramento das modificações o que pode incorrer em filogenias menos resolvidas, o que já foi constatado em estudos filogenômicos em monilófitas (SHEN et al., 2018). A região gapCPSH (Fig. 20C), pelo contrário, mostrou-se neutra, o que sinaliza uma pressão negativa maior, o que impede o acúmulo de mutações nessa região, ao contrário do que foi observado para AtpA (Fig 20D), que apresenta mais sítios sob pressão diversificante. Assim, mesmo com esta análise, não podemos definir para as filogenias apresentadas a topologia mais representativa para nossas espécies alvo, devido às muitas inconsistências observadas, sugerindo a probabilidade de estas formarem um complexo.

Além disso, entre as 3 espécies do complexo também houve incongruências nas topologias, com alternância entre *A. clausenii* e *A. ulbrichtii* como ramo externo ao complexo, dependendo da região analisada. Esses resultados, embora inconclusivos, sugerem que há uma clara impossibilidade de delimitação desse complexo de espécies, o que pode ser devido a eventos recentes na divergência desses táxons, configurando-os como espécies incipientes, ou porque não são espécies essencialmente diferentes. Eventos de alopoliplodia e duplicação genoma inteiro (WGD), em especial por eventos de hibridização, são extremamente comuns em *Asplenium*, sendo bem documentados na literatura (XU et al. 2019; TREWICK et al., 2002; LIN et al., 2022) e também identificado em diversos outros gêneros de samambaias correlatos (NITTA et al., 2018; ZHANG et al., 2019; CHEN et al., 2020).

Figura 20 – Estimativas de máxima verossimilhança de taxas sinônimas (α) e não sinônimas (β) em cada sítio de cada códon das regiões do cpDNA utilizadas nas análises filogenéticas para as espécies de *Asplenium*. A linha mostra as estimativas sob o modelo nulo ($\alpha=\beta$). Estimativas acima de 10 são censuradas neste valor. A. Relação de substituições sinônimas e não-sinônimas (dn/dS) para a região RBCL-ESRBCL. B. Relação de substituições sinônimas e não-sinônimas (dn/dS) para a região AtpA. C. Relação de substituições sinônimas e não-sinônimas (dn/dS) para a região gapCSH/CS. D. relação de substituições sinônimas e não-sinônimas (dn/dS) para a região TRNG.



Análise de citometria de fluxo utilizando núcleos isolados de *A. clausenii*, *A. sellowianum* e *A. ulbrichtii*.

Com base em uma análise comparativa e, utilizando uma planta de genoma conhecido, como *Lactuca sativa* L., foi evidenciado que o conteúdo genômico por célula de *A. clausenii* e *A. sellowianum* possuem, ambas a metade do genoma de *A. ulbrichtii* (Tab 2). Enquanto as duas primeiras espécies possuem cerca de 15pg de conteúdo de DNA, o que equivale com as bases de dados para tamanho de genomas de samambaias (HENRY et al., 2014; FUJIWARA et al., 2021) e com estudos realizados com outros complexos do gênero *Asplenium*, como *A. monanthes*, por exemplo (DYER et al., 2013). *Asplenium ulbrichtii* apresenta o dobro de conteúdo de DNA por célula, sugerindo que esta última espécie possa ter sofrido por processo de WGD, ou mesmo se tratar de um híbrido das outras duas espécies do complexo estudado, assim como já reportado para diversas outras samambaias (CLARK et al., 2016).

Isso explicaria, por parte dos alinhamentos e análises das regiões plastidiais, as incongruências nas topologias, pois por estamos estudando um híbrido putativo, este pode gerar ruído na análise e assim apresentar topologias difusas e diferentes para cada região plastidial quando alinhada.

Filogenia das regiões plastidiais concatenadas x caracteres morfológicos

Mesmo sendo a menor das três espécies estudadas e partindo do princípio de que *Asplenium ulbrichtii* poderia ser um híbrido e de que possa existir indícios na morfologia que possa ser rastreada como determinante para a determinação desta possível hibridização. Dessa forma, foi realizada uma análise de todas as regiões plastidiais concatenadas e associada aos dados da morfologia retirados da literatura como mais constantes das diagnoses das espécies e estudos morfológicos em *Asplenium* (LIN et al. 2022).

Os caracteres morfológicos possíveis de serem utilizados foram aqueles que estavam disponíveis para as espécies do gênero *Asplenium*, baseado na literatura ou nas descrições obtidas nas bases de dados de herbário (FLORA DO BRASIL, 2020; THIERS, 2020). Além disso, foram selecionadas para esta parte do trabalho somente aquelas espécies que possuíam sequências para todas as regiões plastidiais de interesse disponíveis no Genbank.

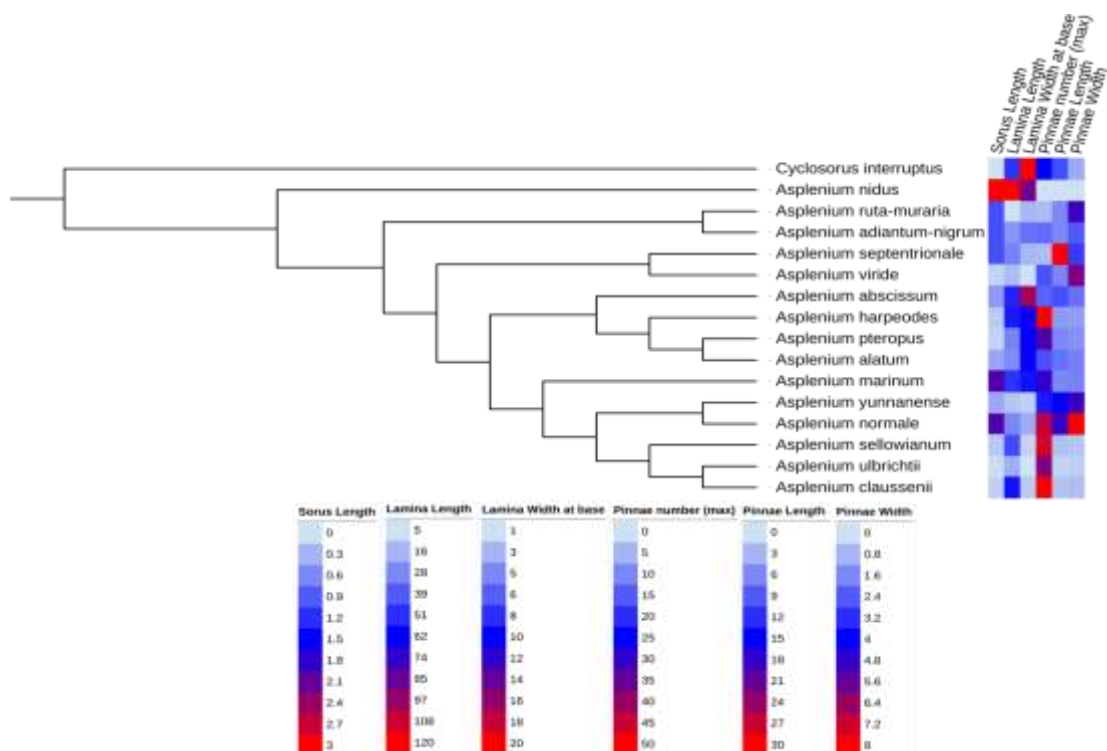
Como resultado foi possível evidenciar que os caracteres utilizados na análise refinada, refletem exatamente a existência de um intermediário nas proporções de *A.*

ulbrichtii em relação às outras duas espécies do complexo. Sendo a menor das 3 espécies, o número de pinas e o comprimento da lâmina de *A. ulbrichtii* são evidenciados como sendo um meio termo entre *A. clausenii* e *A. sellowianum* (Fig 21). Enquanto *A. ulbrichtii* apresenta número máximo de pinas (ca 40) comprimento médio da lâmina (ca 16 cm) entre o máximo de *A. clausenii* (ca 50 pinas e 51 cm lâmina) e o máximo de *A. sellowianum* (ca 45 pinas e 39 cm lâmina).

