

## Sistematik Famili Athyriaceae di Semenanjung Malaysia Berdasarkan Gabungan Data Anatomi dan Molekul

(Systematics of Athyriaceae Family in Peninsular Malaysia Based on Combination Anatomical and Molecular Data)

NUR ALIAH\*, HAJA MAIDEEN, NURUL NADHIRAH & NIK NORHAZRINA

*Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia*

*Diserahkan: 5 Mei 2024/Diterima: 10 Julai 2024*

### ABSTRAK

Famili paku pakis Athyriaceae mempunyai taburan kosmopolitan dengan anggaran 650 takson. Pengelasan terkini berdasarkan data daripada jujukan molekul telah mengelaskan spesies Athyriaceae kepada tiga genus utama iaitu *Athyrium*, *Deparia* serta *Diplazium*. Walau bagaimanapun, pengelasan ini masih tidak stabil dan sering berubah kerana belum terdapat data jujukan molekul yang lengkap serta menyeluruh bagi keseluruhan spesies dalam famili ini. Penyelidikan ini telah dijalankan untuk mengkaji hubungan filogeni antara spesies dalam famili Athyriaceae di Semenanjung Malaysia berdasarkan gabungan data ciri anatomi dan molekul. Bagi pendekatan anatomi, ciri bentuk stil dan jenis peruratan telah dicerap manakala bagi pendekatan molekul pula menggunakan data jujukan dari kawasan genom kloroplas (*rbcL*, *atpB*, *atpA* dan *trnL-F*) dan nukleus *ITS* (*nITS*). Keseluruhannya, topologi yang terhasil membuktikan bahawa famili Athyriaceae ialah monofiletik dengan sokongan nilai bustrap yang tinggi iaitu 100% serta membentuk dua klad utama iaitu klad I yang terdiri daripada kesemua spesies *Diplazium* manakala klad II terdiri daripada kumpulan *Athyrium-Cornopteris* yang membentuk kumpulan bersama dengan *Deparia*.

Kata kunci: Anatomi; Athyriaceae; *Diplazium*; paku pakis; sistematik

### ABSTRACT

The ferns family Athyriaceae has a cosmopolitan distribution with ca. 650 taxa. Current classification based on molecular data characterized members of Athyriaceae into three main genera which are *Athyrium*, *Deparia*, and *Diplazium*. However, the classification of this family is still unstable due to incomplete molecular data of the species in the family. This study was conducted to study the phylogeny relationships of Athyriaceae species in Peninsular Malaysia based on combination of anatomical and molecular data. In anatomical approach, characters such as stele shape and type of venations have been observed meanwhile for molecular study, sequences data were based on chloroplast regions (*rbcL*, *atpB*, *atpA*, *trnL-F*) and nuclear *ITS* (*nITS*). Overall, the topology produced based on DNA sequences proved Athyriaceae is a monophyletic family and supported well with high bootstrap value 100%. In general, the trees produced formed two main clades in which clade I: consists of all *Diplazium* species meanwhile clade II comprises of *Athyrium-Cornopteris* and formed sister group with *Deparia*.

Keywords: Anatomy; Athyriaceae; *Diplazium*; ferns; systematics

### PENGENALAN

Pengelasan adalah penyusunan kumpulan tumbuhan dengan huraian yang tertentu mengikut tahap dan posisi berdasarkan ciri buatan, kesamaan fenetik atau hubungan kait filogeni (Radford 1986). Stuessy (2009) memerihalkan proses pengelasan sebagai satu proses yang melibatkan pandangan daripada pelbagai pihak dalam pelbagai cara. Sistem pengelasan boleh dibahagikan kepada empat iaitu pengelasan secara buatan, filetik, fenetik dan kladistik (Stuessy 2009). Pengelasan paku pakis pada zaman dahulu umumnya hanya berpandukan kepada ciri morfologi paku

pakis. Perbezaan pendapat dalam kalangan ahli taksonomi dalam menginterpretasi ciri morfologi paku pakis telah menyebabkan ketidakstabilan sistem pengelasan tumbuhan ini sejak kurun ke-17. Kemajuan teknologi selepas kurun ke-20 memberi impak yang besar dalam bidang molekul dan seterusnya membolehkan sistem pengelasan paku pakis menjadi lebih stabil dengan gabungan data morfologi, anatomi dan juga molekul.

Perubahan dalam sistem pengelasan paku pakis dengan adanya sokongan data molekul turut memberi kesan ke atas famili Athyriaceae yang dahulunya dikelompokkan

ke dalam sebuah famili yang besar iaitu Polypodiaceae seperti dalam sistem pengelasan Ching (1938) dan Woodsiaceae dalam pengelasan Smith et al. (2006). Seiring dengan peredaran zaman dan kemajuan teknologi semasa, pengelasan terkini mengikut 'Pteridophyte Phylogeny Group' I oleh PPG I (2016) berdasarkan data molekul telah mengeluarkan paku pakis Athyriaceae daripada kedua-dua famili tersebut dan mengekalkannya sebagai sebuah famili tersendiri yang terdiri daripada tiga genus utama iaitu *Athyrium*, *Diplazium* dan *Deparia*.

Famili ini dianggarkan mempunyai 650 takson daripada jumlah keseluruhan 12,000 takson paku pakis yang telah dilaporkan di seluruh dunia (Kuo et al. 2016; PPG I 2016; Rothfels et al. 2012). *Diplazium* merupakan genus terbesar dengan anggaran 350 takson (Wei, Zhang & Schneider 2013) termasuk spesies *Diplazium esculentum* ataupun lebih dikenali sebagai Paku Tanjung, antara paku pakis yang boleh dimakan dan popular di pasaran tempatan. Malaysia yang tergolong dalam kawasan tropika merupakan salah satu kawasan yang merekodkan kepelbagaian paku pakis yang tinggi. Sejumlah 1,165 takson paku pakis telah direkodkan di Malaysia, iaitu 647 takson direkodkan di Semenanjung Malaysia, 750 takson di Sabah dan 615 takson di Sarawak (Parris & Latiff 1997; Maideen et al. 2018, 2023).

Sehingga kini, pengelasan famili Athyriaceae di Malaysia hanya berdasarkan data daripada gabungan ciri morfologi dan anatomi. Famili Athyriaceae merupakan salah satu famili terbesar yang direkodkan di Malaysia selain daripada Polypodiaceae dengan anggaran 38 takson dan sebahagian besar daripada jumlah tersebut terdiri daripada genus *Diplazium* (Maideen et al. 2019). Pelbagai faktor seperti percanggahan pendapat dalam kalangan penyelidik bagi mengadaptasi ciri yang digunakan dalam pengelasan merupakan antara punca utama yang menyebabkan ketidakstabilan sistem pengelasan Athyriaceae sejak kurun ke-17. Permasalahan pengelasan khususnya dari segi intragenerik Athyriaceae di Malaysia sehingga kini masih belum pernah dikaji. Genus seperti *Cornopteris* yang tergolong dalam setiap genus utama iaitu *Athyrium*, *Deparia* dan *Diplazium* memerlukan tambahan data jujukan molekul yang lebih terperinci dan menyeluruh bagi menyelesaikan masalah pengelasan intragenerik dalam tiga genus utama famili ini (Wei, Zhang & Schneider 2013).

Penyelidikan ini adalah kajian perintis yang menggabungkan data anatomi dan molekul dalam pengelasan Athyriaceae di rantau Malesia. Oleh hal yang demikian, hasil kajian ini membantu dalam menstabilkan pengelasan Athyriaceae khususnya bagi spesies yang terdapat di Semenanjung Malaysia di samping mencerap ciri anatomi yang signifikan dalam famili ini.

