



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

## Grao en Bioloxía

### Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Análise da viabilidade das esporas en poboacións do feito relicto ameazado  
*Culcita macrocarpa***

**Análisis de la viabilidad de las esporas en poblaciones del helecho relicto  
amenazado *Culcita macrocarpa***

**Spore viability analysis in populations of the threatened relict fern *Culcita  
macrocarpa***



**Eva Fernández Martínez**

Junio de 2019

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



## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de este TFG no habría sido posible sin la ayuda y colaboración de mucha gente: agradecer a Jorge Lorenzo y Pilar Castro por sus consejos para iniciar este trabajo y la cesión de las esporas para esas primeras pruebas; y a Luis Costa y Javier Amigo por su tiempo y su guía a la hora de localizar las poblaciones y recoger el material en el campo (a pesar de los percances).

Agradecer también al departamento de fisiología vegetal por permitirme invadir su cámara de cultivo, su cámara de flujo y demás instrumental que necesité para sembrar tantas y tantas placas.

Y sobre todo a mis dos tutores, Manuel Pimentel y Elvira Sahuquillo, por su enorme paciencia, su ayuda y toda la confianza que pusieron en mi durante todos estos meses de trabajo.



## ÍNDICE

Resumen/Palabras clave	3
Resumo/Palabras clave	3
Abstract/Keywords	4
Introducción	5
Objetivos	8
Material y métodos	9
Resultados	15
Discusión	24
Conclusiones	26
Conclusions	26
Bibliografía	27



## RESUMEN

*Culcita macrocarpa* (Familia Dicksoniaceae), helecho arborescente relicto subtropical, se encuentra amenazado por la reducción de su hábitat. En este trabajo, pretendemos determinar si existen diferencias en la *fitness* entre diferentes poblaciones de este helecho. Se obtuvieron esporas en cuatro poblaciones gallegas de distinto tamaño que se sembraron *in vitro* aplicando dos tratamientos diferentes: germinación directa (tratamiento de luz) y mantenimiento en oscuridad 45 días antes de la germinación (tratamiento de oscuridad). Para cada población, se obtuvieron los porcentajes de viabilidad y germinación y se estimó la velocidad de germinación de forma indirecta. Los análisis estadísticos realizados mostraron diferencias significativas en la *fitness* de las poblaciones. Los valores de viabilidad son bajos, mientras que los de germinación (porcentaje y velocidad) son por lo general altos, observándose una clara diferenciación entre tratamientos. La situación geográfica parece ser más relevante que el tamaño poblacional en la *fitness* de las poblaciones. Sin embargo, será necesario analizar más poblaciones y observar más ciclos anuales para llegar a conclusiones más firmes.

**PALABRAS CLAVE:** *Culcita macrocarpa*, *fitness*, germinación, , viabilidad

## RESUMO

*Culcita macrocarpa* (Familia Dicksoniaceae), feito arborescente relicto subtropical, atópase ameazado pola redución do seu hábitat. Neste traballo pretendemos determinar se existen diferenzas na *fitness* entre diferentes poboacións deste feito. Obtivéronse esporas en catro poboacións galegas de distinto tamaño que sembráronse *in vitro* aplicando dous tratamentos diferentes: xermolación directa (tratamento de luz) e mantemento en escuridade 45 días antes da xermolación (tratamento de escuridade). Para cada poboación, obtivéronse as porcentaxes de viabilidade e xermolación e estimouse a velocidade de xermolación de xeito indirecto. As análises estatísticas realizadas mostraron diferenzas significativas na *fitness* das poboacións. Os valores de viabilidade son baixos, mentres que os de xermolación (porcentaxe e velocidade) son polo xeral altos, observándose unha clara diferenciación entre tratamentos. A situación xeográfica semella ser máis relevante que o tamaño poboacional na *fitness* das poboacións. Porén, será necesario analizar máis poboacións e observar máis ciclos anuais para chegar a conclusións máis firmes.

**PALABRAS CLAVE:** *Culcita macrocarpa*, *fitness*, viabilidade, xermolación

## **ABSTRACT**

*Culcita macrocarpa* (Family Dicksoniaceae), a subtropical relict tree fern, is threatened by the reduction of its habitats. Here, we intend to determine if there are differences in *fitness* among different populations of this fern. Spores were obtained in four Galician populations with different population sizes. They were sown *in vitro* applying two different approaches. Spores were either sown directly (light treatment) or they were kept in the dark for 45 days before being sown (dark treatment). For each population, viability and germination percentages were obtained and germination speed was indirectly estimated. We conducted statistical analyses that showed significant differences in the *fitness* of populations. Viability values are low, while germination values (percentage and speed) are generally high, showing a clear differentiation between treatments. Geography seems to be more relevant than population size in the *fitness* of populations. More analyses including more populations are needed in order ascertain our results.

**KEYWORDS:** *Culcita macrocarpa*, *fitness*, germination, viability

## INTRODUCCIÓN

El término helecho agrupa a numerosos linajes de plantas vasculares, muchos de ellos extintos, caracterizados por tener ciclos digenéticos, haplo- diplofásicos, en los que el gametófito haploide (protalo) y el esporófito diploide llevan vidas separadas en el espacio y el tiempo (diplobiontes; Frey, 2009). Esta naturaleza dual (Fig. 1) es determinante en la supervivencia de estos grupos (Ranker & Haufler, 2008), y deberá ser considerada en cualquier estrategia de conservación.

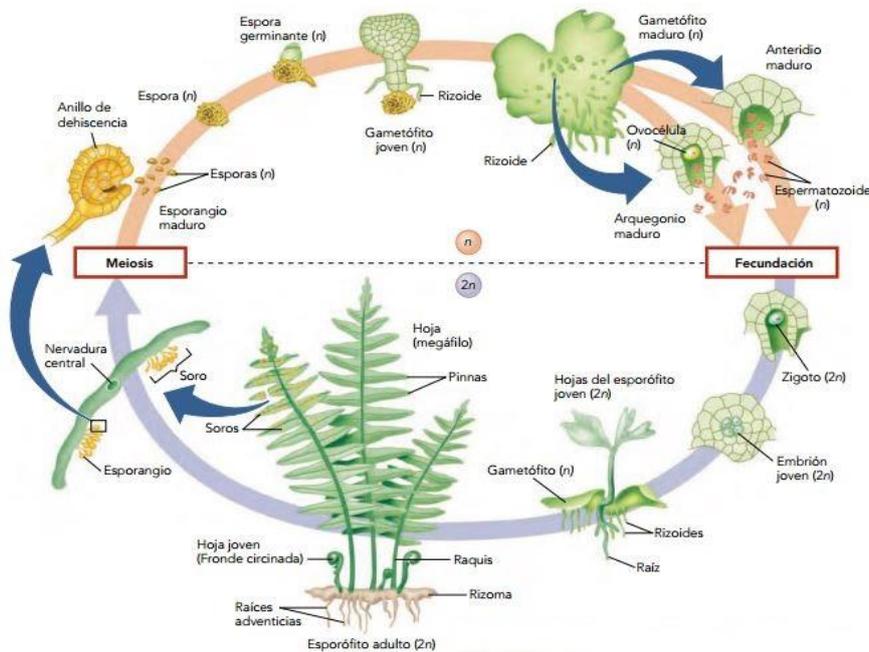


Figura 1. Ciclo vital de un helecho isosporeo (Nabors, 2006)

Dentro de los helechos, el linaje más diverso está incluido en la Superclase Moniliformopses (División Tracheophyta, Subdivisión Euphyllophytina, Frey, 2009), que incluye alrededor de 9000 especies repartidas en cuatro Clases (Equisetopsida, Polypodiopsida, Psilotopsida y Marattiopsida), siendo la Clase Polypodiopsida la más diversa. Los esporófitos son cormófitos y mayoritariamente isospóreos de distribución cosmopolita (ausentes únicamente de zonas polares y desérticas; Ranker & Haufler, 2008).

Actualmente, un 38% de las especies de helechos presentan algún grado de amenaza, lo que supone un porcentaje notablemente superior al de las plantas vasculares o los briófitos *s. lat.* (Brummit et al., 2016). Las causas principales de este mayor grado de amenaza serán la destrucción de su hábitat, especialmente intensa en las regiones tropicales, y el cambio climático global. El aumento de temperatura y el mayor grado de sequedad ambiental suponen un grave problema para estas especies ligadas a las zonas húmedas, principalmente debido a sus gametófitos talofíticos y a la producción de gametos masculinos flagelados (Ballesteros et al., 2012; Brummit et al., 2016).

La conservación de las especies requiere un conocimiento de su biología reproductiva y desarrollo, así como el diseño de procedimientos para la preservación de la diversidad en su medio (*in-situ*) y en bancos de germoplasma (*ex-situ*). En el caso de las plantas sin semilla como los helechos, será necesaria, por un lado, la recolección y conservación de las esporas, y por el otro, desarrollar metodologías para conseguir su germinación, el desarrollo de los gametófitos y la fecundación (Denton-Giles, 2006). Estos dos últimos procesos suelen ser limitantes de acuerdo a lo observado en la bibliografía (Goller & Rybczynski, 2007).