Tabela 2. Tamanho dos genomas obtidos para as três espécies de *Asplenium*.

Species	Fluorescence	DNA (pg)	DNA(Gb)
<i>Lactuca sativa</i>	2.242.481,59	5.95	2.5
<i>Asplenium sellowianum</i>	5.741.289,53	15.23	6.4
<i>Asplenium ulbrichtii</i>	9.923.788,05	26.33	11.06
<i>Asplenium clausenii</i>	5.741.289,53	15.23	6.4

Figura 21 – Filogenia de espécies do gênero *Asplenium* utilizando as regiões RBCL-ESRBCL, TRNG, AtpA e gapCSH concatenadas e comparadas com matriz de dados morfológicos para caracteres mais usuais em diagnóstico do gênero. O alinhamento das regiões concatenadas foi realizado no RaxML e a matriz de dados morfológicos foi utilizada para a anotação das topologias. *Cyclosorus interruptus* foi utilizado como grupo externo para esta filogenia.



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da morfologia consideram-se caracteres delimitantes o tamanho do pecíolo, espaço entre pina lateral, largura pina basal, largura meio da lâmina e comprimento do soro. *A. clausenii* possui as maiores medidas e *A. ulbrichtii* as menores medidas. A variação de *A. sellowianum* radicante possui proporções mais próximas ao *A. ulbrichtii*, enquanto a variação *A. sellowianum* pinatífido ao *A. clausenii*. Contudo, como a pina apical não foi um caractere delimitador, *A. sellowianum* se mantém como táxon único. Os dados da ultraestrutura dos esporos, possibilitam distinguir *A. sellowianum* das outras duas espécies. O padrão da perina, apesar de semelhante entre as três espécies, apresenta maior ornamentação e fenestração em *A. clausenii* e em *A. ulbrichtii* do que o observado em *A. sellowianum*. Portanto, através dos esporos as três espécies ainda permanecem como táxons únicos.

Em vista da morfometria, apesar das espécies possuírem dimensões distintas, compartilham as mesmas proporções para as frondes. Mas, em relação as pinas *A. clausenii* continua tendo os maiores tamanhos das pinas que as outras duas. Os únicos caracteres que agrupam *A. sellowianum* e *A. ulbrichtii* é a altura mediana dos dentes apicais das pinas.

Os resultados das análises moleculares de plastídios demonstraram árvores filogenéticas com topologia semelhante, exceto para a região rbcL_{ESRBCL}. Consequentemente *Asplenium ulbrichtii* apresenta o dobro de conteúdo de DNA por célula sendo, portanto, tratado como um possível híbrido entre nossas espécies.

Porém, acreditamos que com estudos mais aprofundados e novas análises morfométricas, utilizando caracteres que geralmente são amplificados em casos de alopoliploides, pode-se esclarecer melhor e trazer dados mais detalhados sobre a relação entre estas espécies do Complexo *A. clausenii* no Rio Grande do Sul.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARANYI, M, GREILHUBER, J. Flow cytometric analysis of genome size variation in cultivated and wild *Pisum sativum* (Fabaceae). **Plant Syst Evol** 194:231–239, 1995.

BELLEFROID, E., RAMBE, S. K., LEROUX, O., & VIANE, R. L. The base number of ‘loxoscapoid’ *Asplenium* species and its implication for cytoevolution in Aspleniaceae. **Annals of Botany**, v. 106, n. 1, p. 157–171, 2010.

BIOT, E., CORTIZO, M., BURGUET, J., KISS, A., OUGHOU, M., MAUGARNY-CALÈS, A., ... & LAUFS, P. Multiscale quantification of morphodynamics: MorphoLeaf software for 2D shape analysis. **Development**, v. 143, n. 18, p. 3417-3428, 2016.

BRAGGINS, J.E., LARGE, M.F. Spore morphology as a taxonomic data source in Cyathea J.E. Smith and Asplenium L. **Rev Palaeobot Palynol**, v. 64, p. 149–158, 1990.

BROWNSEY, P. J. A biosystematic investigation of the *Asplenium lepidum* complex. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 72, n. 4, p. 235-267, 1976.

CHEN, C. W., HSU, T. C., CHAO, Y. S., LU, P. F., LI, C. W., TRAM, N. K. T., ... & PARRIS, B. A newly recorded genus and twelve newly recorded species of ferns for Vietnam from Lang Biang Plateau. **Phytotaxa**, v. 443, n. 2, p. 121–143-121–143, 2020.

CLARK, J., HIDALGO, O., PELLICER, J., Liu, H., MARQUARDT, J., ROBERT, Y., ... & SCHNEIDER, H. Genome evolution of ferns: evidence for relative stasis of genome size across the fern phylogeny. **New Phytologist**, v. 210, n. 3, p. 1072-1082, 2016.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. 1987.

DYER, R. J., PELLICER, J., SAVOLAINEN, V., LEITCH, I. J., & SCHNEIDER, H. Genome size expansion and the relationship between nuclear DNA content and spore size in the *Asplenium monanthes* fern complex (Aspleniaceae). **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2013.

EKRT L. & ŠTECH M. A morphometric study and revision of *the Asplenium trichomanes* group in the Czech Republic. **Preslia**, v 80, n. 3, p. 325-347, 2008.

FIDALGO, Oswaldo. Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. **Instituto de Botânica**, 1989.

FUJIWARA, T., LIU, H., MEZA-TORRES, E. I., MORERO, R. E., VEGA, A. J., LIANG, Z., ... & SCHNEIDER, H. Evolution of genome space occupation in ferns: linking genome diversity and species richness. **Annals of Botany**, 2021.

HENRY, T. A.; BAINARD, J. D.; NEWMASTER, S. G. Genome size evolution in Ontario ferns (Polypodiidae): evolutionary correlations with cell size, spore size, and habitat type and an absence of genome downsizing. **Genome**, v. 57, n. 10, p. 555-566, 2014.