#### BAHAN DAN KAEDAH

Kesemua 31 takson yang telah berjaya dikaji di Semenanjung Malaysia telah disenaraikan berserta

maklumat pengumpul dan lokaliti pensampelan seperti dalam Jadual 1. Bagi kajian molekul, hanya 18 sampel *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) telah berjaya diekstrak. Bagi spesimen yang tidak berjaya dikutip dan diekstrak, data telah dicerap berdasarkan sampel yang telah disediakan oleh Herbarium Taman Botani Singapura (SING) dan Herbarium Paku Pakis Universiti Kebangsaan Malaysia (UKMB). Kesemua spesimen bagi kajian ini disimpan di Herbarium UKM (UKMB).

#### KAJIAN ANATOMI

Kajian anatomi telah dijalankan ke atas 31 takson Athyriaceae di Semenanjung Malaysia seperti dalam Jadual 1. Sampel daripada kajian ini telah dikutip semasa kerja lapangan di Semenanjung Malaysia. Selain itu, sesetengah spesies yang sukar diperolehi di lapangan telah diperolehi daripada Herbarium Paku Pakis Universiti Kebangsaan Malaysia (UKMB) dan Herbarium Taman Botani Singapura (SING). Kaedah hirisan menggunakan mikrotom gelongsor di Makmal Mikroteknik UKM dilakukan bagi melihat bentuk stil pada stip bagi setiap spesimen. Bagi spesimen yang tidak berjaya dikutip, hanya ciri peruratan daun sahaja yang dicerap. Kaedah dan teknik yang digunakan dalam penyediaan sampel bagi cerapan anatomi bentuk stil dan peruratan adalah mengikut Johansen (1940) dan Sass (1958) dengan sedikit pengubahsuaian mengikut Arshad et al. (2021).

#### KAEDAH KAJIAN MOLEKUL

Pengestrakan DNA genom dilakukan dengan menggunakan teknik *Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) mengikut Doyle dan Doyle (1990) dengan sedikit pengubahsuaian mengikut Wei et al. (2013). Penunjuk yang digunakan untuk menentukan kualiti DNA ialah  $\lambda$ HindIII. Kualiti dan kepekatan DNA ditentukan dengan melakukan perbandingan terhadap kecerahan penunjuk berat molekul. Dalam kajian ini lima kawasan jujukan telah diamplifikasi untuk melihat perbandingan antara takson yang dikaji. Empat daripadanya merupakan kawasan jujukan yang terdapat di dalam kloroplas iaitu *rbcL*, *atpB*, *atpA* dan *trnL-F* serta satu kawasan adalah daripada genom nukleus iaitu *ITS*. Jadual 2 menunjukkan senarai pencetus yang digunakan dalam kajian ini.

Jumlah isi padu reaksi Amplifikasi Tindak Balas Berantai Polimerase (PCR) adalah sebanyak 25  $\mu$ l. Setiap reaksi ini terdiri daripada Taq DNA Polimerase, 10x Penimbal PCR, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, DMSO, 2.0 mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP dan dCTP), 0.2 mM pencetus kehadapan dan kebelakang serta templat DNA seperti dalam Jadual 3. Setiap proses PCR dilakukan dalam 35 kitaran. Campuran yang disebutkan seterusnya dimasukkan ke dalam tiub 0.2 mL dan diempar selama 3 saat sehingga menjadi sebatil sebelum diletakkan ke dalam mesin PCR (Multigene Gradient, Labnet International Inc.) untuk proses amplifikasi.

JADUAL 1. Senarai spesies yang dikaji berserta maklumat pengumpul, lokaliti dan sumber (tanda \* merujuk kepada spesimen yang telah berjaya diekstrak)

Spesies	Pengumpul dan nombor koleksi	Lokaliti/Sumber
* <i>Athyrium anisopterum</i>	Nur Aliah & Nurul Nadhirah (NA2019-80, NA2019-81)	Pahang, Cameron Highlands, Gn. Berincang, Air Terjun Uda dan Dara
<i>Athyrium appendiculiferum</i>	R.E. Holttum (SFN 31279) (SING)	Pahang, Cameron Highlands, Kem Berincang (SING)
* <i>Cornopteris opaca</i>	Nur Aliah & Nurul Nadhirah (NA2019-79)	Pahang, Cameron Highlands, Gn. Berincang, Air Terjun Uda dan Dara
<i>Deparia boryana</i>	B.E.G. Molesworth-Allen (No. 2314) (SING)	Bukit Fraser (SING)
* <i>Deparia japonica</i>	Nur Aliah & Nurul Nadhirah (NA 2019-77)	Pahang, Cameron Highlands, Gn. Berincang, Air Terjun Uda dan Dara
<i>Diplazium angustipinna</i>	Nur Aliah, Alia Atierah & Nurul Nadhirah (AA2019-25)	Perak, Gunung Korbu, Trail dari Denai Kem Seroja ke Kem Kijang
* <i>Diplazium bantamense</i>	Nur Aliah, Haja Maideen & Nurul Nadhirah (NA2018-55)	Pahang, Fraser's Hill, Denai Bishop
* <i>Diplazium cordifolium</i> var. <i>cordifolium</i>	Nur Aliah & Nurul Nadhirah (NA2019-66, NA2019-67)	Pahang, Fraser's Hill, Denai Kindersley
* <i>Diplazium cordifolium</i> var. <i>pariens</i>	Nur Aliah, Haja Maideen & Nurul Nadhirah (NA2018-50)	Pahang, Fraser's Hill, Denai Bishop
* <i>Diplazium crenatoserratum</i>	Nur Aliah & Haja Maideen (NA2017-18)	Selangor, Bangi, Hutan Simpan UKM
<i>Diplazium dilatatum</i>	Nur Aliah, Alia Atierah & Nurul Nadhirah (AA2019-59)	Perak, Gunung Korbu, Denai Kem Seroja ke Kem Kijang
* <i>Diplazium esculentum</i>	Nur Aliah, Haja Maideen & Nurul Nadhirah (NA2018-47)	Pahang, Fraser's Hill, Denai Jeriau
<i>Diplazium insigne</i>	R.E. Holttum (SFN 21635) (SING)	Pahang, Fraser's Hill, Lembah Tras (SING)
<i>Diplazium kunstleri</i>	Nur Aliah, Alia Atierah & Nurul Nadhirah (AA2019-30, AA2019-56)	Perak, Gunung Korbu, Denai Kem Seroja ke Kem Kijang
* <i>Diplazium latisquamatum</i>	Nur Aliah, Haja Maideen & Nurul Nadhirah (NA2018-51)	Pahang, Cameron Highlands, Air Terjun Parit
* <i>Diplazium malaccense</i>	Nur Aliah & Haja Maideen (NA2017-15)	Selangor, Bangi, Hutan Simpan UKM

bersambung...

sambungan...