Las técnicas de cultivo *in vitro* son esenciales en los programas de conservación. Permiten ejercer un elevado nivel de control sobre el proceso de desarrollo de la especie cultivada, y han sido muy empleadas en helechos amenazados o de interés comercial como los helechos arborescentes (Goller & Rybczynski, 2007). El uso de estas técnicas requiere la selección cuidadosa de las poblaciones fuente para la obtención de las esporas, atendiendo principalmente a dos criterios: la diversidad genética (el sistema reproductivo está íntimamente relacionado con ella; Sessa et al. 2016) y la *fitness* de las poblaciones medida a través de parámetros relacionados con la supervivencia y la fecundidad (Quintanilla & Escudero, 2006). La selección de los parámetros relativos a la *fitness* es compleja, dado que numerosos factores influyen en la supervivencia y reproducción de las especies (Orr, 2009). En el caso de los helechos, la existencia del gametófito es especialmente importante ya que los protalos son la fase del ciclo responsable de la expresión de la sexualidad (producción de los gametos y gamia). Por otro lado, su naturaleza talofítica hace que la supervivencia de los gametófitos esté muy ligada a las condiciones ambientales (Bateman & DiMichelle, 1994).

Tradicionalmente, se ha establecido una conexión entre la diversidad genética y la adaptabilidad de los organismos ante cambios ambientales (Bertorelle et al., 2009). Numerosas especies de helechos se encuentran sometidas a procesos de disminución de sus poblaciones, lo que aumentaría el riesgo de erosión genética en estas especies y de decrecimiento de la *fitness* adaptativa (Quintanilla et al., 2007). Sin embargo, la elevada capacidad de dispersión de los helechos a través de las esporas (Quintanilla et al., 2007) y su elevada tolerancia a la endogamia (Sessa et al., 2016) podrían combatir este proceso, por lo que el riesgo de extinción deberá establecerse siempre de manera especie-específica (Rueda et al., 2015).

*Culcita macrocarpa* C.Presl (Clase Polypodiopsida, Orden Cyatheales, Familia Dicksoniaceae) es un helecho isospóreo arborescente perteneciente a los llamados relictos macaronésicos. Se trata de especies de óptimo tropical que, de acuerdo con algunos autores, son representantes de la Flora terciaria (pre-glaciar) del Mediterráneo Occidental (Quintanilla et al., 2002b), si bien la hipótesis de una colonización reciente no ha sido descartada. Presenta una distribución discontinua a lo largo de la zona Atlántica de la Península Ibérica (poblaciones en Cádiz, Norte de Portugal, Galicia, Asturias, Cantabria y Euskadi) y en la Macaronesia (Islas Canarias, Açores y Madeira), estando las poblaciones continentales más grandes situadas en la provincia de A Coruña, concretamente en los valles de los ríos Xubia, Eume y Landoi (Quintanilla et al., 2000; Betancourt, 2018; Fig. 2).



Figura 2. Mapa de distribución de *Culcita macrocarpa* (<https://www.gbif.org>. Accedido el 12 de junio de 2019)

*Culcita macrocarpa* (Fig. 3) es un helecho de gran tamaño y de porte subarborescente-rastrero (Korall et al., 2007), con un rizoma grueso, cubierto de páleas filiformes. Sus frondes pueden llegar a medir hasta 3m, coriáceas, varias veces pinnatisectas y de bordes revolutos sobre los que se disponen los soros reniformes (Castroviejo et al., 1986) que producen esporas tetraédrico-globosas no fotosintéticas (Quintanilla et al., 2002). La fisiología de las esporas es recalcitrante, lo que provoca que sean sensibles a cambios en la humedad ambiental o congelación (Ballesteros et al.,

2012). La sensibilidad de las esporas limita la amplitud ecológica de esta especie, que habita en zonas umbrófilas dentro de bosques de alta humedad ambiental, principalmente cerca del cauce de ríos (Bañares et al., 2006). En lo que se refiere a su desarrollo, *C. macrocarpa* sigue el mismo patrón de las restantes Dicksoniaceae. Al germinar las esporas producen protonemas filamentosos uniseriados de bajo número de células, cuyo eje de división celular cambia con el desarrollo para dar lugar a un protalo laminar. A continuación, se desarrollan los anteridios y posteriormente los arquegonios, siendo los protalos habitualmente hermafroditas (Quintanilla et al., 2005). Diversos autores han señalado que este tipo de desarrollo favorece la autogamia en los protalos (Verma, 2001). Análisis centrados en las poblaciones gallegas de *C. macrocarpa* indican que la diversidad genética dentro y entre las poblaciones es extremadamente baja (Quintanilla et al., 2007).



Figura 3. Envés de una fronde de *C. macrocarpa* donde se observan los soros reniformes (foto: Elvira Sahuquillo)

La fragmentación en la distribución de esta especie y la fragilidad de su hábitat hace que se considere como casi amenazada en la Lista Roja de la IUCN. Otros riesgos para su conservación serán el coleccionismo y, a más largo plazo, el incremento de temperatura y sequedad originado por el cambio climático (Bañares et al. 2006). En lo que se refiere al su estatus legal, se incluye en el Anexo II de la Directiva de Hábitats de la Unión Europea (Directiva 92/43/CEE del Consejo) y en la categoría de especie en peligro de extinción en el catálogo gallego de especies amenazadas (Decreto 88/2007 de la Xunta de Galicia). Está también incluida en el catálogo español de especies amenazadas (Real Decreto 139/2011), pendiente de calificación.

Este trabajo pretende avanzar en el estudio de la variación de los valores de *fitness* de las poblaciones de *C. macrocarpa* en Galicia. Los resultados obtenidos podrán servir de apoyo a futuros proyectos orientados a la conservación de la especie.

## OBJETIVOS

La hipótesis de partida de este trabajo será la existencia de diferencias entre las poblaciones analizadas de *C. macrocarpa* referidas a distintos parámetros de su *fitness*. Además, se pretende responder a las siguientes preguntas:

1. ¿Pueden atribuirse las diferencias observadas (si existen) al diferente tamaño de las poblaciones?
2. ¿Afecta el tratamiento previo de las esporas (posterior a su recogida) al porcentaje de germinación de las mismas, o a su velocidad de germinación?
3. Considerando la baja diversidad genética de las poblaciones observada por otros autores, ¿son nuestros resultados útiles a la hora de seleccionar una población concreta para futuros proyectos de recuperación?

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Poblaciones estudiadas

El material vegetal empleado en este trabajo se recogió en 4 poblaciones de *C. macrocarpa* (Tabla 1), seleccionadas en base a dos criterios: i) su diferente número de individuos, incluyéndose dos núcleos de gran tamaño y dos poblaciones reducidas y ii) su situación geográfica, cubriéndose todo el rango de distribución de esta especie en Galicia (Rodríguez Guitián et al., 2012), entre los valles del Eume y del Sor. Los tamaños poblacionales se obtuvieron de Rodríguez Guitián et al. (2012), Betancourt (2018) y a través de una comunicación personal del Dr. Luis Costa (Xunta de Galicia, Consellería de Medio Ambiente, Territorio e Vivenda).

Tabla 1: Datos descriptivos de las distintas poblaciones de *C. macrocarpa* incluidas en el estudio. Debido a que son poblaciones amenazadas, no se aportan los datos concretos de su localización. \*Luis Costa, comunicación personal. PN, Parque Natural; Lat., latitud; Alt., altitud; D.m., distancia del mar; N°I, número de individuos; ram, rametos

Código	Población	Lat.	Alt.	D.m.	N°I
C1	PN Fragas do Eume, A Capela, A Coruña	43°25'N	160m	3Km	3911 ram
C2	Seixo de Landoi, Ortigueira, A Coruña	43°41'N	280m	3Km	+5.000 ram*
C3	Ambosores, Muras-Ourol, Lugo	43°31'N	460m	20km	41 ram
C4	PN Fragas do Eume, A Coruña	43°24'N	90m	8Km	37 ram

En lo que se refiere a las características de las zonas visitadas, todas ellas se encuentran en el piso Mesotemplado de la Región Eurosiberia, Provincia Cántabro-Atlántica, sector Galaico-Asturiano (Peinado-Lorca & Rivas Martínez, 1987). Las dos poblaciones del Parque Natural de las Fragas de Eume crecen en suelos generados sobre una litología dominada por las rocas metamórficas del complejo “Ollo de sapo” y rocas graníticas hercinianas (Fernández & Monteserrín, 1976). Los suelos de estas localidades (C1 y C4) se corresponden con umbrisoles húmicos (Calvo de Anta & Macías, 2000) de alta humedad por su proximidad a los cauces de los ríos. Siguiendo con las características litológicas y edafológicas, la población C3 (Seixo de Landoi) también se desarrolla sobre umbrisoles húmicos de alta humedad, si bien la litología en este caso son rocas básicas del complejo de A Capelada-Cabo Ortegal (Calvo de Anta & Macías, 2000b; Fernández & Fernández, 1977). Finalmente, la población de Ambosores (C4) habita en regosoles húmedos desarrollados sobre pizarras y filitas (Calvo de Anta & Macías, 2000c; Arce & Fernández, 1976).

La descripción climática de las localidades se basa en los datos obtenidos de diferentes estaciones (Tabla 2) y en diferentes periodos de tiempo, siempre que sea posible. Más concretamente, se consultaron los datos entre 1950 y 1980 disponibles en Carballeira et al. (1983) y los datos entre 2011-2018 disponibles en el Servicio Meteorológico de la Xunta de Galicia ([www.meteogalicia.gal](http://www.meteogalicia.gal)), si bien no se pudo obtener el periodo completo para todas las estaciones. Las tres zonas donde se ubican las poblaciones de *C. macrocarpa* poseen un clima Atlántico Europeo según la clasificación fitoclimática de Allué, y Marítimo Templado (Mediterráneo Templado en la estación de Monteventoso) según la clasificación de Papadakis (Carballeira et al., 1983). De acuerdo con los datos obtenidos, únicamente la población de Seixo de Landoi (C2) presentaría sequía estival, si bien la proximidad a los cauces y la precipitación horizontal propia de la zona probablemente la previenen.