HERRERO, A.; PAJARÓN, S.; PRADA, C.. Isozyme variation and genetic relationships among taxa in the *Asplenium obovatum* group (Aspleniaceae, Pteridophyta). **American Journal of Botany**, v. 88, n. 11, p. 2040-2050, 2001.

<http://www.splink.org.br/index?lang=pt>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

IRFAN, M.; JAN, G., MURAD, W. & JAN, F. G. Taxonomic importance of spore morphology of selected taxa of *Asplenium* (Aspleniaceae) from Pakistan. **Microscopy Research and Technique**, 2022.

JESSEN, S. *Asplenium trichomanes* L. subsp. *hastatum*, stat. nov.—eine neue Unterart des Braunstiel-Streifenfarnes in Europa und vier neue intraspezifische Hybriden (Aspleniaceae, Pteridophyta). **Ber. Bayer. Bot. Ges.**, v. 65, p. 107-132, 1995.

KUO L-Y, Li F-W, CHIOU W-L, WANG C-N. First insights into fern matK phylogeny, **Mol. Phylogenet. Evol.**, vol. 59, p. 556-566, 2011.

LARGE, M. F.; BRAGGINS, J. E. Effect of different treatments on the morphology and size of fern spores. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 64, n. 1-4, p. 213-221, 1990.

LARSSON, Anders. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. **Bioinformatics**, v. 30, n. 22, p. 3276-3278, 2014.

LEE, C. S., K. LEE., S. H. YEAU and K.-S. CHUNG. Two new and one unrecorded natural hybrids between *Asplenium ruprechtii* and related taxa (Aspleniaceae). **Korean Journal of Plant Taxonomy**, v. 45, n. 4, p. 362-368, 2015.

LETUNIC, I., BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, 2021.

LIN, C. X., XU, G. L., JIN, Z. F., LIAO, W. B., & XU, K. W. Molecular, chromosomal, and morphological evidence reveals a new allotetraploid fern species of *Asplenium* (Aspleniaceae) from southern Jiangxi, China. **PhytoKeys**, v. 199, p. 113-127, 2022.

MADDISON, W. P. and D.R. MADDISON. 2021. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.60 <http://www.mesquiteproject.org>

MAP, Show Static. pE-SUMOstar Amp. **signal**, v. 1280, n. 1, p. 5.

NITTA, J. H.; EBIHARA, Atsushi. Virtual issue: Ecology and evolution of pteridophytes in the era of molecular genetics. **Journal of plant research**, v. 132, n. 6, p. 719-721, 2019.

NYHUS, G. C. The subspecies of *Asplenium trichomanes* in Norway. **Blyttia**, v. 45, n. 1, p. 12-24, 1987.

PELLICER, J.; LEITCH, Ilia J. The application of flow cytometry for estimating genome size and ploidy level in plants. In: **Molecular plant taxonomy**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 279-307, 2014.

PINTER, I., BAKKER, F., BARRETT, J., COX, C., GIBBY, M., HENDERSON, S., ... & VOGEL, J. Phylogenetic and biosystematic relationships in four highly disjunct polyploid complexes in the subgenera *Ceterach* and *Phyllitis* in *Asplenium* (Aspleniaceae). **Organisms Diversity & Evolution**, v. 2, n. 4, p. 299-311, 2002.

POND, S. L. K. & FROST, S. DW. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. **Bioinformatics**, v. 21, n. 10, p. 2531-2533, 2005.

POND, S. L. K., FROST, S. DW, GROSSMAN Z., GRAVENOR, M. B., RICHMAN, D. D., & BROWN A. J. Adaptation to different human populations by HIV-1 revealed by codon-based analyses. **PLoS Comput Biol**, v. 2, n. 6, p. e62, 2006.

PPG I. A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. **Journal of systematics and evolution**, v. 54, n. 6, p. 563-603, 2016.

PRADO, J., SYLVESTRE, L. D. S., LABIAK, P. H., WINDISCH, P. G., SALINO, A., BARROS, I. C., ... & PEREIRA, A. F. D. N. Diversity of ferns and lycophytes in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 1073-1083, 2015.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9490, 2010.

QGIS Development Team, 2022. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing, Vienna**. Available in: <<https://www.R-project.org>>. 2022.

REICHSTEIN, T. Aspleniaceae. In: Conert, H. J., U. Hamann, W. Schultze-Motel and G. Wagenitz (eds.) **Gustav Hegi Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Band 1, Pteridophyta. Teil 1**. P. Parey, Berlin, Hamburg. p. 211–275, 1984.

REICHSTEIN, T. Hybrids in European Aspleniaceae (Pteridophyta). Significance, recognition, genome analysis, and fertility; checklist of species and hybrids. Description

of some new hybrids and cytology of several already know hybrids. **Botanica Helvetica** v. 91, p. 89–139, 1981.

Samambaias e Licófitas in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB128483>>.

SCHNEIDER, H., NAVARRO-GOMEZ, A., RUSSELL, S. J., ANSELL, S., GRUNDMANN, M., & VOGEL, J. Exploring the utility of three nuclear regions to reconstruct reticulate evolution in the fern genus *Asplenium*. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 51, n. 2, p. 142-153, 2013.

SCHNEIDER, H.; PRYER, K. M. Structure and function of spores in the aquatic heterosporous fern family Marsileaceae. **International Journal of Plant Sciences**, v. 163, n. 4, p. 485-505, 2002.

SHAH, S. N., AHMAD, M., ZAFAR, M., HADI, F., KHAN, M. N., NOOR, A., ... & IQBAL, M. Spore morphology and leaf epidermal anatomy as a taxonomic source in the identification of *Asplenium* species from Malakand division Pakistan. **Microscopy Research and Technique**, v. 83, n. 11, p. 1354-1368, 2020.

SHEN, H., JIN, D., & SHU, J. Supporting data for “Large scale phylogenomic analysis resolves a backbone phylogeny in ferns.” **GigaScience Database** 2017.

SHEN, H., JIN, D., SHU, J. P., ZHOU, X. L., LEI, M., WEI, R., ... & Yan, Y. H. Large-scale phylogenomic analysis resolves a backbone phylogeny in ferns. **GigaScience**, v. 7, n. 2, p. 116, 2018.

SMITH AR, PRYER KM, SCHUETTPELZ E, KORALL P, SCHNEIDER H, WOLF PG. 2006. A classification for extant ferns. **Taxon** v. 55, n. 3, p. 705-731, 2006.

STEINECKE, K.; BENNERT, H. W. Biosystematic investigations of the *Asplenium obovatum* complex (Aspleniaceae, Pteridophyta). I. Morphology. **Botanische Jahrbücher für Systematik Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie**, v. 114, p. 481-502, 1993.

SYLVESTRE, L. S. Revisão taxonômica das espécies da família Aspleniaceae AB Frank ocorrentes no Brasil. **Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Botânica)–Instituto de Biociências**, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.

SYLVESTRE, L.S. & WINDISCH, P.G. Diversity and distribution patterns of Aspleniaceae in Brazil. *In*: Chandra, S. & Srivastava, M. (eds.). **Pteridology in the new Millenium. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht**. p. 107-120, 2003.