---

<i>*Diplazium pallidum</i> var. <i>montanum</i>	Nur Aliah & Nurul Nadhirah (NA2018-59)	Pahang, Fraser's Hill, Denai Maxwell
<i>Diplazium pallidum</i> var. <i>pallidum</i>	Nur Aliah, Haja Maideen & Nurul Nadhirah (NA2018-56)	Pahang, Fraser's Hill, Denai Bishop
<i>*Diplazium polypodioides</i>	Nur Aliah & Nurul Nadhirah (NA2019-63)	Pahang, Lata Iskandar
<i>Diplazium prescottianum</i>	Nur Aliah, Alia Atierah & Nurul Nadhirah (AA2019-53)	Perak, Gunung Korbu, Denai Kem Seroja ke Kem Kijang
<i>*Diplazium procumbens</i>	Nur Aliah, Haja Maideen & Nurul Nadhirah (NA2018-49, NA2018-52, NA2018-53)	Pahang, Fraser's Hill, Denai Bishop
<i>*Diplazium proliferum</i>	Nur Aliah, Haja Maideen & Nurul Nadhirah (NA2018-54)	Pahang, Fraser's Hill, Denai Bishop
<i>Diplazium riparium</i>	Abdullah Muhd & Jumaat Adam (AM54)	Sabah, Kpg. Nupakan, Tambunan (UKM)
<i>*Diplazium simplicivenium</i>	Nur Aliah, Alia Atierah & Nurul Nadhirah (AA2019-42)	Perak, Gunung Korbu, Denai Kem Seroja ke Kem Kijang
<i>Diplazium speciosum</i> var. <i>major</i>	R.E. Holttum (SFN 254444) (SING)	Sabah, Gn. Kinabalu, Lumu- Lumu (UKM)
<i>*Diplazium sorzogonense</i>	Nur Aliah, Alia Atierah & Nurul Nadhirah (AA2019-133)	Perak, Gunung Korbu, Denai Puncak Korbu ke Kem Kijang
<i>Diplazium subintegrum</i>	Nur Aliah & Haja Maideen (NA2017-23)	Pahang, Fraser's Hill, Plot Penyelidikan UKM
<i>Diplazium subserratum</i>	Nur Aliah, Alia Atierah & Nurul Nadhirah (AA2019-194)	Perak, Gunung Korbu, Denai Kem Seroja ke Kem Kijang
<i>*Diplazium tomentosum</i>	Nur Aliah & Haja Maideen (NA2017-16, NA2017-17)	Selangor, Bangi, Hutan Simpan UKM
<i>*Diplazium velutinum</i>	Nur Aliah & Nurul Nadhirah (NA2019-78)	Pahang, Cameron Highlands, Gn. Berincang, Air Terjun Uda dan Dara
<i>Diplazium xiphophyllum</i>	Nur Aliah, Alia Atierah & Nurul Nadhirah AA2019-36	Perak, Gunung Korbu, Denai Kem Seroja ke Kem Kijang

---

JADUAL 2. Senarai pencetus yang digunakan dalam kajian molekul

No.	Urutan bes pencetus	Kod pencetus	Rujukan
1	5' ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC 3'Kehadapan	rbcL1F	Hasebe et al. (1994)
2	5'GCAGCAGCTAGTTCCCCGGGCTCCA 3'Kebelakang	rbcL1351R	Hasebe et al. (1994)
3	5'AATGTTACTTGTGAAGTWCAACAAT 3'Kehadapan	ESATPB172F	Schuettpelz & Pryer (2007)
4	5' ATTCCAACWATTCGATTWGGAG 3'Kebelakang	ESATPE45R	Schuettpelz & Pryer (2007)
5	5' GARCARGTTCGACAGCAAGT 3' Kehadapan	ESATPF412F	Schuettpelz & Pryer (2007)
6	5' GTATAGTTTCRARTCCTATT 3' Kebelakang	ESTRNR46F	Schuettpelz et al. (2006)
7	5'CGGAATTGTAGACGTACG 3' Kehadapan	c	Taberlet et al. (1991)
8	5' ATTTGAACTGGTGACACGAG 3' Kebelakang	f	Taberlet et al. (1991)
9	5' ATGCGATACTTGGTGTGAAT 3' Kehadapan	ITS2-S2F	Wei et al. (2013)
10	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' Kebelakang	ITS4	Wei et al. (2013)

Bagi penentuan hasil PCR, penunjuk berat 1 KB (SMOBIO) digunakan untuk melihat saiz produk PCR. Imej gel kemudian dirakam di bawah cahaya ultraungu menggunakan mesin AlphaImager di Makmal Genetik, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia. Penulenan hasil PCR dilakukan menggunakan Kit Penulenan Vivantis GF-1 (Vivantis Technologies Sdn. Bhd.). Hasil PCR yang telah dituliskan dihantar ke syarikat Apical Scientific untuk analisis penjujukan menggunakan kaedah 'Sanger sequencing' menggunakan mesin Genetic Analyzer ABI PRISM 3730XL.

Hasil jujukan yang telah diperolehi dalam bentuk kromatogram dianalisis dengan menggunakan perisian BioEdit. Jujukan yang diperolehi, kemudian disemak dengan data jujukan menggunakan program BLAST di GenBank (Altschul et al. 1997). Jujukan tersebut kemudiannya dijajarkan dengan perisian CLUSTAL W (Thompson et al. 1994). Hasil penjajaran CLUSTAL W seterusnya digunakan dalam analisis pembinaan pohon filogeni dengan bantuan perisian Phylogenetics Analysis Using Parsimony (PAUP) versi 4.0b10 (Swofford 2002). Pohon filogeni dibina berdasarkan kaedah Maximum Parsimony (MP). Pohon filogeni yang dibina diuji dengan analisis Butstrap (Felsenstein 1985; Lanfear et al. 2017) untuk menguji tahap kekuatan cabang pohon filogeni

dengan setiap penilaian butstrap dijalankan dengan replikasi 1000.

#### HASIL

##### PEMERHATIAN CIRI ANATOMI

Ciri bentuk stil dan jenis peruratan telah disenaraikan seperti dalam Jadual 4 berserta kod ciri manakala data matriks ciri anatomi disenaraikan dalam Jadual 5.

Ciri anatomi yang telah dicerap ke atas 28 spesies yang dikaji (tidak termasuk empat spesimen herbarium iaitu *D. insigne*, *D. speciosum* var. *major*, *A. appendiculiferum* dan *Dep. boryana*) adalah seperti berikut:

##### *Bentuk stil (ciri 1)*

Berdasarkan keratan rentas stip yang telah dijalankan ke atas 29 spesies yang dikaji, tiga bentuk stil telah berjaya dicerap iaitu stil berbentuk 'V' (Rajah 1), berbentuk 'U' (Rajah 2) dan membentuk dua plat yang selari (Rajah 3). Spesies yang mempunyai stil berbentuk 'V' terdapat pada *A. anisopterum*, *C. opaca*, *Dep. japonica*, *D. angustipinna*,



JADUAL 3. Kitaran PCR bagi setiap kawasan jujukan

Kawasan jujukan	Pasangan pencetus	Kitaran PCR
<i>rbcL</i>	1F/1351R	94 °C (4 min), [94 °C (30 saat), 52 °C (1 min), 72 °C (2 min)] X35, 72 °C (5 min)
<i>atpB</i> dan <i>atpA</i>	ESATPB172F/ESATPE45R ESATPF412F/ESTRNR46F	94 °C (3 min), [94 °C (45 saat), 52 °C (30 saat), 72 °C (1 min 30 saat)] X35, 72 °C (5 min)
<i>trnL-F</i>	c/f	94 °C (5 min), [94 °C (30 saat), 56.1 °C (30 saat), 72 °C (1 min 30 saat)] X35, 72 °C (10 min)
<i>ITS</i>	ITS-S2F/ITS4	94 °C (5 min), [94 °C (30 saat), 56.0 °C (30 saat), 72 °C (45 saat)] X35, 72 °C (10 min)

JADUAL 4. Ciri anatomi dan kod ciri bagi kesemua takson Athyriaceae yang dikaji

Struktur	Nombor ciri	Kod ciri		
		0	1	2
Stip	1. Keratan rentas stip (Bentuk stil)	Membentuk dua plat yang selari	Berbentuk 'V'	Berbentuk 'U'
Lamina	2. Jenis peruratan	Bebas	Anastomos	

*D. cordifolium* var. *cordifolium*, *D. cordifolium* var. *pariens*, *D. crenatoserratum*, *D. latisquamatum*, *D. malaccense*, *D. procumbens*, *D. simplicivenium*, *D. sorzogonense*, *D. subintegrum*, *D. tomentosum*, *D. velutinum* dan *D. xiphophyllum*. Stil berbentuk 'U' pula terdapat pada *D. bantamense*, *D. dilatatum*, *D. esculentum*, *D. kunstleri*, *D. pallidum* var. *pallidum*, *D. pallidum* var. *montanum*, *D. polypodioides*, *D. prescottianum* dan *D. proliferum* manakala hanya dua spesies mempunyai stil membentuk dua plat yang selari iaitu *D. riparium* dan *D. subserratum*.