Dentro de los datos disponibles (Tabla 3), se seleccionaron para la descripción de las poblaciones aquellos que a priori pudieran tener más efectos en el desarrollo de las plantas: temperaturas (medias anuales, media de las máximas anuales y media de las mínimas anuales) y precipitaciones (total acumulado anual). Los datos indican una alta homogeneidad entre las localidades, pudiendo justificarse las pequeñas diferencias observadas (especialmente en lo referido a las precipitaciones) en base a la proximidad al mar de las distintas estaciones seleccionadas.

Tabla 2: Estaciones meteorológicas utilizadas para caracterizar climáticamente cada una de las poblaciones. El histórico de datos de 1950-1980 es el proporcionado por Carballeira et al. (1983). Los datos actualizados de 2011-2018 han sido obtenidos del Servicio Meteorológico de la Xunta de Galicia ([www.meteogalicia.gal](http://www.meteogalicia.gal)).

<b>Poblaciones</b>	<b>Datos 1950-1980</b>	<b>Datos 2011-2018</b>
C1 y C4	A Capela	A Capela
	Eume (embalse)	--
C2	Estaca de Bares	Cariño
C3	--	Borreiros (Viveiro)

La vegetación dominante en las distintas poblaciones estudiadas es también bastante homogénea. En todos los casos se trata de robledales templados de la asociación *Blechno-spicanti Quercetum roboris*. En el estrato arbóreo dominan especies de las familias Fagaceae (*Quercus robur* L.), Betulaceae (*Betula alba* L., *Corylus avellana* L.) y Lauraceae (*Laurus nobilis* L.), si bien en todos los casos las poblaciones se desarrollan cerca de plantaciones de *Eucalyptus globulus* Labill. La vegetación herbácea acompañante es típica de las zonas forestales húmedas del NW de Galicia.

## **Material vegetal**

Para la obtención de las esporas de *C. macrocarpa* se guardaron fragmentos de frondes con los soros inmaduros en sobres de papel, separando cada individuo para la obtención de esporas en el laboratorio. Se recolectaron un mínimo de 20 fragmentos por población según el tamaño poblacional y cuando el número de plantas en esporulación así lo permitía (Tabla 4). Las frondes recolectadas estaban como mínimo a 10 m de distancia unas de otras para evitar la recogida de clones. Así mismo, se intentó que los soros recolectados en las distintas poblaciones fueran homogéneos atendiendo a su color y textura (J. Lorenzo, comunicación personal).

Los trozos de fronde obtenidos se colocaron entre hojas de papel de filtro con un peso encima para fomentar la maduración de las esporas y su liberación. Tras una semana de secado, se procede a filtrar la spora obtenida con un tamiz de 100µm para eliminar distintos restos vegetales, principalmente esporangios abiertos. Las esporas obtenidas de cada individuo se guardaron en el congelador individualmente en tubos plásticos debidamente etiquetados siguiendo a Quintanilla et al. (2000). Por el mismo procedimiento se obtuvieron esporas de las especies *Dryopteris affinis* Newman y *Cyathea cooperi* (Hook ex. F.Muell) Domin. Estas esporas, que se emplearon en la realización de pruebas previas de germinación, fueron cedidas por el experto en helechos tropicales Jorge Lorenzo.

Tabla 3: Valores climáticos analizados para las poblaciones de *C. macrocarpa*. Los datos históricos (1950-1980) fueron obtenidos de Carballeira et al. (1983); los datos actuales de 2011-2018 han sido obtenidos del Servicio Meteorológico de la Xunta de Galicia ([www.meteogalicia.gal](http://www.meteogalicia.gal)).

Estación	Temperaturas (°C)			Precipitaciones (L/m <sup>2</sup> )
	Media	Máximas (media)	Mínimas (media)	
<b>Poblaciones C1 y C4</b>				
A Capela (1950-1980)	13,8	18,7	8,9	1.915
A Capela (2013-2018)	11,8	16,8	7,6	1.998
Eume (1950-1980)	15,1	19,7	10,4	1.910
<b>Población C2 (Seixo de Landoi)</b>				
Estaca de Bares (1950-1980)	12,9	15,8	10,0	1062
Cariño (2013-2018)	14,6	16,9	12,2	1498
<b>Población C3 (Ambosores)</b>				
Borreiros (Viveiro; 2011-2018)	13,7	18,3	9,5	1332

### Germinación de esporas *in vitro*. Análisis preliminares

La siembra de las esporas se realizó en placas petri siguiendo la técnica descrita por Dyer (1983) según las correcciones de Estrelles (2004). Las esporas se cultivaron en un medio totalmente mineral incluyendo los siguientes componentes (Dyer, 1983): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,51g/l); KNO<sub>3</sub> (0,12 g/l); Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (1,44 g/l); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,25 g/l); FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,017 g/l). Se realizaron distintas pruebas para obtener las condiciones óptimas de cultivo, cuyos resultados se combinaron con lo observado en la literatura, principalmente Quintanilla et al (2000, 2002) y Denton-Giles (2006).

Las primeras pruebas (realizadas con *D. affinis* y *C. cooperi*) tuvieron como objetivo establecer un sistema de sembrado que cumpliera dos objetivos: i) conseguir repartir las esporas de manera lo más homogénea posible para facilitar los recuentos y ii) mantener la esterilidad del cultivo. En todos los casos, las esporas se incubaron en agua destilada a temperatura ambiente antes de proceder a su sembrado en las placas. Un volumen fijo de la mezcla espора-agua se vertió en la placa con ayuda de una micropipeta. Para la dispersión de la mezcla se probaron espátulas, pinceles y bolas de siembra de vidrio autoclavadas. Antes del sembrado se realizó un conteo de las esporas imbibidas en agua con la ayuda de una cámara de Neubauer. En paralelo a esta primera prueba se probaron también distintas concentraciones de agar en el medio (1%, 1,5% y 2%) para analizar el efecto de los distintos procedimientos de dispersión de esporas en el medio.

Dada la frecuencia de aparición de hongos en las placas de cultivo, se probó el efecto de la adición de un fungicida (Nystatina 85%, Acros organics) en el crecimiento relativo de hongos y esporas-gametófitos (Dyer, 1983; Quintanilla et al., 2002; Estrelles, 2004). La concentración de Nystatina probada en el medio fue de 10 U/ml, un valor inferior al generalmente empleado en los medios de cultivo. Se optó por una concentración baja porque se observó en los medios sin Nystatina que el

crecimiento de los hongos era extremadamente lento y no parecía afectar al crecimiento de las esporas.

Tabla 4. Material vegetal empleado en el estudio y tiempo entre la recogida del material y la esporulación.

<b>Población</b>	<b>Fecha recogida</b>	<b>Nº individuos</b>	<b>Tiempo esporulación</b>	<b>Nº individuos con esporas</b>
C1	19/12/2018	20	7 días	19
C2	27/12/2018	26	11 días	26
C3	04/02/2019	17	10 días	16
C4	21/02/2019	13	7 días	12

### **Siembras y cultivo de *Culcita macrocarpa*:**

Las siembras y el cultivo de las esporas de *C. macrocarpa* se realizaron siguiendo lo observado en la bibliografía (Dyer, 1983; Quintanilla et al. 2000, 2002; Estrelles, 2004; Denton-Giles, 2006; Goller & Rybczynski, 2007) y atendiendo a los resultados de las pruebas preliminares realizadas. En concreto, se empleó el medio de Dyer (1983) ya citado en el apartado anterior con una concentración del 1,5% de agar y 10 U/ml de Nystatina. La dispersión de la mezcla espóra-agua (obtenida como se comentó anteriormente) en la placa petri se realizó finalmente con bolas de vidrio autoclavadas. Se estimó la cantidad de esporas sembradas empleando diluciones seriadas de una cantidad fija de esporas y una cámara de Neubauer.

Se aplicaron dos tratamientos a las esporas según Quintanilla et al. (2000). En un caso las esporas fueron cultivadas nada más ser recogidas en cámara de cultivo a  $24,59^{\circ}\text{C}\pm 0,58^{\circ}\text{C}$  y con fotoperíodo 16h:8h (luz/oscuridad). El otro tratamiento consistió en el mantenimiento de las esporas, sembradas, en oscuridad y a temperatura constante (cámara de cultivo a  $20,30^{\circ}\text{C}\pm 0,87^{\circ}\text{C}$ ) durante 45 días. Una vez transcurrido este período las esporas continúan bajo las mismas condiciones que las del tratamiento de luz ( $24,59^{\circ}\text{C}\pm 0,58^{\circ}\text{C}$  y con fotoperíodo 16h/8h).

Inicialmente (población C1) se sembraron dos placas por cada tratamiento (luz y oscuridad) e individuo (Tabla 5). Para las siguientes poblaciones (C2, C3 y C4) únicamente se sembró una placa por individuo y tratamiento por las siguientes razones: (i), falta de espacio disponible en las cámaras de la Facultad de Ciencias y ii) la siembra de esporas de numerosos individuos por población reduce la necesidad de incluir réplicas en el estudio.