SYLVESTRE, L. S. Notas nomenclaturais em Aspleniaceae (Polypodiopsida) ocorrentes no Brasil/Taxonomic notes in Aspleniaceae (Polypodiopsida) from Brazil. **Rodriguésia**, p. 109-114, 2010.

THIERS B. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. 2022. <http://sweetgum.nybg.org/ih/> [accessed 18 Jun 2022]

TREWICK, S. A., MORGAN-RICHARDS, M., RUSSELL, S. J., HENDERSON, S., RUMSEY, F. J., PINTER, I., ... & VOGEL, J. C. Polyploidy, phylogeography and Pleistocene refugia of the rockfern *Asplenium ceterach*: evidence from chloroplast DNA. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 10, p. 2003-2012, 2002.

TRIFINOPOULOS, J., NGUYEN, L. T., von HAESELER, A., & Minh, B. Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W232-W235, 2016.

TRYON, R.M. & TRYON, A.F. Ferns and allied plants with special reference to tropical América. New York, **Springer**, 870p, 1982.

VOGEL, J. C., RUSSELL, S. J., RUMSEY, F. J., BARRETT, J. A., & GIBBY, M. Evidence for maternal transmission of chloroplast DNA in the genus *Asplenium* (Aspleniaceae, Pteridophyta). **Botanica Acta**, v. 111, n. 3, p. 247-249, 1998.

WAGNER, W. H. Reticulate evolution in the Appalachian *Aspleniums*. **Evolution**, v. 8, n. 2, p. 103-118, 1954.

WEAVER, S., SHANK, S. D., SPIELMAN, S. J., LI, M., MUSE, S. V., & POND, S. L. K. Datamonkey 2.0: a modern web application for characterizing selective and other evolutionary processes. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 3, p. 773-777, 2018.

WEI, Ling-Ling; DONG, Shi-Yong. Taxonomic studies on *Asplenium* sect. *Thamnopteris* (Aspleniaceae) II: spore morphology. **Nordic Journal of Botany**, v. 30, n. 1, p. 90-103, 2012.

WETZEL, M. L. R., SYLVESTRE, L. D. S., BARROS, C. F., & VIEIRA, R. C. Vegetative anatomy of *Aspleniaceae* newman from Brazilian Atlantic rainforest and its application in taxonomy. **Flora**, v. 233, p. 118-126, 2017.

XU, K.W et al. A global plastid phylogeny of the fern genus *Asplenium* (Aspleniaceae). **Cladistics** v. 36, n. 1, p. 22-71. 2019.

YAMADA, K. D.; TOMII, K.; KATOH, K. Application of the MAFFT sequence alignment program to large data—reexamination of the usefulness of chained guide trees. **Bioinformatics**, v. 32, n. 21, p. 3246-3251, 2016.

ZHANG, J., LIU, L., SHU, J. P., JIN, D. M., SHEN, H., CHEN, H. F., ... & YAN, Y. H. Transcriptomic evidence of adaptive evolution of the epiphytic fern *Asplenium nidus*. **International journal of genomics**, v. 2019, 2019.

Tabela 03 – Acessos do GENBANK/NCBI utilizados nas análises filogenéticas para as regiões AtpA, gapCpSh, rbcL e TRNG.

Espécie	Região	Acesso NCBI
<i>Asplenium harpeodes</i>	atpA	EF463596.1
<i>Asplenium pteropus</i>	atpA	EF463605.1
<i>Asplenium alatum</i>	atpA	EF463590.1
<i>Asplenium abscissum</i>	atpA	EF463587.1
<i>Asplenium marinum</i>	atpA	EF463598.1
<i>Asplenium theciferum</i>	atpA	JF832094.1
<i>Asplenium theciferum</i>	atpA	EF463612.1
<i>Asplenium sandersonii</i>	atpA	EF463609.1
<i>Asplenium platyneuron</i>	atpA	EF463603.1
<i>Asplenium foresiense</i>	atpA	EF463594.1
<i>Asplenium theciferum</i>	atpA	DQ390545.1
<i>Asplenium viride</i>	atpA	KF186560.1
<i>Asplenium septentrionale</i>	atpA	JF832093.1
<i>Asplenium tenerum</i>	atpA	EF463611.1
<i>Asplenium scolopendrium</i>	atpA	EF463610.1
<i>Asplenium nidus</i>	atpA	EF463600.1
<i>Asplenium loriceum</i>	atpA	EF463595.1
<i>Asplenium feei</i>	atpA	EF463593.1
<i>Asplenium ruta-muraria</i>	atpA	EF463608.1
<i>Asplenium ritoense</i>	atpA	EF463607.1
<i>Asplenium planicaule</i>	atpA	EF463602.1
<i>Asplenium adiantum-nigrum</i>	atpA	EF463588.1
<i>Asplenium trichomanes</i>	atpA	JF832095.1
<i>Asplenium trichomanes</i>	atpA	EF463613.1
<i>Asplenium praemorsum</i>	atpA	EF463604.1
<i>Asplenium contiguum</i>	atpA	EF463592.1
<i>Asplenium affine</i>	atpA	EF463589.1
<i>Asplenium juglandifolium</i>	atpA	JF832092.1
<i>Asplenium juglandifolium</i>	atpA	EF463597.1
<i>Asplenium auritum</i>	atpA	EF463591.1
<i>Asplenium platyneuron</i>	(gapCpSh)	KR826181.1
<i>Asplenium platyneuron</i>	(gapCpSh)	KR826181.1
<i>Asplenium carnarvonense</i>	(gapCpSh)	KP281334.1
<i>Asplenium attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281371.1
<i>Asplenium sp.</i>	(gapCpSh)	KP281367.1
<i>Asplenium attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281365.1
<i>Asplenium paleaceum</i>	(gapCpSh)	KP281348.1

<i>Asplenium</i>	<i>paleaceum</i>	(gapCpSh)	KP281347.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281377.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281376.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281375.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281374.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281373.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281369.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281368.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281366.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281359.1
<i>Asplenium</i>	<i>bicentennale</i>	(gapCpSh)	KP281350.1
<i>Asplenium</i>	<i>carnarvonense</i>	(gapCpSh)	KP281335.1
<i>Asplenium</i>	<i>carnarvonense</i>	(gapCpSh)	KP281333.1
<i>Asplenium</i>	<i>nidus</i>	(gapCpSh)	KR826180.1
<i>Asplenium</i>	<i>nidus</i>	(gapCpSh)	KR826180.1
<i>Asplenium</i>	<i>nidus</i>	(gapCpSh)	KR826180.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	(gapCpSh)	JX475218.1
<i>Asplenium</i>	<i>monanthes</i>	(gapCpSh)	JX475213.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281380.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281379.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281378.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281370.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281360.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281358.1
<i>Asplenium</i>	<i>viride</i>	(gapCpSh)	JX475230.1
<i>Asplenium</i>	<i>viride</i>	(gapCpSh)	JX475229.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	(gapCpSh)	JX475219.1
<i>Asplenium</i>	<i>monanthes</i>	(gapCpSh)	JX475215.1
<i>Asplenium</i>	<i>monanthes</i>	(gapCpSh)	JX475214.1
<i>Asplenium</i>	<i>adulterinum</i>	(gapCpSh)	JX475202.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281372.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281357.1
<i>Asplenium</i>	<i>bicentennale</i>	(gapCpSh)	KP281351.1
<i>Asplenium</i>	<i>paleaceum</i>	(gapCpSh)	KP281344.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	(gapCpSh)	JX475216.1
<i>Asplenium</i>	<i>attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281361.1
<i>Asplenium</i>	<i>bicentennale</i>	(gapCpSh)	KP281356.1
<i>Asplenium</i>	<i>bicentennale</i>	(gapCpSh)	KP281355.1
<i>Asplenium</i>	<i>bicentennale</i>	(gapCpSh)	KP281354.1
<i>Asplenium</i>	<i>bicentennale</i>	(gapCpSh)	KP281353.1
<i>Asplenium</i>	<i>paleaceum</i>	(gapCpSh)	KP281346.1