#### Peruratan (ciri 2)

Dua jenis peruratan telah berjaya dicerap bagi kesemua spesies yang telah dikaji iaitu peruratan jenis bebas dan anastomos (Rajah 4). Majoriti spesies yang dikaji mempunyai peruratan jenis bebas seperti dalam spesies *A. anisopterum*, *C. opaca*, *Dep. japonica*, *D. bantamense*, *D. crenatoserratum*, *D. dilatatum*, *D. kunstleri*, *D. latisquamatum*, *D. malaccense*, *D. pallidum* var. *pallidum*, *D. pallidum* var. *montanum*, *D. polypodioides*, *D. prescottianum*, *D. procumbens*, *D. riparium*, *D. simplicivenium*, *D. sorzogonense*, *D. subintegrum*, *D. subserratum*, *D. tomentosum*, *D. velutinum*, *D. xiphophyllum*, *A. appendiculiferum*, *D. speciosum* var. *major* dan *Dep. boryana*. Hanya lima spesies mempunyai

peruratan jenis anastomos iaitu *D. angustipinna*, *D. cordifolium* var. *cordifolium*, *D. cordifolium* var. *pariens*, *D. esculentum* dan *D. proliferum*.

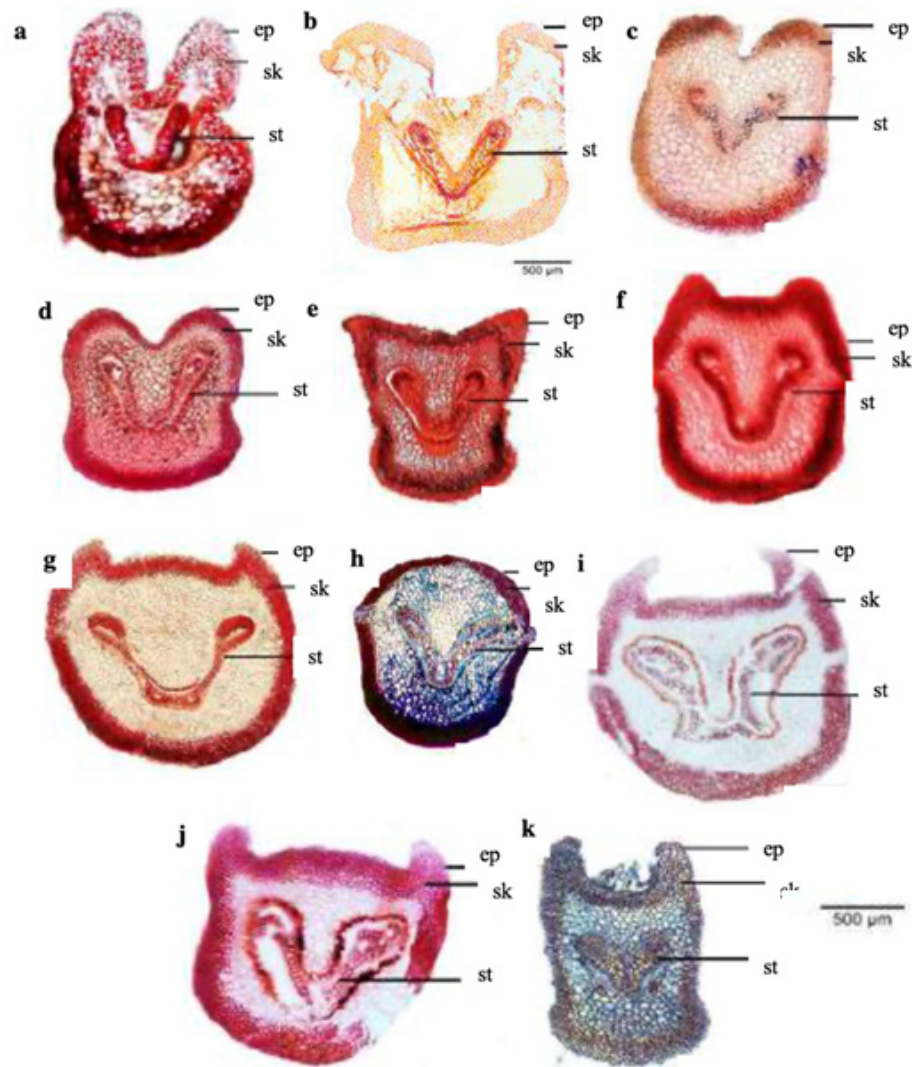
#### ANALISIS UJIAN KETAKSAMAAN KEPANJANGAN (ILD)

Analisis ujian ketaksamaan kepanjangan (ILD) telah dilakukan untuk menganggarkan kadar evolusi setiap jujukan DNA. Sebanyak lima kawasan jujukan telah dianalisis secara berpasangan (Jadual 6) menggunakan ujian ILD untuk melihat kadar evolusi bagi setiap gabungan data yang diperolehi. Gabungan data *atpA-rbcL* menunjukkan bilangan nukleotida tertinggi iaitu sebanyak 3322 bes manakala gabungan data bagi kawasan jujukan *trnLF-ITS* nukleus menunjukkan bilangan nukleotida terkecil iaitu 1223 bes.

Bagi data bermaklumat secara parsimoni, *atpA-trnLF* mempunyai bilangan nukleotida tertinggi dengan 702 bes manakala *atpB-ITS* nukleus mempunyai bilangan nukleotida terendah bagi data bermaklumat secara parsimoni iaitu dengan 107 bes. Bagi data bermaklumat secara tidak parsimoni, *atpA-trnLF* mempunyai bilangan nukleotida yang paling tinggi dengan 655 bes manakala *atpB-ITS* nukleus mempunyai bilangan nukleotida terendah dengan 162 bes.

JADUAL 5. Data matriks ciri anatomi

Spesies	0	0
	1	2
<i>Athyrium anisopterum</i>	1	0
<i>Athyrium appendiculiferum</i>	?	0
<i>Cornopteris opaca</i>	1	0
<i>Deparia japonica</i>	1	0
<i>Deparia boryana</i>	?	0
<i>Diplazium angustipinna</i>	1	1
<i>Diplazium bantamense</i>	2	0
<i>Diplazium cordifolium</i> var. <i>cordifolium</i>	1	1
<i>Diplazium cordifolium</i> var. <i>pariens</i>	1	1
<i>Diplazium crenatoserratum</i>	1	0
<i>Diplazium dilatatum</i>	2	0
<i>Diplazium esculentum</i>	2	1
<i>Diplazium insigne</i>	?	1
<i>Diplazium kunstleri</i>	2	0
<i>Diplazium latisquamatum</i>	1	0
<i>Diplazium malaccense</i>	1	0
<i>Diplazium pallidum</i> var. <i>pallidum</i>	1	0
<i>Diplazium pallidum</i> var. <i>montanum</i>	2	0
<i>Diplazium polypodioides</i>	2	0
<i>Diplazium prescottianum</i>	2	0
<i>Diplazium procumbens</i>	1	0
<i>Diplazium proliferum</i>	2	1
<i>Diplazium riparium</i>	0	0
<i>Diplazium simplicivenium</i>	1	0
<i>Diplazium sorzogonense</i>	1	0
<i>Diplazium speciosum</i> var. <i>major</i>	?	0
<i>Diplazium subintegrum</i>	1	0
<i>Diplazium subserratum</i>	0	0
<i>Diplazium tomentosum</i>	1	0
<i>Diplazium velutinum</i>	1	0
<i>Diplazium xiphophyllum</i>	1	0
<i>Asplenium caudatum</i> (Takson Luar)	?	0



ep: epidermis, sk: skl erenkima, st: stil

RAJAH 1. Stil berbentuk 'V'. a: *A. anisopterum*, b: *C. opaca*, c: *Dep. japonica*, d: *D. angustipinna*, e: *D. cordifolium* var. *cordifolium*, f: *D. cordifolium* var. *pariensis*, g: *D. latisquamatum*, h: *D. procumbens*, i: *D. simplicivenium*, j: *D. subintegrum*, k: *D. tomentosum*