Tabla 5. Número de placas sembradas y fecha de siembra para cada una de las poblaciones analizadas

<b>Población</b>	<b>Fecha siembra</b>	<b>Nº placas</b>
C1	28/12/2018	76 + 3 blancos
C2	08/01/2019	40 + 2 blancos
C3	15/02/2019	32 + 2 blancos
C4	01/03/2019	24 + 2 blancos

Siguiendo la metodología utilizada en diversos artículos (Quintanilla et al., 2002; Ballesteros et al., 2012), y antes del inicio de las pruebas de germinación, se realiza un análisis de la viabilidad de las esporas (en porcentaje) considerando 100 esporas aleatorias por cada placa (Fig. 4). Se considera espora viable aquella que no se encuentra rota o sin protoplasma (en *C. macrocarpa* se observa muy fácilmente por el color anaranjado que tienen las esporas viables frente al gris de aquellas no viables; Quintanilla et al., 2000). En el caso de la serie de placas mantenidas en oscuridad, se realizó un análisis de la viabilidad de esporas justo al inicio del periodo de luz.

Para estimar los porcentajes de germinación a lo largo del tiempo, se realizan revisiones de las placas una vez transcurridos 10 días de cultivo (o, en el caso de las esporas mantenidas en oscuridad, 10 días después de someterlas a la luz por primera vez). Una vez observadas las primeras germinaciones, se realizarán recuentos de esporas germinadas cada dos días. En cada conteo se consideran 100 esporas por placa, y el proceso se repite hasta que el cultivo alcanza los 30 días. Una espora se considera germinada en cuanto aparece la primera célula clorofílica rompiendo la pared de la espora (Fig. 5; Quintanilla et al. 2000). Los análisis de viabilidad y germinación se realizaron bajo el estereomicroscopio (Olympus SZX9).



Figura 4. Diferencia entre dos esporas viables (superior) frente a una espora no viable sin protoplasma (espora inferior).



Figura 5. Espora germinada; se observa como la primera célula clorofílica ha roto la pared de la espora.

### Componentes de la *fitness* de las poblaciones de *Culcita macrocarpa*:

Para aproximarse a la *fitness* de los individuos y poblaciones de *C. macrocarpa* se analizaron dos parámetros (ya mencionados), la viabilidad de las esporas y su tasa de germinación. Ambos parámetros tienen un impacto claro en la fecundidad de los individuos y han sido señalados como clave en la supervivencia de las poblaciones de helechos (Gabriel y Galán & Prada, 2011). Con la idea de incluir dentro del estudio la velocidad de germinación de las esporas, se ha analizado también la pendiente de la recta entre el punto donde se observa la primera germinación y el punto en el que se alcanza el máximo porcentaje de germinación (en adelante, pendiente), según la fórmula:

$$p = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1}$$

### Análisis estadísticos

Una vez obtenidos todos los datos de las tres variables analizadas (porcentaje de viabilidad, porcentaje de germinación y pendiente) para los dos tratamientos (luz vs oscuridad), se procedió a su análisis estadístico con el programa IBM SPSS Statistics v. 25 (IBM, Armonk, Estados Unidos). Todos los análisis se llevaron a cabo para las poblaciones sin considerar los tratamientos, para el

conjunto de los datos diferenciando entre luz y oscuridad y de nuevo para las poblaciones, pero diferenciando entre los tratamientos.

El análisis se inició con la realización de diversos análisis exploratorios, tanto gráficos como numéricos. Se realizaron tablas de frecuencia de los datos y se estimaron su media, su desviación típica y su intervalo de confianza en la media al 95%. También se realizaron histogramas y diagramas de cajas de los datos obtenidos. Asimismo, se comprobó la distribución normal de todos los conjuntos de datos. Los tests empleados dependieron del número de datos del bloque a analizar: test de Shapiro-Wilks cuando la muestra fue menor de 50 y test de Kolmogorov-Smirnov, corrección de Lilliefors, cuando la muestra presentó más de 50 valores. Dependiendo de los resultados obtenidos de las pruebas de normalidad, se analizaron las diferencias entre las medias de los bloques aplicando tests paramétricos, ANOVA de una vía, o no paramétricos: prueba U de Mann-Whitney cuando existieron dos grupos independientes y prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples. La existencia de agrupaciones en los datos se comprobó mediante un test post-hoc de Tukey. La existencia de agrupaciones en los análisis no paramétricos de diferencia de varianzas (bloques múltiples, Kruskal Wallis) se testó mediante el test de Dunn-Bonferroni (IBM SPSS 25 support; [www.ibm.com/support](http://www.ibm.com/support). Accedido el 12 de junio de 2019).

## RESULTADOS

### Pruebas iniciales

Las primeras pruebas realizadas, junto con el uso de la bibliografía, permitieron ajustar las condiciones de cultivo para *Culcita macrocarpa*. En estos análisis preliminares se emplearon *Dryopteris affinis* y *Cyathea cooperi*. En ambas especies se observó que el uso de la espátula y el pincel autoclavados para la dispersión de las esporas resultaba, al final, en una mayor tasa de contaminación de las placas con respecto a las bolas de vidrio estériles. Asimismo, este último método permitía una mejor dispersión de las esporas, si bien el carácter de las esporas fuertemente hidrófugo provocaba la formación de masas de esporas difíciles de deshacer (Fig. 6). Las pruebas realizadas permitieron también determinar que la concentración de agar al 1,5% ofrecía los mejores resultados a la hora de facilitar el recuento de las esporas y de impedir que el uso de las bolas de vidrio, para su dispersión, acabase dañando la superficie del medio. Las pruebas realizadas en medio líquido (sin agar añadido) fueron exitosas en *C. cooperi*, obteniéndose gran cantidad de protalos laminares. Por contra, los gametófitos de *D. affinis* no sobrevivieron en el medio líquido.

No se observaron diferencias en cuanto a la germinación de las esporas de *D. affinis* y *C. cooperi* entre medios, con y sin fungicida, a una concentración de 10U/ml. Sin embargo, sí se apreció un retraso en la aparición de hongos (la primera placa contaminada con fungicida apareció al día 28 de cultivo, frente a las placas sin Nystatina que se contaminaron en los días 5 y 6 del cultivo) que permitió realizar análisis de porcentajes de germinación en medios libres de contaminación.



Figura 6. Masas de esporas de *C. macrocarpa*.

### **Análisis estadísticos de los datos de *Culcita macrocarpa*. Análisis exploratorios y de normalidad**

Si bien el análisis exploratorio se realizó para todas las variables y agrupaciones de los datos (poblaciones, tratamientos y poblaciones + tratamientos), únicamente se mostrarán los resultados correspondientes a la viabilidad de las esporas en las poblaciones (Tabla 6, Figura 7), los referidos a la germinación y la pendiente de las esporas en las poblaciones considerando los tratamientos (Tabla 7, Figuras 8 y 9) y los correspondientes a la germinación considerando los dos tratamientos (sin diferenciación por población; Fig. 10).

Como se puede ver en la Tabla 6, las medias y desviaciones estándar de la viabilidad de las esporas en las poblaciones C2, C3 y C4 son muy similares. Por contra, la viabilidad es mayor en la población C1, lo que es especialmente evidente en el intervalo de confianza sobre la media. El análisis gráfico de las variables [diagrama de cajas, Fig. 7, e histogramas (no se muestran)] es coherente con lo observado en la Tabla 6.

Tabla 6. Análisis exploratorio para la viabilidad en las distintas poblaciones. Desv. Est, desviación estándar; Int. Cf, intervalo de confianza para la media. Códigos de las poblaciones según Tabla 1.

	<b>Media</b>	<b>Desv. Est</b>	<b>Int. Cf</b>
<b>C1</b>	0,68	0,13	0,64 – 0,73
<b>C2</b>	0,59	0,12	0,55 – 0,63
<b>C3</b>	0,58	0,13	0,53 – 0,63
<b>C4</b>	0,57	0,12	0,52 – 0,63

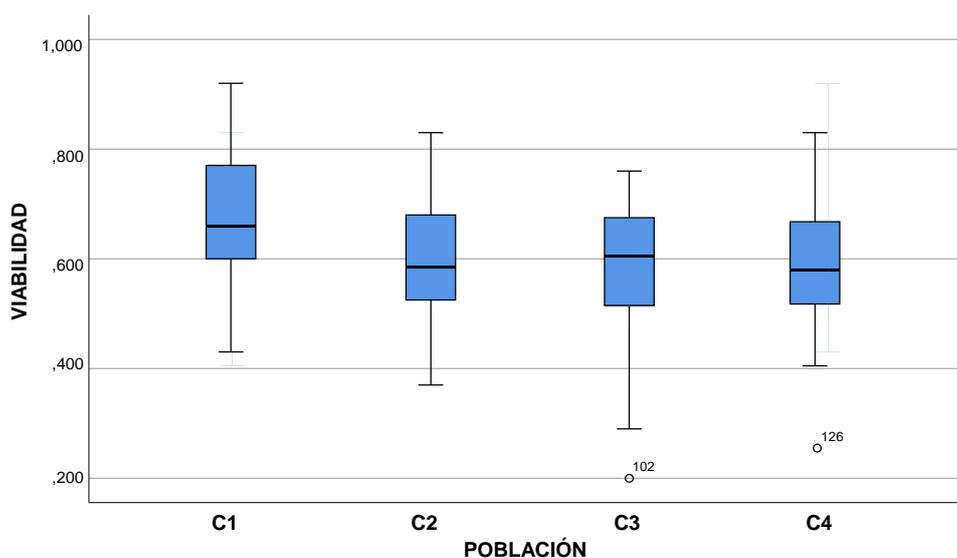


Figura 7. Diagrama de cajas correspondiente a la viabilidad de las poblaciones, sin atender a los tratamientos (luz vs oscuridad)