<i>Asplenium normale</i>	(gapCpSh)	JX475217.1
<i>Asplenium bicentennale</i>	(gapCpSh)	KP281352.1
<i>Asplenium paleaceum</i>	(gapCpSh)	KP281349.1
<i>Asplenium paleaceum</i>	(gapCpSh)	KP281345.1
<i>Asplenium attenuatum</i>	(gapCpSh)	KR049090.1
<i>Asplenium bicentennale</i>	(gapCpSh)	KP281342.1
<i>Asplenium attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281341.1
<i>Asplenium carnarvonense</i>	(gapCpSh)	KR049098.1
<i>Asplenium paleaceum</i>	(gapCpSh)	KR049097.1
<i>Asplenium paleaceum</i>	(gapCpSh)	KP281343.1
<i>Asplenium paleaceum</i>	(gapCpSh)	KP281336.1
<i>Asplenium adiantum-nigrum</i>	(gapCpSh)	JX475200.1
<i>Asplenium attenuatum</i>	(gapCpSh)	KR049091.1
<i>Asplenium paleaceum</i>	(gapCpSh)	KP281339.1
<i>Asplenium paleaceum</i>	(gapCpSh)	KP281337.1
<i>Asplenium attenuatum</i>	(gapCpSh)	KR049095.1
<i>Asplenium attenuatum</i>	(gapCpSh)	KR049094.1
<i>Asplenium attenuatum</i>	(gapCpSh)	KR049093.1
<i>Asplenium attenuatum</i>	(gapCpSh)	KR049092.1
<i>Asplenium adiantum-nigrum</i>	(gapCpSh)	JX475199.1
<i>Asplenium bicentennale</i>	(gapCpSh)	KP281364.1
<i>Asplenium bicentennale</i>	(gapCpSh)	KP281362.1
<i>Asplenium paleaceum</i>	(gapCpSh)	KP281332.1
<i>Asplenium attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281331.1
<i>Asplenium bicentennale</i>	(gapCpSh)	KP281363.1
<i>Asplenium adiantum-nigrum</i>	(gapCpSh)	JX475198.1
<i>Asplenium adiantum-nigrum</i>	(gapCpSh)	JX475197.1
<i>Asplenium sp.</i>	(gapCpSh)	KP281340.1
<i>Asplenium adulterinum</i>	(gapCpSh)	JX475201.1
<i>Asplenium dielerectum</i>	(gapCpSh)	JX475211.1
<i>Asplenium trichomanes</i>	(gapCpSh)	JX475228.1
<i>Asplenium scolopendrium</i>	(gapCpSh)	JX475226.1:
<i>Asplenium attenuatum</i>	(gapCpSh)	KP281338.1
<i>Asplenium praegracile</i>	(gapCpSh)	JX475225.1
<i>Asplenium praegracile</i>	(gapCpSh)	JX475224.1
<i>Asplenium praegracile</i>	(gapCpSh)	JX475223.1
<i>Asplenium praegracile</i>	(gapCpSh)	JX475222.1
<i>Asplenium praegracile</i>	(gapCpSh)	JX475221.1
<i>Asplenium cuneatiforme</i>	(gapCpSh)	JX475209.1
<i>Asplenium cuneatiforme</i>	(gapCpSh)	JX475207.1
<i>Asplenium platyneuron</i>	(gapCpSh)	KR826393.1

<i>Asplenium</i>	<i>platyneuron</i>	(gapCpSh)	KR826393.1
<i>Asplenium</i>	<i>scolopendrium</i>	(gapCpSh)	JX475227.1
<i>Asplenium</i>	<i>cuneatiforme</i>	(gapCpSh)	JX475210.1
<i>Asplenium</i>	<i>aethiopicum</i>	(gapCpSh)	JX475206.1
<i>Asplenium</i>	<i>aethiopicum</i>	(gapCpSh)	JX475204.1
<i>Asplenium</i>	<i>aethiopicum</i>	(gapCpSh)	JX475203.1:
<i>Asplenium</i>	<i>aethiopicum</i>	(gapCpSh)	JX475205.1
<i>Asplenium</i>	<i>cuneatiforme</i>	(gapCpSh)	JX475208.1
<i>Asplenium</i>	<i>platyneuron</i>	(gapCpSh)	MZ308457.1
<i>Cystopteris</i>	<i>bulbifera</i>	(gapCpSh)	KF553795.1
<i>Cystopteris</i>	<i>diaphana</i>	(gapCpSh)	KX376830.1
<i>Cystopteris</i>	<i>diaphana</i>	(gapCpSh)	KX376832.1
<i>Deparia</i>	<i>lobatocrenata</i>	(gapCpSh)	KR826200.1
<i>Woodsia</i>	<i>ilvensis</i>	(gapCpSh)	KF553790.1
<i>Asplenium</i>	<i>harpeodes</i>	(rbcL)	EF463150.1
<i>Asplenium</i>	<i>erectum</i>	(rbcL)	AY300113.1
<i>Asplenium</i>	<i>sp.</i>	(rbcL)	MW620307.1
<i>Asplenium</i>	<i>dognyense</i>	(rbcL)	KP774895.1
<i>Asplenium</i>	<i>bangii</i>	(rbcL)	MK826931.1
<i>Asplenium</i>	<i>sp.</i>	(rbcL)	MK827004.1
<i>Asplenium</i>	<i>lunulatum</i>	(rbcL)	AY549732.1
<i>Asplenium</i>	<i>macraei</i>	(rbcL)	MT215988.1
<i>Asplenium</i>	<i>myriophyllum</i>	(rbcL)	GU929865.1
<i>Asplenium</i>	<i>alatum</i>	(rbcL)	EF463145.1
<i>Asplenium</i>	<i>cf.</i>	(rbcL)	MW138240.1
<i>Asplenium</i>	<i>sessilifolium</i>	(rbcL)	MK827044.1
<i>Asplenium</i>	<i>pseudoerectum</i>	(rbcL)	MW138234.1
<i>Asplenium</i>	<i>cristatum</i>	(rbcL)	AY549731.1
<i>Asplenium</i>	<i>pteropus</i>	(rbcL)	EF463155.1
<i>Asplenium</i>	<i>alatum</i>	(rbcL)	MW620312.1
<i>Asplenium</i>	<i>abscissum</i>	(rbcL)	EF463142.1
<i>Asplenium</i>	<i>pteropus</i>	(rbcL)	GU929866.1
<i>Asplenium</i>	<i>fragile</i>	(rbcL)	AY549733.1
<i>Asplenium</i>	<i>sp.</i>	(rbcL)	MK827059.1
<i>Asplenium</i>	<i>sp.</i>	(rbcL)	MK827055.1
<i>Asplenium</i>	<i>stoloniferum</i>	(rbcL)	KF992440.1
<i>Asplenium</i>	<i>erectum</i>	(rbcL)	KF992431.1
<i>Asplenium</i>	<i>fragile</i>	(rbcL)	MK827058.1
<i>Asplenium</i>	<i>marinum</i>	(rbcL)	AF240647.1
<i>Asplenium</i>	<i>sp.</i>	(rbcL)	MK827057.1
<i>Asplenium</i>	<i>myriophyllum</i>	(rbcL)	AY300127.1