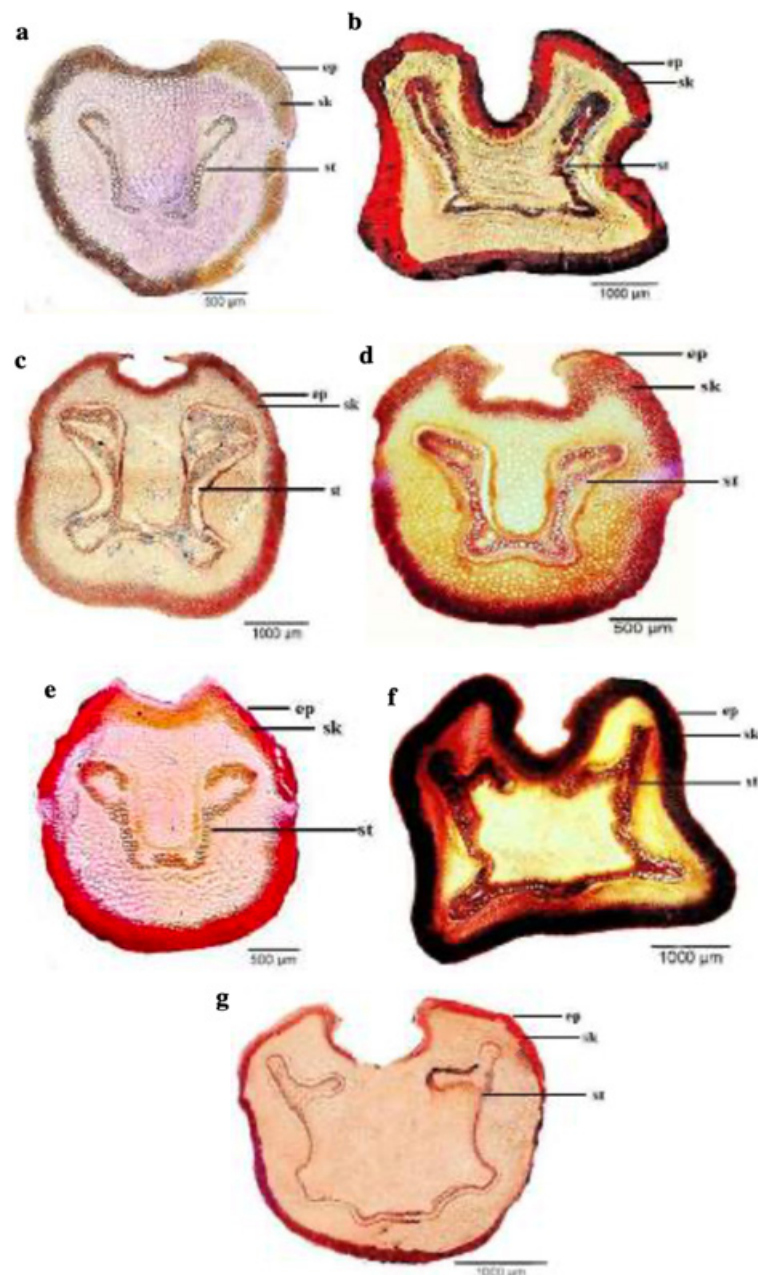
#### ANALISIS DATA MAXIMUM PARSIMONY

Data jujukan daripada kawasan jujukan genom kloroplas dan nukleus telah dianalisis dengan menggunakan perisian PAUP 4.0 beta 10 Win (Swofford 2002). Jadual 7 menunjukkan perbandingan analisis Maximum Parsimony antara kawasan DNA.

#### ANALISIS POHON FILOGENETIK BERDASARKAN GABUNGAN DATA ANATOMI DAN MOLEKUL

Analisis MP telah dijalankan berdasarkan gabungan data molekul dan ciri anatomi (Rajah 5). Pohon yang terhasil bagi keseluruhan 31 takson Athyriaceae yang dikaji secara umumnya membentuk dua klad utama, iaitu klad I dan klad II. Klad I terdiri daripada kesemua spesies *Diplazium*, klad II pula terdiri daripada genus lain dalam Athyriaceae



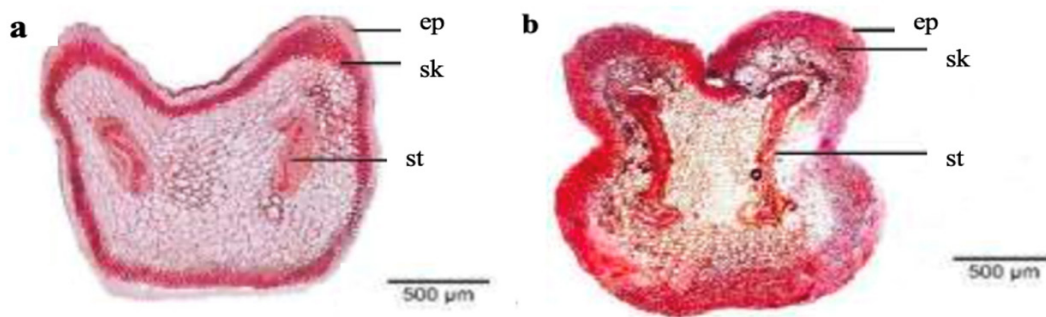


RAJAH 2. Stil membentuk 'U'. a: *D. bantamense*, b: *D. dilatatum*, c: *D. esculentum*, d: *D. kunstleri*, e: *D. pallidum* var. *montanum*, f: *D. polypodioides*, g: *D. proliferum*

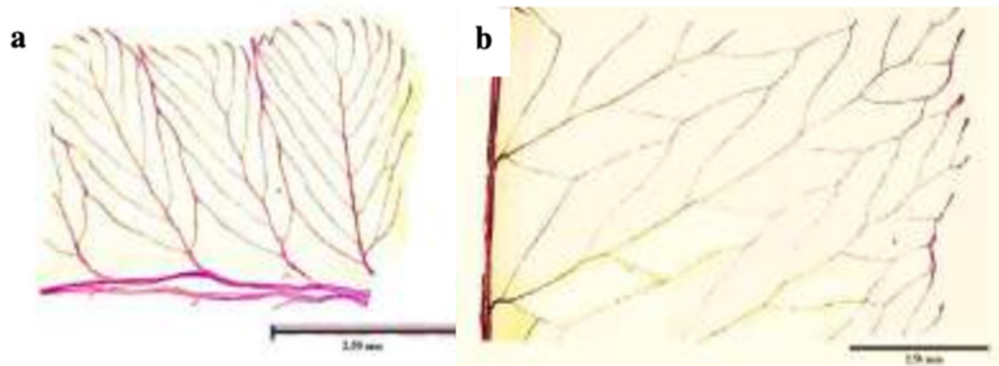
iaitu *Deparia*, *Athyrium* dan *Cornopteris* manakala spesies *Cystopteris pellucida* telah dipilih sebagai takson luar (TL).

Klad I membentuk lima sub-klad iaitu sub-klad IA, IB, IC, ID dan IE. Sub-klad IA terdiri daripada *D. latisquamatum*, *D. dilatatum*, *D. proliferum*, *D. kunstleri*, *D. pallidum* var. *montanum*, *D. polypodioides* dan *D. speciosum* var. *major*. Sub-klad IA menunjukkan *D. dilatatum* mempunyai hubungan yang rapat dengan *D. proliferum* dengan nilai sokongan butstrap sebanyak 96%

serta kedua-dua spesies ini membentuk kumpulan bersama dengan *D. latisquamatum* dengan nilai sokongan butstrap sebanyak 51%. Sub-klad IB pula terdiri daripada *D. pallidum* var. *montanum*, *D. cordifolium* var. *cordifolium*, *D. cordifolium* var. *pariens*, *D. malaccense*, *D. sorzogonense*, *D. subserratum* dan *D. riparium*. Dalam sub-klad IB ini menunjukkan *D. cordifolium* mempunyai hubungan yang rapat dengan *D. cordifolium* var. *pariens* dengan nilai sokongan butstrap



RAJAH 3. Stil membentuk dua plat yang selari. a: *D. riparium*, b: *D. subserratum*



RAJAH 4. Jenis peruratan. a: bebas, b: anastomos

sebanyak 99% serta membentuk kumpulan bersama dengan *D. pallidum* var. *montanum* dengan sokongan nilai butstrap sebanyak 75%.