La Tabla 7 muestra que los datos de germinación (estimados sobre las esporas viables) son más altos en las poblaciones sometidas a un tratamiento previo de oscuridad. Esta diferencia, que se produce en todas las poblaciones, es especialmente notable en la población C3. Es importante señalar que la desviación estándar de los datos es inferior en las poblaciones con tratamiento de oscuridad (con la excepción de la población C4 en la que se igualan). Los datos de la pendiente son también superiores en las esporas con tratamiento de oscuridad, con la excepción de la población C2, donde existe poca diferencia (1,13 frente a 0,69). Los diagramas de cajas (Fig. 8) y los histogramas (no se muestran) para la germinación ofrecen la misma información, si bien en la Fig. 8 se puede observar que en las poblaciones sometidas a tratamiento de oscuridad (con la excepción parcial de la población C2) los datos se encuentran más comprimidos alrededor de la mediana, lo que también trae como consecuencia la existencia de un mayor número de valores atípicos, especialmente en la población C4.

En el caso de la pendiente (Fig. 9), es de señalar que la dispersión de los datos es mayor por lo general para las poblaciones sometidas a tratamiento de oscuridad, mientras que en las restantes poblaciones los datos se encuentran más próximos a la mediana. Una vez más, la población 2 parece tener un comportamiento ligeramente diferente a las demás.

El análisis exploratorio centrado en los tratamientos, sin atender a la diferenciación por población, ofrece resultados semejantes para la germinación (Fig. 10 A y B) y la pendiente (no se muestra). Los histogramas presentados permiten observar que la variabilidad de los datos es superior en el caso de las esporas no sometidas a tratamiento de oscuridad (Fig. 10A; Desviación típica: 0,118), mientras que el tratamiento alternativo produce menos variabilidad en los datos (Fig. 10B; Desviación típica: 0,077). Asimismo, en el tratamiento de oscuridad (Fig. 10B) se observa una gran acumulación de datos en los valores máximos, mientras que en el tratamiento de luz (Fig. 10A) los datos se distribuyen de manera menos sesgada.

Se aplicaron diversos test de normalidad a los datos. La viabilidad de las esporas fue normal para todas las poblaciones (en este caso la diferencia entre tratamientos no se aplica y los datos se analizaron conjuntamente; no se muestran los resultados). Germinación y pendiente fueron normales para las poblaciones en las que no se realizó el tratamiento previo de oscuridad, mientras que en las que sí se realizó no hubo normalidad (no se muestra).

Tabla 7: Análisis exploratorio para el porcentaje de germinación y la pendiente en las distintas poblaciones + tratamientos (luz/oscuridad). Desv. Est, desviación típica; Int. Cf, intervalo de confianza para la media. Códigos de las poblaciones según Tabla 1.

	GERMINACIÓN			PENDIENTE		
	Media	Desv. Est	Int. Cf	Media	Desv. Est	Int. Cf
<b>C1 luz</b>	0,85	0,09	0,81 – 0,89	1,76	0,74	1,41 – 2,11
<b>C1 osc</b>	0,96	0,08	0,92 – 1,00	9,68	4,08	7,72 – 11,65
<b>C2 luz</b>	0,80	0,10	0,76 – 0,85	3,68	1,13	3,14 – 4,21
<b>C2 osc</b>	0,90	0,05	0,88 – 0,93	0,69	0,69	0,37 – 1,02
<b>C3 luz</b>	0,73	0,10	0,67 – 0,78	3,87	0,62	3,54 – 4,20
<b>C3 osc</b>	0,98	0,03	0,96 – 0,10	5,89	2,33	4,65 – 7,13
<b>C4 luz</b>	0,92	0,12	0,84 – 1,00	4,20	1,47	3,27 – 5,14
<b>C4 osc</b>	0,96	0,12	0,88 – 1,00	5,74	3,19	3,71 – 7,76

### Análisis estadísticos de los datos de *Culcita macrocarpa*. Comparación entre poblaciones

La selección de los test realizados para las distintas variables se basó en los resultados descritos previamente, especialmente en lo que se refiere a las pruebas de normalidad (ver sección de Material y Métodos).

Con respecto a la viabilidad de las esporas, el test de Levene nos indica que hay homogeneidad entre las varianzas de las diferentes poblaciones (Tabla 8). El ANOVA de una vía realizado (Tabla 9) para los datos de viabilidad indica que hay diferencias entre las poblaciones. A su vez, el test de Tukey indica que el grupo C1 se encuentra claramente diferenciado de los demás; mientras que entre los grupos C2, C3 y C4, que presentan valores más bajos, no hay diferencias (Tabla 10). Otros

tests realizados con el mismo objetivo, como los tests de Scheffé y de Duncan (no se muestran) ofrecen los mismos resultados y niveles semejantes de significación.

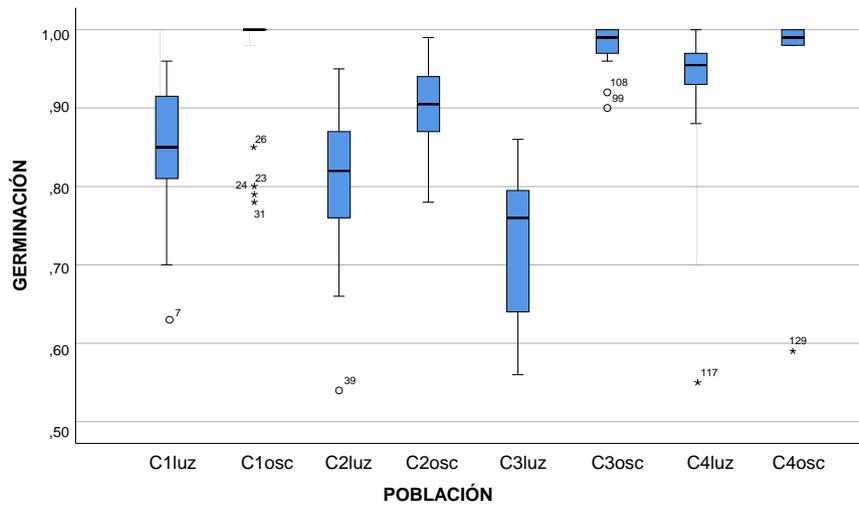


Figura 8. Diagrama de cajas correspondiente al porcentaje de germinación en las poblaciones, atendiendo a los tratamientos (luz vs oscuridad). Poblaciones según Tabla 1. Tratamientos definidos en Material e Métodos (luz, tratamiento de luz; osc, tratamiento de oscuridad).

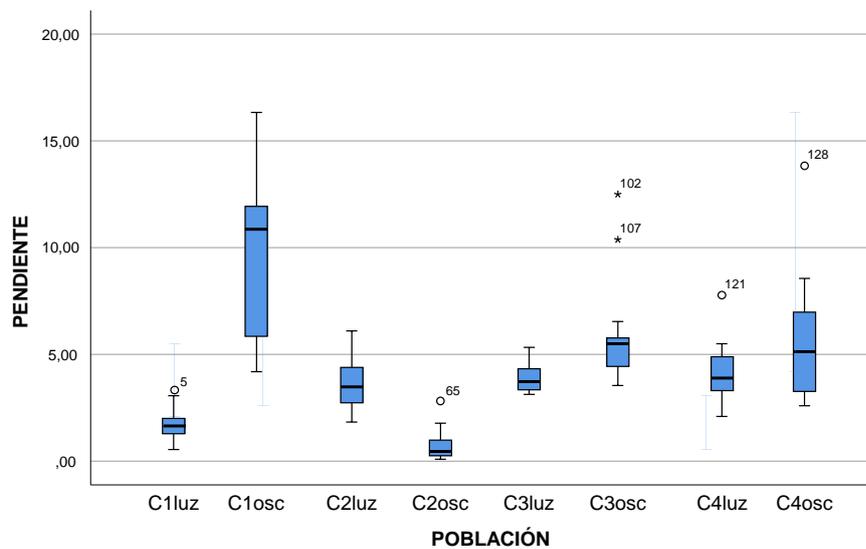


Figura 9. Diagrama de cajas correspondiente a la pendiente de las poblaciones, atendiendo a los tratamientos (luz vs oscuridad). Poblaciones según Tabla 1. Tratamientos definidos en Material e Métodos (luz, tratamiento de luz; osc, tratamiento de oscuridad).