<i>Asplenium stoloniferum</i>	(rbcL)	MK826980.1:
<i>Asplenium alatum</i>	(rbcL)	MK826927.1
<i>Asplenium fissum</i>	(rbcL)	AY300114.1
<i>Asplenium lunulatum</i>	(rbcL)	GU929867.1
<i>Asplenium aegaeum</i>	(rbcL)	AY300103.1
<i>Asplenium cirrhatum</i>	(rbcL)	MW138232.1
<i>Asplenium seelosii</i>	(rbcL)	AY300140.1
<i>Asplenium flabellulatum</i>	(rbcL)	MW620253.1
<i>Asplenium radicans</i>	(rbcL)	GU929858.1
<i>Asplenium marinum</i>	(rbcL)	KU753804.1
<i>Asplenium viride</i>	(rbcL)	KF186528.1
<i>Asplenium rutaceum</i>	(rbcL)	MW138237.1
<i>Asplenium castaneum</i>	(rbcL)	MW620285.1
<i>Asplenium trichomanes</i>	(rbcL)	EF463157.1
<i>Asplenium trichomanes</i>	(rbcL)	MT657737.1
<i>Asplenium trichomanes</i>	(rbcL)	KF186504.1
<i>Ceterach cordatum</i>	(rbcL)	AF240650.1
<i>Asplenium pumilum</i>	(rbcL)	MW620398.1
<i>Asplenium petrarchae</i>	(rbcL)	AF525271.1
<i>Asplenium fontanum</i>	(rbcL)	AF525268.1
<i>Asplenium sagittatum</i>	(rbcL)	AF240646.1
<i>Asplenium pekinense</i>	(rbcL)	KY427331.1
<i>Asplenium septentrionale</i>	(rbcL)	AF525275.1
<i>Asplenium lushanense</i>	(rbcL)	AY545481.1
<i>Asplenium trichomanes</i>	(rbcL)	AF525276.1
<i>Asplenium dielfalcatum</i>	(rbcL)	MT657739.1
<i>Asplenium pauperequitum</i>	(rbcL)	AY283233.1
<i>Asplenium heterochroum</i>	(rbcL)	AY549745.1:
<i>Asplenium haughtonii</i>	(rbcL)	AF538321.1
<i>Asplenium septentrionale</i>	(rbcL)	GU929860.1
<i>Asplenium foresiense</i>	(rbcL)	EF463148.1
<i>Asplenium cordatum</i>	(rbcL)	AF538319.1
<i>Asplenium rhizophyllum</i>	(rbcL)	KF186530.1
<i>Asplenium adiantum-nigrum</i>	(rbcL)	EF463143.1
<i>Asplenium pauperequitum</i>	(rbcL)	DQ186550.1
<i>Asplenium yunnanense</i>	(rbcL)	AY545482.2
<i>Asplenium komarovii</i>	(rbcL)	MZ064529.1
<i>Asplenium ruta-muraria</i>	(rbcL)	AF525273.1
<i>Asplenium octoploideum</i>	(rbcL)	AF538316.1
<i>Asplenium aureum</i>	(rbcL)	AF538311.1
<i>Asplenium scolopendrium</i>	(rbcL)	AF240645.1

<i>Ceterach</i>	<i>aureum</i>	(rbcL)	AF240642.1
<i>Asplenium</i>	<i>septentrionale</i>	(rbcL)	JF832054.1
<i>Asplenium</i>	<i>viride</i>	(rbcL)	EU352295.1
<i>Asplenium</i>	<i>pekinense</i>	(rbcL)	AY545479.1
<i>Asplenium</i>	<i>phillipsianum</i>	(rbcL)	AF538320.1
<i>Asplenium</i>	<i>tenuifolium</i>	(rbcL)	LC496721.1
<i>Asplenium</i>	<i>hobdyi</i>	(rbcL)	MT657740.1
<i>Asplenium</i>	<i>fontanum</i>	(rbcL)	KC792624.1
<i>Asplenium</i>	<i>bourgaei</i>	(rbcL)	AY300108.1
<i>Asplenium</i>	<i>monanthes</i>	(rbcL)	MW620270.1
<i>Asplenium</i>	<i>lushanense</i>	(rbcL)	LC496720.1
<i>Diellia</i>	<i>mannii</i>	(rbcL)	AY549739.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	(rbcL)	MT657741.1
<i>Asplenium</i>	<i>varians</i>	(rbcL)	AY300147.1
<i>Asplenium</i>	<i>ceterach</i>	(rbcL)	AF538313.1
<i>Asplenium</i>	<i>ceterach</i>	(rbcL)	AF538312.1
<i>Asplenium</i>	<i>hybridum</i>	(rbcL)	AF240644.1
<i>Asplenium</i>	<i>planicaule</i>	(rbcL)	EF463153.1
<i>Asplenium</i>	<i>interjectum</i>	(rbcL)	AY545480.1
<i>Asplenium</i>	<i>varians</i>	(rbcL)	AY545478.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	(rbcL)	MN602739.1
<i>Asplenium</i>	<i>delavayi</i>	(rbcL)	LC496719.1
<i>Asplenium</i>	<i>pekinense</i>	(rbcL)	GU929864.1
<i>Asplenium</i>	<i>rhizophyllum</i>	(rbcL)	AY300136.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	(rbcL)	GU586824.1
<i>Hymenasplenium</i>	<i>wuliangshanense</i>	(rbcL)	MH065407.1
<i>Hymenasplenium</i>	<i>wangpeishanii</i>	(rbcL)	MK826645.1
<i>Hymenasplenium</i>	<i>volubile</i>	(rbcL)	MW138262.1
<i>Hymenasplenium</i>	<i>unilaterale</i>	(rbcL)	EF452140.1
<i>Hymenasplenium</i>	<i>sp.</i>	(rbcL)	LC496718.1
<i>Hymenasplenium</i>	<i>sp.</i>	(rbcL)	MH065432.1
<i>Hymenasplenium</i>	<i>sp.</i>	(rbcL)	MH065429.1
<i>Hymenasplenium</i>	<i>sp.</i>	(rbcL)	MH065404.1
<i>Hymenasplenium</i>	<i>sp.</i>	(rbcL)	MH065412.1
<i>Hymenasplenium</i>	<i>sp.</i>	(rbcL)	MH065399.1
<i>Hymenasplenium</i>	<i>sp.</i>	(rbcL)	MH065430.1
<i>Hymenasplenium</i>	<i>sp.</i>	(rbcL)	MH065426.1
<i>Hymenasplenium</i>	<i>retusulum</i>	(rbcL)	MH065379.1
<i>Hymenasplenium</i>	<i>quangnamense</i>	(rbcL)	LC427111.1
<i>Hymenasplenium</i>	<i>obscurum</i>	(rbcL)	MH065411.1
<i>Hymenasplenium</i>	<i>hastifolium</i>	(rbcL)	MH065398.1