Selain itu, *D. malaccense* jelas mempunyai hubungan yang rapat dengan *D. sorzogonense* dengan sokongan nilai butstrap sebanyak 89% manakala *D. subserratum* pula mempunyai hubungan yang rapat dengan *D. riparium* dengan nilai sokongan butstrap sebanyak 77%. Seterusnya sub-klad IC pula terdiri daripada *D. xiphophyllum*, *D. angustipinna*, *D. simplicivenium*, *D. procumbens*, *D. bantamense* dan *D. subintegrum* manakala sub-klad ID pula hanya terdiri daripada *D. esculentum*, *D. prescottianum* dan *D. insigne*.

Sub-klad yang terakhir iaitu sub-klad IE jelas menunjukkan *D. crenatoserratum* mempunyai hubungan yang rapat dengan *D. tomentosum* dengan nilai sokongan butstrap sebanyak 99% serta kedua-dua spesies ini membentuk kumpulan bersama dengan *D. velutinum* dengan nilai sokongan butstrap sebanyak 94%. Klad II pula menunjukkan kumpulan yang terdiri daripada *Dep. boryana* dan *Dep. japonica* membentuk kumpulan bersama

dengan *A. anisopterum*, *A. appendiculiferum* dan *C. opaca* dengan nilai sokongan butstrap sebanyak 51%.

#### PERBINCANGAN

Ciri anatomi bentuk stil dan jenis peruratan telah dicerap ke atas spesies Athyriaceae yang dikaji. Berdasarkan kajian ini, bentuk stil bagi Athyriaceae yang telah dicerap terdiri daripada tiga bentuk iaitu bentuk 'U', 'V' serta yang membentuk dua plat selari. Bentuk stil yang telah dicerap jelas menyokong kajian anatomi yang lepas ke atas Athyriaceae seperti dalam genus *Deparia* (Kuo et al. 2016), genus *Athyrium* dan *Diplazium* (Kato 1977; Praptosuwiryo & Darnaedi 2014) serta kajian Athyriaceae oleh UmiKalsom (1992).

Namun, terdapat perbezaan antara bentuk stil bagi *D. crenatoserratum* yang dicerap dalam kajian ini dengan bentuk stil *D. crenatoserratum* dalam kajian oleh Praptosuwiryo dan Darnaedi (2014). Hasil daripada kajian ini mendapati *D. crenatoserratum* mempunyai stil berbentuk 'V' dan bukan membentuk dua plat yang selari

JADUAL 6. Ujian Ketaksamaan Kepanjangkan bagi kawasan jujukan DNA kajian

Analisis/ JujukanDNA	<i>atpB- atpA</i>	<i>atpB- trnLF</i>	<i>atpB- rbcL</i>	<i>atpB- ITS</i> nukleus	<i>atpA- trnLF</i>	<i>atpA- rbcL</i>	<i>atpA- ITS</i> nukleus	<i>trnLF- rbcL</i>	<i>trnLF- ITS</i> nukleus	<i>rbcL- ITS</i> nukleus	Gabungan data
Bilangan nukleotida	3222	2157	2364	1330	3115	3322	2288	1471	1223	1430	5677
Bermaklumat secara parsimoni	353	511	178	107	702	369	298	527	456	123	906
Bermaklumat tidak secara parsimoni	563	230	167	162	655	592	587	259	254	191	915
=Nukleotida tetap	2306	1416	2019	1061	1758	2361	1403	1471	513	1116	3856
ILD	0.01	0.01	0.10	0.04	0.01	0.01	0.50	0.01	0.01	0.2	1.0

JADUAL 7. Perbandingan analisis Maximum Parsimony antara kawasan DNA

Kawasan DNA/ Analisis	<i>rbcL</i>	<i>trnL-F</i>	<i>atpB</i>	<i>atpA</i>	ITS nukleus	Gabungan data
Bilangan nukleotida	1231	1024	1132	2120	655	5677
Kepanjangan pohon	276	1015	206	1039	154	2944
Bilangan pohon terbaik	276	1015	206	1039	154	2944
Bermaklumat secara parsimoni	95	456	81	241	28	906
Bermaklumat secara tidak parsimoni	93	157	69	492	101	915
Nukleotida tetap	1043	411	982	1387	526	3856
Indeks Ketekalaan (CI)	0.7138	0.7744	0.7621	0.8268	0.9481	0.7459
Indeks Homoplasi (HI)	0.2862	0.2256	0.2379	0.1732	0.0519	0.2541
Indeks Retensi (RI)	0.6667	0.7522	0.7487	0.5833	0.8788	0.6011
Indeks Ketekalaan Berskala (RC)	0.4758	0.5825	0.5706	0.4823	0.8331	0.4483

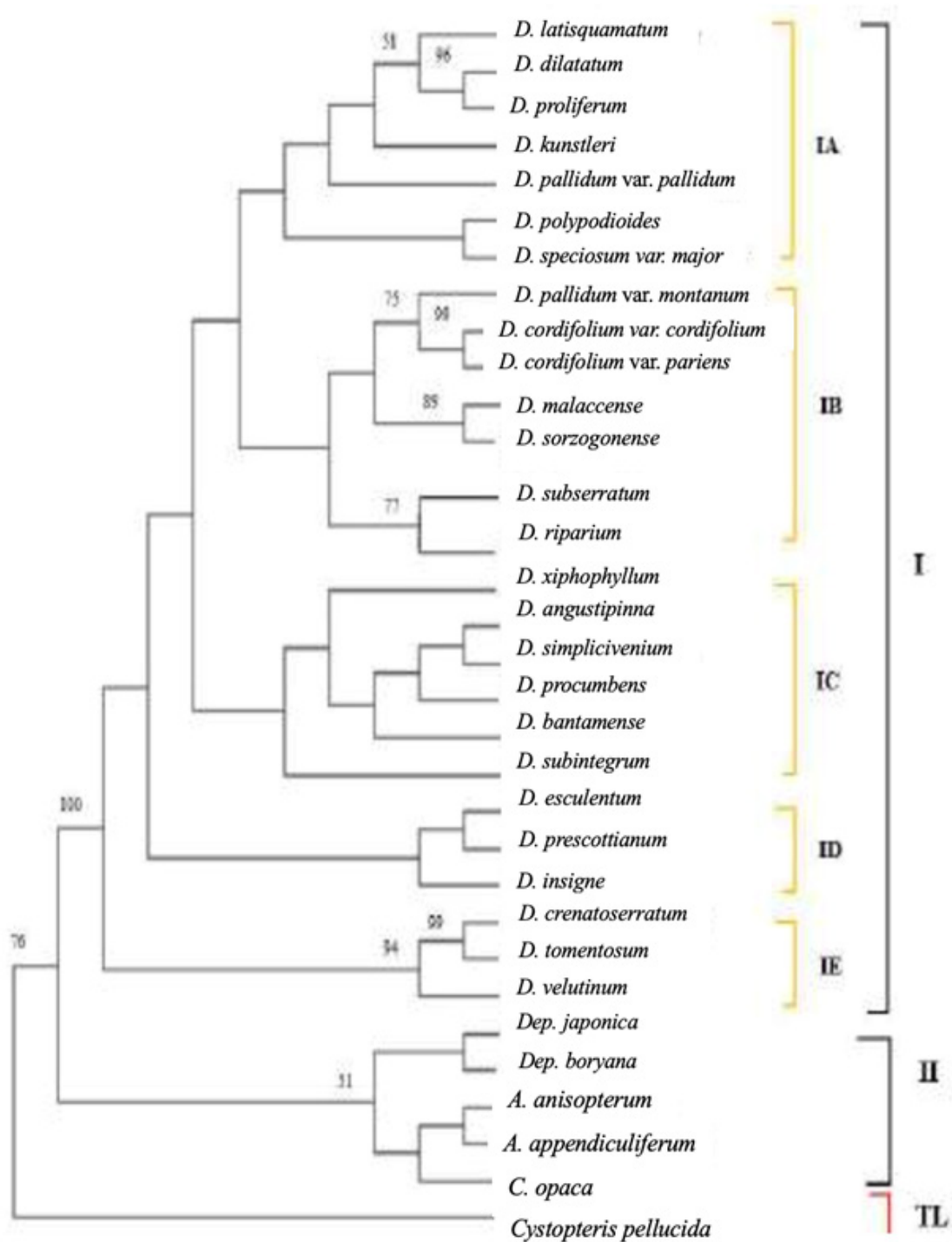
seperti dalam kajian Praptosuwiryo dan Darnaedi (2014). Hanya dua spesies iaitu *D. subserratum* dan *D. riparium* yang mempunyai stil membentuk dua plat yang selari. Ciri bentuk stil sahaja tidak begitu signifikan dalam pembentukan kumpulan yang terhasil dalam pohon filogeni (Rajah 5) kecuali bagi stil yang membentuk dua plat selari iaitu *D. riparium* dan *D. subserratum* yang dikelaskan dalam klad yang sama.