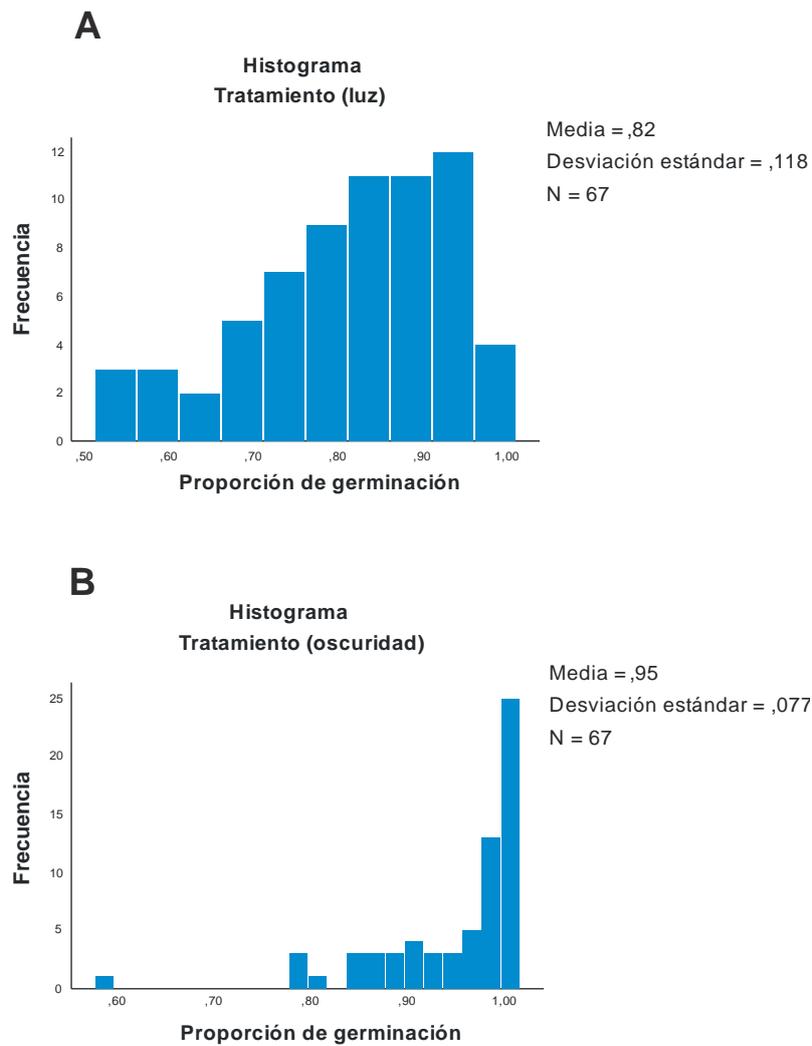


Figura 10. A, Histograma de los datos correspondientes al tratamiento de luz (todas las poblaciones). B, Histograma de los datos correspondientes al tratamiento de oscuridad (todas las poblaciones).

Tabla 8. Prueba de Levene realizada para el análisis de la homogeneidad de las varianzas entre las poblaciones para la variable “viabilidad de las esporas”. Est. Levene, estadístico de Levene; gl, grados de libertad; Sig., significación.

<b>VIABILIDAD</b>	<b>Est. Levene</b>	<b>gl1</b>	<b>gl2</b>	<b>Sig.</b>
Se basa en la media	,384	3	130	,765
Se basa en la mediana	,300	3	130	,825
Se basa en la mediana y con gl ajustado	,300	3	126,67	,825
Se basa en la media recortada	,375	3	130	,771

Tabla 9. Resultados del análisis ANOVA de una vía para los datos de viabilidad. Sig., significación; gl, grados de libertad; SdC, suma de cuadrados; Mc, Media cuadrática

	<b>SdC</b>	<b>gl</b>	<b>Mc</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Entre grupos	,273	3	,091	5,756	,001
Dentro de grupos	2,058	130	,016		
Total	2,331	133			

Como ya se mencionó, todas las poblaciones que no recibieron tratamiento de oscuridad mostraron normalidad en las variables porcentaje de germinación y pendiente. En lo que se refiere a la primera variable, todas las poblaciones presentaron además varianzas homogéneas según el test de Levene (no se muestra). El análisis ANOVA de una vía muestra diferencias significativas entre las medias de los cuatro grupos (Tabla 11). Asimismo, el test de Tukey muestra que existen diferencias entre las distintas poblaciones, si bien la separación entre ellas es, hasta cierto punto, ambigua, observándose una continuidad entre los distintos grupos analizados (Tabla 12). En todo caso, el test indica que existen mayores tasas de germinación que se producen en las poblaciones C1 y C4.

La prueba de Kruskal-Wallis, aplicada la variable de germinación de las muestras a las que se aplicó un tratamiento de oscuridad indica, una vez más, la existencia de diferencias significativas entre las poblaciones. Asimismo, las pruebas de Kruskal Wallis pareadas y las pruebas de la mediana (no se muestra) indican que las diferencias radican en la población C2, que presenta valores significativamente menores.

Tras analizar por separado el tratamiento de luz y oscuridad, se realizó un análisis no paramétrico para la germinación de todo el conjunto de datos. El test U de Mann-Whitney rechazó la semejanza entre ambos tratamientos, mostrando que hay diferencias significativas en la germinación según el tratamiento aplicado (no se muestra).

En lo que se refiere a la pendiente, los datos de las poblaciones sometidas al tratamiento de luz fueron analizadas con el estadístico de Levene para observar si presentaban homocedasticidad, rechazándose la hipótesis nula de igualdad de las varianzas (no se muestra). Se realizó el análisis ANOVA de una vía para comprobar si también había diferencias entre las medias de las poblaciones, demostrando que si hay diferencias significativas entre las poblaciones (Tabla 13). La prueba de Tukey (Tabla 14) para analizar las diferencias entre los grupos muestra que C1 se diferencia del resto de poblaciones por su menor pendiente, siendo la población C4 la que alcanza mayores valores.

La prueba de Kruskal-Wallis aplicada a la pendiente de las poblaciones sometidas a tratamiento de oscuridad permite rechazar la hipótesis nula de que las poblaciones sean iguales. La población C2 está claramente diferenciada del resto, mostrando valores menores (Tabla 15).

Se aplicó nuevamente el test U de Mann-Whitney sobre los dos bloques de datos en base al tratamiento, aceptando que hay diferencias significativas entre el tratamiento luz y el tratamiento oscuridad en la variable de la pendiente (no se muestra).

Tabla 10. Resultados del test de Tukey de comparaciones múltiples aplicado a la variable de viabilidad de las esporas. POB., población; Dif. medias, diferencia de medias; Desv. Error, desviación del error; Sig., significación; Int. conf., intervalo de confianza.

(I) POB.	(J) POB	Dif. medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Int conf. 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	,091408	,028500	,009	,01723	,16558
	3	,101283	,030186	,006	,02272	,17984
	4	,109616	,032803	,006	,02424	,19499
2	1	-,091408	,028500	,009	-,16558	-,01723
	3	,009875	,029839	,987	-,06778	,08753
	4	,018208	,032484	,944	-,06633	,10275
3	1	-,101283	,030186	,006	-,17984	-,02272
	2	-,009875	,029839	,987	-,08753	,06778
	4	,008333	,033973	,995	-,08008	,09675
4	1	-,109616	,032803	,006	-,19499	-,02424
	2	-,018208	,032484	,944	-,10275	,06633
	3	-,008333	,033973	,995	-,09675	,08008

Tabla 11. Resultados del análisis ANOVA de una vía para los datos de germinación (tratamiento de luz). Sig., significación; gl, grados de libertad; SdC, suma de cuadrados; Mc, Media cuadrática.

	SdC	gl	Mc	F	Sig.
Entre grupos	,283	3	,094	9,292	,000
Dentro de grupos	,640	63	,010		
Total	,923	66			

Tabla 12. Resultados del test de Tukey de comparaciones múltiples aplicado a la variable de germinación (tratamiento de luz). POB., población; Dif. medias, diferencia de medias; Desv. Error, desviación del error; Sig., significación; Int. conf., intervalo de confianza.

(I) POB.	(J) POB	Dif. medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Int. conf. 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	,04795	,03229	,452	-,0373	,1332
	3	,12395	,03420	,003	,0337	,2142
	4	-,06939	,03716	,253	-,1675	,0287
2	1	-,04795	,03229	,452	-,1332	,0373
	3	,07600	,03380	,122	-,0132	,1652
	4	-,11733	,03680	,012	-,2145	-,0202
3	1	-,12395	,03420	,003	-,2142	-,0337
	2	-,07600	,03380	,122	-,1652	,0132
	4	-,19333	,03849	,000	-,2949	-,0918
4	1	,06939	,03716	,253	-,0287	,1675
	2	,11733	,03680	,012	,0202	,2145
	3	,19333	,03849	,000	,0918	,2949

Tabla 13. Resultados del análisis ANOVA de una vía para los datos de pendiente (tratamiento de luz). Sig., significación; gl, grados de libertad; SdC, suma de cuadrados; Mc, Media cuadrática.

	SdC	gl	Mc	F	Sig.
Entre grupos	62,764	3	20,921	20,679	,000
Dentro de grupos	63,737	63	1,012		
Total	126,501	66			

Tabla 14. Resultados del test de Tukey de comparaciones múltiples aplicado a la variable de pendiente (tratamiento de luz). POB., población; Dif. medias, diferencia de medias; Desv. Error, desviación del error; Sig., significación; Int. conf., intervalo de confianza.

(I) POB	(J) POB	Dif. medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Int. conf 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-1,91	,322	,000	-2,76	-1,06
	3	-2,10	,341	,000	-3,01	-1,20
	4	-2,44	,370	,000	-3,42	-1,46
2	1	1,91	,322	,000	1,06	2,76
	3	-,194	,337	,939	-1,08	,695
	4	-,526	,367	,484	-1,49	,442
3	1	2,10	,341	,000	1,20	3,01
	2	,194	,337	,939	-,695	1,08
	4	-,331	,384	,823	-1,34	,681
4	1	2,44	,370	,000	1,46	3,42
	2	,526	,367	,484	-,442	1,49
	3	,331	,384	,823	-,681	1,34

Tabla 15. Resultados obtenidos de la prueba de Kruskal-Wallis sobre la variable pendiente entre poblaciones con tratamiento de oscuridad. Códigos de las poblaciones según la Tabla 1. Desv. Est., Desviación del estadístico.