<i>Hymenasplenium excisum</i>	(rbcL)	LC496716.1
<i>Hymenasplenium cheilosorum</i>	(rbcL)	JF832071.1
<i>Hymenasplenium cardiophyllum</i>	(rbcL)	MH065395.1
<i>Hymenasplenium apogamum</i>	(rbcL)	LC496715.1
<i>Ceterach aureum</i>	(rbcL)	AF240642.1
<i>Blechnum nudum</i>	(rbcL)	KJ170821.1
<i>Ceterach parvifolium</i>	(rbcL)	AF240640.1
<i>Asplenium marinum</i>	trnG-trnR	KP861375.1
<i>Asplenium marinum</i>	trnG-trnR	KP861375.1
<i>Asplenium marinum</i>	trnG-trnR	KP861374.1
<i>Asplenium marinum</i>	trnG-trnR	KP861374.1
<i>Asplenium hemionitis</i>	trnG-trnR	KU753794.1
<i>Asplenium hemionitis</i>	trnG-trnR	KU753794.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	MN602744.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	MN602744.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	MN602743.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	MN602743.1
<i>Asplenium foresiense</i>	trnG-trnR	KR233950.1
<i>Asplenium foresiense</i>	trnG-trnR	KR233950.1
<i>Asplenium komarovii</i>	trnG-trnR	MZ064529.1
<i>Asplenium komarovii</i>	trnG-trnR	MZ064529.1
<i>Asplenium fontanum</i>	trnG-trnR	KC792643.1
<i>Asplenium fontanum</i>	trnG-trnR	KC792643.1
<i>Asplenium fontanum</i>	trnG-trnR	KC792641.1
<i>Asplenium fontanum</i>	trnG-trnR	KC792641.1
<i>Asplenium fontanum</i>	trnG-trnR	KP861380.1
<i>Asplenium fontanum</i>	trnG-trnR	KP861380.1
<i>Asplenium fontanum</i>	trnG-trnR	KC792644.1
<i>Asplenium fontanum</i>	trnG-trnR	KC792644.1
<i>Asplenium adiantum-nigrum</i>	trnG-trnR	KP861371.1
<i>Asplenium adiantum-nigrum</i>	trnG-trnR	KP861371.1
<i>Asplenium scolopendrium</i>	trnG-trnR	KP861370.1
<i>Asplenium scolopendrium</i>	trnG-trnR	KP861370.1
<i>Asplenium scolopendrium</i>	trnG-trnR	KP861369.1
<i>Asplenium scolopendrium</i>	trnG-trnR	KP861369.1
<i>Asplenium viride</i>	trnG-trnR	KP861386.1
<i>Asplenium viride</i>	trnG-trnR	KP861386.1
<i>Asplenium celtibericum</i>	trnG-trnR	KP861379.1
<i>Asplenium celtibericum</i>	trnG-trnR	KP861379.1
<i>Asplenium adiantum-nigrum</i>	trnG-trnR	KR233945.1
<i>Asplenium adiantum-nigrum</i>	trnG-trnR	KR233945.1

<i>Asplenium</i>	<i>obovatum</i>	trnG-trnR	KP861383.1
<i>Asplenium</i>	<i>obovatum</i>	trnG-trnR	KP861383.1
<i>Asplenium</i>	<i>septentrionale</i>	trnG-trnR	KP861377.1
<i>Asplenium</i>	<i>septentrionale</i>	trnG-trnR	KP861377.1
<i>Asplenium</i>	<i>billotii</i>	trnG-trnR	KU753797.1
<i>Asplenium</i>	<i>billotii</i>	trnG-trnR	KU753797.1
<i>Asplenium</i>	<i>billotii</i>	trnG-trnR	KC792646.1
<i>Asplenium</i>	<i>billotii</i>	trnG-trnR	KC792646.1
<i>Asplenium</i>	<i>foresiense</i>	trnG-trnR	KC792640.1
<i>Asplenium</i>	<i>foresiense</i>	trnG-trnR	KC792640.1
<i>Asplenium</i>	<i>obovatum</i>	trnG-trnR	KP861381.1
<i>Asplenium</i>	<i>obovatum</i>	trnG-trnR	KP861381.1
<i>Asplenium</i>	<i>septentrionale</i>	trnG-trnR	KP861378.1
<i>Asplenium</i>	<i>septentrionale</i>	trnG-trnR	KP861378.1:
<i>Asplenium</i>	<i>septentrionale</i>	trnG-trnR	KP861376.1
<i>Asplenium</i>	<i>septentrionale</i>	trnG-trnR	KP861376.1
<i>Asplenium</i>	<i>obovatum</i>	trnG-trnR	KC792637.1
<i>Asplenium</i>	<i>obovatum</i>	trnG-trnR	KC792637.1
<i>Asplenium</i>	<i>gulingense</i>	trnG-trnR	JQ724266.1
<i>Asplenium</i>	<i>gulingense</i>	trnG-trnR	JQ724266.1:
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	trnG-trnR	KY979583.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	trnG-trnR	KY979583.1
<i>Asplenium</i>	<i>cuneifolium</i>	trnG-trnR	KR233949.1
<i>Asplenium</i>	<i>cuneifolium</i>	trnG-trnR	KR233949.1
<i>Asplenium</i>	<i>cuneifolium</i>	trnG-trnR	KR233948.1
<i>Asplenium</i>	<i>cuneifolium</i>	trnG-trnR	KR233948.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	trnG-trnR	JQ724237.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	trnG-trnR	JQ724237.1
<i>Asplenium</i>	<i>billotii</i>	trnG-trnR	KU753795.1
<i>Asplenium</i>	<i>billotii</i>	trnG-trnR	KU753795.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	trnG-trnR	KY979582.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	trnG-trnR	KY979582.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	trnG-trnR	KY979581.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	trnG-trnR	KY979581.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	trnG-trnR	KY979580.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	trnG-trnR	KY979580.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	trnG-trnR	KY979576.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	trnG-trnR	KY979576.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	trnG-trnR	KY979575.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	trnG-trnR	KY979575.1
<i>Asplenium</i>	<i>normale</i>	trnG-trnR	KY979574.1