Ciri anatomi jenis peruratan jelas membuktikan bahawa takson Athyriaceae yang dikaji mempunyai peruratan sama ada jenis terbuka ataupun anastomos yang turut menyokong hasil kajian Mynnsen dan Sylvestre (2019). Hanya enam spesies yang dikaji mempunyai peruratan anastomos iaitu *D. angustipinna*, *D. cordifolium* var. *cordifolium*, *D. cordifolium* var. *pariens*, *D. esculentum*, *D. insigne* dan *D. proliferum*. Hubungan bagi *D. sorzogonense* dan *D. malaccense* adalah sangat rapat kerana dalam pohon yang terhasil, kedua-dua spesies tersebut disokong dengan nilai butstrap yang sangat tinggi. Hubungan yang rapat bagi kedua-dua spesies ini jelas terbukti kerana secara morfologinya kedua-dua spesies ini

adalah sangat sama dan sukar untuk dibezakan di lapangan (Holtum 1968). Ciri sepunya bagi kedua-dua spesies ini ialah seperti rizom tegak, sisik berbentuk linear, tepian sisik licin, stel berbentuk 'V', lamina pinat, peruratan bebas serta sorus memanjang dari pangkal peruratan hingga tepian pina.

Bagi *D. cordifolium* var. *pariens* pula jelas mempunyai hubungan adik beradik dengan *D. cordifolium* var. *cordifolium* dan membentuk kumpulan bersama dengan *D. pallidum* var. *montanum* dengan nilai sokongan butstrap yang tinggi iaitu 100%. Bentuk stil bagi *D. pallidum* var. *montanum* yang berbentuk 'U' berbeza dengan *D. cordifolium* var. *cordifolium* dan *D. cordifolium* var. *pariens* yang mempunyai stel berbentuk 'V' manakala peruratan anastomos adalah sama bagi kedua-dua spesies *D. cordifolium* var. *cordifolium* dengan *D. cordifolium* var. *pariens* berbanding peruratan jenis bebas pada *D. pallidum* var. *montanum*.

Pohon filogeni (Rajah 5) yang terhasil berdasarkan ciri anatomi dan data molekul jelas menunjukkan bahawa Athyriaceae adalah monofiletik dengan nilai sokongan



RAJAH 5. Pohon MP berdasarkan gabungan data ciri anatomi dan molekul. Nombor di atas cabang menunjukkan nilai keyakinan butstrap. Hanya nilai >50% sahaja ditunjukkan. Pohon membentuk dua klad utama: Klad I dan II, lima sub-klad: sub-klad IA–IE serta Takson Luar (TL).



bootstrap yang tinggi iaitu lebih daripada 95%. Kesemua spesies *Diplazium* jelas dikelompokkan ke dalam satu klad manakala klad II pula terdiri daripada genus *Athyrium*, *Cornopteris* dan *Deparia* (Rajah 5).

Menurut pengelasan Holttum (1968), ciri umum bagi subfamili Athyrioideae yang terdiri daripada genus *Athyrium* (termasuk *Diplazium*) serta *Cystopteris* antaranya ialah rizom terestrial, sama ada tegak atau separa tegak dengan simetri yang tersusun secara radial dan bersisik serta stip dengan dua jalur vaskular yang bercantum membentuk jalur 'U' atau 'V' tunggal. Manakala ciri bagi frond dalam subfamili Athyrioideae ialah sama ada ringkas atau membahagi, peruratan biasanya ringkas, namun bagi sesetengah spesies mempunyai peruratan bersebelahan yang bercantum membentuk jaringan areola yang berbentuk segi empat selari, rakis dan kosta selalunya atau jarang dihadiri sisik dan rerambut atau bagi sesetengah spesies, rerambut multisel biasanya hadir pada permukaan atas serta kosta dan kosta beralur. Holttum (1947) telah mengelompokkan kesemua spesies genus *Diplazium* ke dalam genus *Athyrium* setelah melihat tiada perbezaan yang ketara untuk memisahkan kedua-dua genus tersebut. Namun, pengelasan oleh Holttum (1947) ini bercanggah dengan pengelasan paku pakis Athyriaceae oleh Adjie et al. (2008), PPG I (2016) dan Rothfels et al. (2012) yang turut menggabungkan data-data morfologi, anatomi dan molekul seperti yang telah disokong berdasarkan hasil yang diperolehi daripada kajian ini.

Kedudukan *C. opaca* yang terletak dalam kumpulan yang sama dengan *A. anisopterum* dengan nilai sokongan bootstrap 100% menyokong pengelasan terkini Athyriaceae oleh PPG I (2016) yang mana *Cornopteris* digolongkan dalam genus *Athyrium*. Ciri stil berbentuk 'V' telah dicerap pada genus *Athyrium* dan *Cornopteris* yang turut menyokong kajian oleh Kato (1977), Maideen, Aliah dan Nadhirah (2021) dan Maideen et al. (2019). Genus *Deparia* yang diwakili oleh *Dep. japonica* pula jelas menunjukkan bahawa genus ini terpisah daripada genus *Athyrium* dan *Cornopteris* tetapi masih membentuk kumpulan yang sama dengan kedua-dua genus tetapi dengan sokongan nilai bootstrap yang rendah. Hasil daripada kajian ini menyokong pengelasan terkini Athyriaceae oleh Kuo et al. (2016) serta PPG I (2016).