Muestra 1-	Estadístico de contraste	Error	Desv. Est. de contraste	Sig.	Sig. Ajust.
...					
2-4	-27,067	7,115	-3,804	,000	,001
2-3	-28,900	6,535	-4,422	,000	,000
2-1	41,084	6,242	6,582	,000	,000
4-3	1,833	7,441	0,246	,805	1,000
4-1	14,018	7,185	1,951	,051	,306
3-1	12,184	6,611	1,843	,065	,392

## DISCUSIÓN

Este trabajo pretende determinar si existe relación entre la *fitness* de las poblaciones de *Culcita macrocarpa* (medida como la viabilidad, capacidad de germinación y velocidad de germinación de las esporas) y el tamaño poblacional, para obtener conclusiones aplicables a posibles proyectos de conservación y recuperación de la especie. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de la existencia de diferencias significativas de *fitness* entre las poblaciones, si bien no se aprecia en todos los casos una relación entre las variables estudiadas y el tamaño poblacional (e.g. Fig.10; Tabla 14).

Los métodos de conservación *ex-situ* en helechos amenazados como *Culcita macrocarpa* ofrecen dificultades específicas diferentes al resto de plantas vasculares (Ibars & Estrelles, 2012). Las esporas suelen presentar menor durabilidad que las semillas, y el carácter dual del ciclo de vida supone un desafío adicional (Goller & Rybczynski, 2007). Asimismo, el carácter haploide de los gametófitos y su elevada tasa de autofecundación hace que a menudo los helechos presenten altos niveles de homocigosidad, lo que afecta a la *fitness* de la especie, principalmente en su fase de protalo (Ranker & Haufler, 2008). Nuestros datos para *C. macrocarpa* muestran, a nivel general, valores bajos de viabilidad de las esporas, que oscilan entre el 57% y el 68%. Si bien no hemos encontrado datos en la bibliografía referidos a otras Dicksoniaceae (o Cyaetales), en algunas especies de los géneros *Dryopteris* y *Polystichum*, pertenecientes a la F. Dryopteridaceae, la viabilidad alcanza el 90% (Catala et al., 2009). Los bajos valores observados en *Culcita* podrían deberse al menor nivel de diversidad genética para esta especie (Quintanilla et al., 2007) motivado por la reducción de las poblaciones (Rodríguez-Gutián et al., 2012). Por otro lado, el impacto de la baja variabilidad genética en la *fitness* no está claro en las Cyaetales, en las que esta disminución dentro y entre las poblaciones deriva, cuando menos parcialmente, de su sistema reproductivo (Quintanilla et al., 2005; Denton-Giles, 2006).

En lo que se refiere al porcentaje de germinación en las esporas viables, éste es normalmente muy alto en las poblaciones, oscilando entre el 73% y el 92% en el tratamiento de luz y entre el 90% y el 98% en el tratamiento de oscuridad. La velocidad de germinación (representada en este estudio por la variable pendiente) es coherente con los resultados del porcentaje de germinación. Así mismo, nuestros datos son semejantes a lo observado en otros helechos moniliformes (Superclase Moniliformopses), entre ellos *Culcita macrocarpa* (e.g. Quintanilla et al., 2002; Catala et al., 2009).

La diferencia entre los tratamientos coincide con lo observado por otros investigadores. Así, Quintanilla et al. (2002) ya apreció un aumento en el porcentaje de germinación tras un periodo de conservación húmeda en oscuridad para diversas especies. Nuestros resultados confirman que la conservación húmeda de las esporas de helechos es una herramienta prometedora para su conservación *ex situ*. Si bien no se han dilucidado las causas fisiológicas de este comportamiento, diversos autores han señalado que la conservación en oscuridad permite recrear las condiciones propias del suelo de las zonas húmedas (Ballesteros, 2011). Esto puede ser especialmente relevante para *C. macrocarpa* dadas las características ambientales de alta humedad en las que se desarrollan sus poblaciones (Tabla 3).

Los análisis de comparación entre poblaciones han señalado la existencia de diferencias significativas entre ellas para todas las variables de la *fitness*. Dada la baja diversidad genética encontrada hasta el momento en *C. macrocarpa* (Quintanilla et al., 2007), el empleo de parámetros de la *fitness* resulta lógico a la hora de recolectar esporas para un posible proyecto de recuperación de poblaciones. En el caso de la viabilidad, la población con mayores valores será la C1, una población de gran tamaño (alrededor de 3000 individuos; Betancourt, 2018) situada en el Parque Natural de As Fragas do Eume. Para el porcentaje de germinación, las poblaciones C1 y C4 (población de pequeño tamaño también situada en el Parque Natural das Fragas do Eume)

mostraron los mayores valores tanto en el tratamiento de luz como el de oscuridad (la población C3 también muestra altos valores en oscuridad; Fig. 10).

En lo que se refiere a la pendiente, los valores máximos en el tratamiento de luz se alcanzan en la población C4, siendo en este caso la población C1 la que ofrece una menor pendiente. En el tratamiento de oscuridad, los análisis realizados únicamente permiten observar que los valores menores corresponden a la población C2. Es interesante que esta población (Seixo de Landoi), a pesar de ser la más grande de las estudiadas, presenta siempre resultados bajos para todas las variables de la *fitness*. En todo caso, en nuestro análisis no hemos detectado una relación positiva entre el tamaño poblacional y la *fitness* medida en las esporas. Varias hipótesis podrían justificar los resultados observados. En primer lugar, es importante considerar la amplia capacidad de dispersión de los helechos a través de sus esporas (e.g. Ranker & Haufler, 2008). Eso podría justificar que los distintos núcleos poblacionales de *C. macrocarpa* en el Parque Natural das Fragas do Eume y otros valles próximos como el Valle del Xubia son en realidad subpoblaciones de una población de gran tamaño donde el entrecruzamiento es frecuente. Los núcleos de Seixo de Landoi (C2) y Ambosores (C3) están más aislados frente a poblaciones próximas. La alta prevalencia de la autofecundación y la reproducción asexual en estas poblaciones podría desembocar en una reducción de la *fitness*. Esta teoría podría contradecirse con la casi nula variabilidad genética detectada en las poblaciones gallegas de *C. macrocarpa* por Quintanilla et al. (2007). Sin embargo, hay que destacar que el estudio antes citado se realizó con isoenzimas, una técnica mucho menos eficiente que otras disponibles actualmente para analizar la variabilidad en especies no modelo (e.g. Davey & Blaxter, 2010). Una teoría alternativa podría ser que, dadas las diferencias relativamente menores observadas, los resultados podrían deberse a la distinta fecha en la que se recogieron las esporas en las distintas poblaciones (si bien se tomaron medidas para la recolección estandarizada de las esporas, ver Material y Métodos). Sería necesario analizar más poblaciones y repetir el estudio varios años para llegar a conclusiones más firmes.

Uno de los objetivos trazados en este trabajo era analizar la utilidad de nuestros resultados a la hora de realizar una selección de poblaciones para la recolección de germoplasma. A este respecto podemos decir que, dado el gran número de esporas producidas por estas plantas, la viabilidad de las esporas difícilmente será uno de los factores limitantes para la selección (considerando la magnitud de las diferencias observadas entre las poblaciones). Sin embargo, nuestro trabajo nos permitiría recomendar las poblaciones C1 y C4 para la obtención de las esporas.

En el contexto de esta discusión, procede introducir los problemas detectados a lo largo de la realización del trabajo, y que podrán ser corregidos en el futuro. Uno de los problemas fue la completa falta de normalidad de los datos obtenidos en el tratamiento de oscuridad (Fig. 12), en el que en apenas unos días el porcentaje de germinación llegaba prácticamente al 100%. En futuras repeticiones del experimento será preciso tomar datos en intervalos menores de tiempo, para poder captar la evolución de la población de esporas. Otra de las complicaciones observadas fue la dificultad de extender las esporas en el medio por su carácter hidrófobo. Una posible solución sería la adición de una pequeña cantidad de Tween a la mezcla agua-esporas antes del sembrado. Esta solución ya se ha puesto en marcha y se utiliza también en la multiplicación *in vitro* de otros helechos (Denton-Giles, 2006). La no dispersión de las esporas, que ocurrió en varias de las siembras realizadas, puede ser problemática en los estudios de germinación, ya que diversos autores (e.g. Ashcroft & Sheffield, 2000; Suo et al., 2015) señalan que concentraciones muy altas o muy bajas pueden inhibir la germinación.

## CONCLUSIONES

-Con los datos obtenidos podemos afirmar que existen diferencias significativas entre las poblaciones de *C. macrocarpa*, no obstante, estas diferencias no parecen estar influenciadas por el tamaño poblacional. Será necesario investigar la influencia en la *fitness* de otros factores como la conectividad de las poblaciones, su estado fisiológico y su diversidad genética.

-El tratamiento en oscuridad produce un aumento del porcentaje y velocidad de germinación de las esporas. Nuestro estudio confirma que esta práctica puede ser beneficiosa en proyectos de conservación y propagación de *C. macrocarpa* y otros helechos amenazados.