<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979574.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979571.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979571.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979570.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979570.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979569.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979569.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979565.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979565.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724226.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724226.1
<i>Asplenium sp</i>	trnG-trnR	LR588501.1
<i>Asplenium sp</i>	trnG-trnR	LR588501.1
<i>Asplenium billotii</i>	trnG-trnR	LR585233.1
<i>Asplenium billotii</i>	trnG-trnR	LR585233.1
<i>Asplenium billotii</i>	trnG-trnR	LR585232.1
<i>Asplenium billotii</i>	trnG-trnR	LR585232.1
<i>Asplenium billotii</i>	trnG-trnR	LR585231.1
<i>Asplenium billotii</i>	trnG-trnR	LR585231.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979577.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979577.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979573.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979573.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979572.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979572.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979566.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979566.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724230.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724230.1
<i>Asplenium sp</i>	trnG-trnR	LR588500.1
<i>Asplenium sp</i>	trnG-trnR	LR588500.1
<i>Asplenium sp</i>	trnG-trnR	LR588499.1
<i>Asplenium sp</i>	trnG-trnR	LR588499.1
<i>Asplenium ceterach</i>	trnG-trnR	KU753800.1
<i>Asplenium ceterach</i>	trnG-trnR	KU753800.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724258.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724258.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724261.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724261.1
<i>Asplenium pifongiae</i>	trnG-trnR	KT868828.1
<i>Asplenium pifongiae</i>	trnG-trnR	KT868828.1

<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979584.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979584.1:
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724264.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724264.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724236.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724236.1
<i>Asplenium obovatum</i>	trnG-trnR	KU753799.1
<i>Asplenium obovatum</i>	trnG-trnR	KU753799.1
<i>Asplenium obovatum</i>	trnG-trnR	KC792639.1
<i>Asplenium obovatum</i>	trnG-trnR	KC792639.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724262.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724262.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979578.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979578.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979567.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979567.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724241.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724241.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724235.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724235.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724265.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724265.1
<i>Asplenium trichomanes</i>	trnG-trnR	KP861391.1
<i>Asplenium trichomanes</i>	trnG-trnR	KP861391.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979579.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979579.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979564.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979564.1
<i>Asplenium oligophlebium</i>	trnG-trnR	JQ724267.1
<i>Asplenium oligophlebium</i>	trnG-trnR	JQ724267.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724233.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724233.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979563.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979563.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724227.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	JQ724227.1
<i>Asplenium trichomanes</i>	trnG-trnR	KP861389.1
<i>Asplenium trichomanes</i>	trnG-trnR	KP861389.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979568.1
<i>Asplenium normale</i>	trnG-trnR	KY979568.1
<i>Asplenium pekinense</i>	trnG-trnR	KY427331.1

<i>Asplenium</i>	<i>pekinense</i>	trnG-trnR	KY427331.1
<i>Asplenium</i>	<i>adiantum-nigrum</i>	trnG-trnR	KU753798.1
<i>Asplenium</i>	<i>adiantum-nigrum</i>	trnG-trnR	KU753798.1
<i>Asplenium</i>	<i>trichomanes</i>	trnG-trnR	KP861388.1
<i>Asplenium</i>	<i>trichomanes</i>	trnG-trnR	KP861388.1
<i>Asplenium</i>	<i>adiantum-nigrum</i>	trnG-trnR	KP861372.1
<i>Asplenium</i>	<i>adiantum-nigrum</i>	trnG-trnR	KP861372.1:
<i>Asplenium</i>	<i>petrarchae</i>	trnG-trnR	KP861362.1
<i>Asplenium</i>	<i>petrarchae</i>	trnG-trnR	KP861362.1
<i>Asplenium</i>	<i>onopteris</i>	trnG-trnR	KU753796.1
<i>Asplenium</i>	<i>onopteris</i>	trnG-trnR	KU753796.1
<i>Asplenium</i>	<i>adiantum-nigrum</i>	trnG-trnR	KR233947.1
<i>Asplenium</i>	<i>adiantum-nigrum</i>	trnG-trnR	KR233947.1
<i>Asplenium</i>	<i>petrarchae</i>	trnG-trnR	KP861367.1
<i>Asplenium</i>	<i>petrarchae</i>	trnG-trnR	KP861367.1
<i>Asplenium</i>	<i>trichomanes</i>	trnG-trnR	LR585230.1
<i>Asplenium</i>	<i>trichomanes</i>	trnG-trnR	LR585230.1
<i>Asplenium</i>	<i>trichomanes</i>	trnG-trnR	LR585229.1
<i>Asplenium</i>	<i>trichomanes</i>	trnG-trnR	LR585229.1
<i>Asplenium</i>	<i>subglandulosum</i>	trnG-trnR	KU753793.1
<i>Asplenium</i>	<i>subglandulosum</i>	trnG-trnR	KU753793.1
<i>Asplenium</i>	<i>trichomanes</i>	trnG-trnR	LR585228.1
<i>Asplenium</i>	<i>trichomanes</i>	trnG-trnR	LR585228.1
<i>Asplenium</i>	<i>onopteris</i>	trnG-trnR	KC792636.1
<i>Asplenium</i>	<i>onopteris</i>	trnG-trnR	KC792636.1
<i>Asplenium</i>	<i>petrarchae</i>	trnG-trnR	KP861368.1
<i>Asplenium</i>	<i>petrarchae</i>	trnG-trnR	KP861368.1
<i>Asplenium</i>	<i>onopteris</i>	trnG-trnR	KR233952.1
<i>Asplenium</i>	<i>onopteris</i>	trnG-trnR	KR233952.1
<i>Asplenium</i>	<i>balearicum</i>	trnG-trnR	KU753801.1
<i>Asplenium</i>	<i>balearicum</i>	trnG-trnR	KU753801.1
<i>Asplenium</i>	<i>ruta-muraria</i>	trnG-trnR	KP861361.1
<i>Asplenium</i>	<i>ruta-muraria</i>	trnG-trnR	KP861361.1
<i>Asplenium</i>	<i>pifongiae</i>	trnG-trnR	KT868829.1
<i>Asplenium</i>	<i>pifongiae</i>	trnG-trnR	KT868829.1
<i>Asplenium</i>	<i>prolongatum</i>	trnG-trnR	KY427332.1
<i>Asplenium</i>	<i>prolongatum</i>	trnG-trnR	KY427332.1
<i>Asplenium</i>	<i>prolongatum</i>	trnG-trnR	KY427332.1
<i>Asplenium</i>	<i>prolongatum</i>	trnG-trnR	KY427332.1
<i>Asplenium</i>	<i>nidus</i>	trnG-trnR	MK002975.1
<i>Asplenium</i>	<i>nidus</i>	trnG-trnR	MK002975.1

<i>Asplenium</i>	<i>nidus</i>	trnG-trnR	MK002975.1
<i>Asplenium</i>	<i>nidus</i>	trnG-trnR	MK002975.1