#### KESIMPULAN

Famili Athyriaceae jelas terbukti adalah monofiletik berdasarkan pohon filogeni yang terbentuk berdasarkan gabungan data anatomi dan juga data molekul. Genus *Diplazium* yang membentuk satu klad mempunyai hubungan adik beradik dengan klad yang mengelompokkan *Athyrium*, *Cornopteris* dan *Deparia* dengan sokongan nilai bootstrap yang tinggi iaitu 100%. Hasil kajian ini menyokong pengelasan terkini oleh PPG I (2016) yang mana Athyriaceae harus dikekalkan sebagai sebuah famili

tersendiri. Justeru, senarai semak oleh Parris dan Latiff (1997) yang masih mengelaskan Athyriaceae di bawah famili Woodsiaceae yang tergolong dalam lapan genus (*Acystopteris*, *Athyrium*, *Callistopteris*, *Cornopteris*, *Deparia*, *Diplaziopsis*, *Diplazium* dan *Hypodematum*) dan 77 takson di Malaysia perlu dikemaskini. Genus seperti *Diplaziopsis* dan *Hypodematum* telah dikeluarkan daripada Athyriaceae dan membentuk famili tersendiri iaitu Diplaziopsidaceae dan Hypodematiaceae. Kajian famili Athyriaceae yang pertama kali dijalankan di Malaysia ini telah berjaya mengenal pasti ciri anatomi yang boleh membezakan di peringkat genus Athyriaceae serta sokongan data molekul juga telah membuktikan bahawa ketiga-tiga genus *Athyrium*, *Deparia* dan *Diplazium* adalah terpisah antara satu sama lain. Hasil daripada kajian molekul membuktikan bahawa *Cornopteris* mempunyai hubungan adik beradik yang lebih rapat dengan *Athyrium* dengan nilai sokongan bootstrap yang tinggi iaitu 100%. Di samping itu, hasil daripada kajian ini membuktikan bahawa topologi yang dihasilkan hanya berdasarkan ciri anatomi sahaja dan tidak membantu dalam menyelesaikan masalah hubungan filogeni akibat pembentukan parafiletik. Justeru, bagi mengukuhkan pengelasan famili Athyriaceae, penggabungan data seperti morfologi, anatomi, sitologi dan molekul serta melibatkan spesies dari kawasan lain contohnya dari Sabah dan Sarawak dapat membentuk sebuah pohon filogeni famili Athyriaceae yang lebih menyeluruh.

#### PENGHARGAAN

Kajian ini telah dijalankan dengan menggunakan dana penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia iaitu Geran Universiti Penyelidikan (UKMGUP-2017-025). Setinggi-tinggi penghargaan juga ditujukan kepada semua kurator Herbarium yang terlibat kerana telah menyediakan spesimen herbarium bagi kajian ini.

#### RUJUKAN

- Adjie, B., Takamiya, M., Ohta, M., Ohsawa, T.A. & Watano, Y. 2008. Molecular phylogeny of the Lady Fern Genus *Athyrium* in Japan based on chloroplast *rbcL* and *trnL-F* sequences. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 59(2): 79-95.
- Altschul, S.F., Thomas, L.M., Alejandro, A.S., Jinghui, Z., Webb, M. & David, J.L. 1997. Gapped BLAST and PST-BLAST: A new generation of protein database, search programs. *Nucleic Acid Research* 25: 3389-3402.
- Arshad, S., Juhari, M.A.A., Talip, N., Wahab, N.A.A. & Adam, J. 2021. Anatomi dan mikromorfologi *Tetrastigma rafflesiae* (Vitaceae). *Sains Malaysiana* 50(4): 897-905.

- Ching, R.C. 1938. A revision of the Chinese and Sikkim-Himalayan *Dryopteris* with reference to some species from neighbouring regions. *Bulletin of the Fan Memorial Institute of Biology, Botany* 8: 157-334.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1990. Isolation of plants DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Felsenstein, J. 1985. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum-likelihood approach. *Journal of Molecular and Evolution* 17: 368-376.
- Hasebe, M., Omori, T., Nakazawa, M., Sano, T., Kato, M. & Iwatsuki, K. 1994. *rbcL* gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 5730-5734.
- Holttum, R.E. 1947. A revised classification of leptosporangiate ferns. *Botanical Journal of the Linnaean Society* 53: 123-155.
- Holttum, R.E. 1968. *Revised Flora of Malaya. Vol. 2. Ferns*. Edisi ke-2. Singapura: Government Printing Office.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Company Inc.
- Kato, M. 1977. Classification of *Athyrium* and allied genera of Japan. *Botanical Magazine, Tokyo* 90: 23-40.
- Kuo, L-Y., Ebihara, A., Hsu, T-C., Rouhan, G., Huang, Y-M. Wang, C-N., Chiou, W-L. & Kato, M. 2016. Infrageneric revision of the fern genus *Deparia* (Athyriaceae, Aspleniineae, Polypodiales). *Systematic Botany* 43(3): 645-655.
- Lanfear, R., Frandsen, P.B., Wright, A.M., Senfeld, T. & Calcott, B. 2017. PartitionFinder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 34: 772-773.
- Maideen, H., Aliah, N. & Nadhirah, N. 2021. A new record of the fern genus *Cornopteris* (Athyriaceae) from Peninsular Malaysia. *American Fern Journal* 111(2): 63-67.
- Maideen, H., Nadhirah, N., Aliah, N. & Norhazrina, N. 2023. Anatomy and morphology of *Taenitis* Willd. ex Sprengel (Monilophytes) in Peninsular Malaysia. *Sains Malaysiana* 52(5): 1333-1343.
- Maideen, H., Aliah, N., Norhazrina, N. & Go, R. 2019. Rediscovery of *Diplazium procumbens* (Athyriaceae) in Peninsular Malaysia after more than 70 years, with notes on the morphology, spore ornamentation and anatomy. *Phytotaxa* 422(3): 241-247.
- Maideen, H., Syazwani, B., Norhazrina, N., Aliah, N., Noraini, T. & NurFarhanim, I. 2018. Anatomi rizom dan stipe genus *Pleocnemia* Presl (Tectariaceae) di Semenanjung Malaysia. *Sains Malaysiana* 47(4): 645-649.
- Mynnsen, C.M. & Sylvestre, L. 2019. Synopsis of *Diplazium* (Athyriaceae) from Brazil. *American Fern Journal* 109(4): 283-342.
- Parris, B.S. & Latiff, A. 1997. Towards a pteridophyte flora of Malaysia: A provisional checklist of taxa. *Malayan Nature Journal* 50: 235-280.
- Praptosuwiryo, T.N. & Darnaedi, D. 2014. The stelar anatomy of stipe and its taxonomic significance in *Diplazium* (Athyriaceae). *Floribunda* 4(8): 195-200.
- PPG I. 2016. A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. *Journal of Systematics and Evolution* 54(6): 563-603.
- Radford, A.E. 1986. *Fundamentals of Plant Systematics*. New York: Harper & Rows Publishers. Inc.
- Rothfels, C.J., Sundue, M.A., Kuo, L-Y., Larsson, A., Kato, M., Schuettpelz, E. & Pryer, K.M. 2012. A revised family-level classification for eupolypod II ferns (Polypodiidae: Polypodiales). *Taxon* 61(3): 515-533.
- Sass, J.E. 1958. *Botanical Microtechnique*. Ed. ke-3. Iowa: Iowa State University Press.
- Schuettpelz, E. & Pryer, K.M. 2007. Fern phylogeny inferred from 400 leptosporangiate species and three plastid genes. *Taxon* 56(4): 1037-1050.
- Smith, A.R., Pryer, K.M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H. & Wolf, P.G. 2006. A classification of extant ferns. *Taxon* 55(3): 705-731.
- Stuessy, T.F. 2009. Plant Taxonomy. *The Systematic Evolution of Comparative Data*. Edisi ke-2. New York: Columbia University Press.
- Swofford, D.L. 2002. *PAUP: Phylogenetics Analysis Using Parsimony and (Other methods)*, version 4 Beta 10. Sunderland: Sinauer Associates.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Hinggens, D.G. 1994. The CLUSTAL W Windows: Flexible strategies for multiple sequencing alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research* 25: 4875-4882.
- Umikalsom, Y. 1992. Anatomical studies of the Malaysian Aspleniaceae and Athyriaceae. *Botanical Journal of the Linnaean Society* 110: 111-119.
- Wei, R., Schneider, H. & Zhang, X-C. 2013. Toward a new circumscription of the twinosorus-fern genus *Diplazium* (Athyriaceae): A molecular phylogeny with morphological implications and infrageneric taxonomy. *Taxon* 62(3): 441-457.
- Wei, G., Song, J., Cao, Y., Sun, Q., Yao, H, Wu, Q., Chao, J., Zhou, J., Xue, W. & Duan, J. 2013. Application of the *ITS2* region for barcoding medicinal plants of Selaginellaceae in Pteridophyta. *PLoS ONE* 8(6): e67818.

\*Pengarang untuk surat-menyurat; email: aliahkhaduwi@ukm.edu.my