-Los resultados obtenidos con este estudio pueden ser útiles para seleccionar poblaciones de *C. macrocarpa* para posibles proyectos de recuperación. La viabilidad de las esporas parece ser más determinante que las variables relacionadas con la germinación que son altas para todas las poblaciones. Las poblaciones C1 y C4 de Fragas do Eume son, a priori, las más adecuadas para la recolección de esporas.

## CONCLUSIONS

-There are significant differences among the populations of *C. macrocarpa*. Nevertheless, these differences do not seem to be affected by population size. Parameters such as populations connectivity, physiological state and genetic diversity should also be considered as affecting *fitness*.

-Pre-culturing spores in darkness produces an increase in spore germination (percentage and rate). Our study confirms that this practice can be beneficial in conservation and propagation projects for *C. macrocarpa* and other threatened ferns.

-Our results can be useful to select *C. macrocarpa* populations for possible recovery projects. Spore viability seems to be more important than spore germination percentage and rate, since these variables are high in all populations. Populations C1 and C4 from Fragas do Eume are, *a priori*, the most suitable for spore collection.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arce Duarte, J. M. & Fernández Tomás, J. (1976). *Mapa geológico de España E. 1:50000: Vivero*. [Mapa] Madrid: Instituto Geológico y Minero de España.
- Ashcroft, C. J. & Sheffield, E. (2000). The effect of spore density on germination and development in *Pteridium*, monitored using a novel culture technique. *American Fern Journal*, 90(3), 91–99.
- Ballesteros, D. (2011). Conservation of fern spores. In *Working with Ferns* (pp. 165-172). Springer, New York, NY.
- Ballesteros, D., Estrelles, E., Walters, C., & Ibars, A. M. (2012). Effects of temperature and desiccation on ex situ conservation of nongreen fern spores. *American journal of botany*, 99(4), 721–729.
- Bañares, Á., Blanca, G., Güemes, J., Moreno, J. C., & Ortiz, S. (Eds.) (2006). *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España*. Madrid: TRAGSA.
- Bateman, R. M., & DiMichele, W. A. (1994). Heterospory: the most iterative key innovation in the evolutionary history of the plant kingdom. *Biological Reviews*, 69(3), 345–417.
- Bertorelle, G., Bruford, M. W., Hauffe, H. C., Rizzoli, A., & Vernesi, C. (2009). *Population genetics for animal conservation*. Cambridge: Cambridge university press.
- Betancourt, Z. (2018). *Descripción, caracterización del biotopo e identificación de amenazas de los núcleos poblacionales de la especie de helecho Culcita macrocarpa, relicto macaronésico del Parque Natural Fragas do Eume* (Trabajo de Fin de Máster). Universidade da Coruña, Galicia.
- Brummit, N., Aletrari, E., Syfert, M. M. & Mulligan, M. (2016). Where are threatened ferns found? Global conservation priorities for pteridophytes. *Journal of systematics and evolution*, 54(6), 604–616.
- Calvo de Anta R. & Macías Vázquez, F. (2000). *Mapa de solos de Galicia. Pontedeume*. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia.
- Calvo de Anta R. & Macías Vázquez, F. (2000b). *Mapa de solos de Galicia. Ortigueira*. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia.
- Calvo de Anta R. & Macías Vázquez, F. (2000c). *Mapa de solos de Galicia. Viveiro*. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia.
- Carballeira, A., Devesa, C., Retuerto, R., Santillán, E. & Uceda, F. (1983). *Bioclimatología de Galicia*. A Coruña: Fundación Pedro Barrié de la Maza.
- Castroviejo, S., Laínz, M., López González, G., Montserrat, P., Muñoz Garmendia, F., Paiva, J. & Villar, L. (Eds.) (1986). *Flora Ibérica Vol. I Lycopodiaceae-Papaveraceae*. Madrid: Real Jardín Botánico.
- Catala, M., Esteban, M., Rodríguez-Gil, J. L., & Quintanilla, L. G. (2009). Development of a naturally miniaturised testing method based on the mitochondrial activity of fern spores: a new higher plant bioassay. *Chemosphere*, 77(7), 983–988.

- Davey, J. W., & Blaxter, M. L. (2010). RADSeq: next-generation population genetics. *Briefings in functional genomics*, 9(5-6), 416–423.
- Decreto 88/2007 do 19 de abril, polo que se regula o Catálogo galego de especies ameazadas, DOG núm. 89 (2007).
- Denton-Giles, M. (2006). *Reproduction in selected New Zealand native ferns and their suitability for revegetation: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Masters of Science in Plant Biology at Massey University, Palmerston North, New Zealand* (Tesis doctoral) Massey University, Nueva Zelanda.
- Directiva 92/43/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1992, relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres, DOCE núm 206 (1992).
- Dyer, A. F. (1983). Fern gametophytes in culture—a simple system for studying plant development and reproduction. *Journal of Biological Education*, 17(1), 23–39.
- Estrelles, E. (2004). Gestión de un banco de Esporas de Pteridófitos: II. Propagación. *Jornadas de Propagación Vegetal*. Granada.
- Fernández Pompa, F. & Fernández Martínez, F. (1977). *Mapa geológico de España E. 1:50000: Cariño* [Mapa] Madrid: Instituto Geológico y Minero de España.
- Fernández Pompa, F. & Monteserrín López, V. (1976). *Mapa geológico de España E. 1:50000: Cedeira* [Mapa] Madrid: Instituto Geológico y Minero de España
- Frey, W. (2009). *Syllabus of Plant Families, Bryophytes and seedless Vascular Plants*. Borntraeger
- Gabriel y Galán, J. M. & Prada, C. (2011). Pteridophyte spores viability. In *Working with Ferns* (pp. 193–205). Springer, New York, NY.
- Goller, K., & Rybczynski, J. J. (2007). Gametophyte and sporophyte of tree ferns in vitro culture. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 76(3), 193–199.
- Ibars, A. M., & Estrelles, E. (2012). Recent developments in ex situ and in situ conservation of ferns. *Fern Gazette*, 19(3), 67–86.
- Korall, P., Conant, D. S., Metzgar, J. S., Schneider, H., & Pryer, K. M. (2007). A molecular phylogeny of scaly tree ferns (Cyatheaceae). *American Journal of Botany*, 94(5), 873–886.
- Nabors, M. W. (2006). *Introducción a la Botánica*. Madrid, España, 267–278.
- Orr, H. A. (2009). Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nature Reviews Genetics*, 10(8), 531–539.
- Peinado-Lorca M. & Rivas-Martínez, S. (1987). *La vegetación de España*. Alcalá de Henares: Universidad de Alcalá de Henares.
- Quintanilla, L. G., & Escudero, A. (2006). Spore fitness components do not differ between diploid and allotetraploid species of Dryopteris (Dryopteridaceae). *Annals of Botany*, 98(3), 609–618.
- Quintanilla, L. G., Amigo, J., Pangua, E., & Pajarón, S. (2002). Effect of storage method on spore viability in five globally threatened fern species. *Annals of Botany*, 90(4), 461–467.

- Quintanilla, L. G., Amigo, J., Pangua, E., & Pajarón, S. (2002b). Análisis biogeográfico de la pteridoflora de la sierra de la Capelada (La Coruña, España). *Lazaroa*, 23, 17–24.
- Quintanilla, L. G., De Soto, L., Jiménez, A., & Méndez, M. (2007). Do antheridiogens act via gametophyte size? A study of *Woodwardia radicans* (Blechnaceae). *American journal of botany*, 94(6), 986–990.
- Quintanilla, L. G., Pajarón, S., Pangua, E., & Amigo, J. (2000). Effect of temperature on germination in northernmost populations of *Culcita macrocarpa* and *Woodwardia radicans*. *Plant Biology*, 2(06), 612–617.
- Quintanilla, L. G., Pangua, E., Amigo, J., & Pajarón, S. (2005). Comparative study of the sympatric ferns *Culcita macrocarpa* and *Woodwardia radicans*: sexual phenotype. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 200(2), 187–194.
- Ranker, T. A., & Haufler, C. H. (2008). *Biology and evolution of ferns and lycophytes*. Cambridge University Press.
- Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas, BOE núm. 46 (2011).
- Rodríguez Guitián, M. A., Ferreiro da Costa, J., Ramil Rego, P., & Lijó Pose, G. (2012). Caracterización ambiental, demografía y amenazas para su conservación de la población lucense de " *Culcita macrocarpa*" C. Presl.(NW ibérico). *Recursos Rurales*, 7: 15–25.
- Rueda, M., Saiz, J. C. M., Morales-Castilla, I., Albuquerque, F. S., Ferrero, M., & Rodríguez, M. Á. (2015). Detecting fragmentation extinction thresholds for forest understory plant species in Peninsular Spain. *PloS one*, 10(5), e0126424.
- Sessa, E. B., Testo, W. L., & Watkins, J. E. (2016). On the widespread capacity for, and functional significance of, extreme inbreeding in ferns. *New Phytologist*, 211(3), 1108–1119.
- Suo, J., Chen, S., Zhao, Q., Shi, L. & Dai, S. (2015). Fern spore germination in response to environmental factors. *Frontiers in biology*, 10(4), 358–376.
- Verma, S. C. (2001). Genetic implications of diversity in gametophyte biology and isolate potential of homosporous ferns. *Phytomorphology*, 51, 33–39.