



UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
Facultade de Ciencias



**MBio**  
Máster en Biodiversidade Terrestre  
Caracterización, Conservación e Xestión

**Estudio de las comunidades vegetales y la  
*fitness* del helecho amenazado *Culcita  
macrocarpa* C. Presl en el norte de España**

**Eva Fernández Martínez**

**Julio 2021**





Departamento de Bioloxía  
Área de Botánica

**Estudio de las comunidades vegetales y la *fitness* del  
helecho amenazado *Culcita macrocarpa* C. Presl en el  
norte de España**

Trabajo de Fin de Máster presentado por la alumna del Máster Interuniversitario en  
Biodiversidad Terrestre: Caracterización, Conservación y Gestión Eva Fernández Martínez  
bajo la supervisión de Manuel Pimentel Pereira y Elvira Sahuquillo Balbuena

A Coruña, julio de 2021

Fdo. Manuel Pimentel Pereira

Fdo. Elvira Sahuquillo Balbuena



# ÍNDICE

RESUMEN / RESUMO / ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y MÉTODOS	
1.- Poblaciones estudiadas y recolección de esporas	9
2.- Caracterización de las poblaciones	10
3.- Análisis de las comunidades vegetales	12
4.- Estudio de la <i>fitness</i> reproductiva de <i>C. macrocarpa</i>	14
RESULTADOS	
1.- Análisis de las comunidades vegetales	17
2.- Estudio de la <i>fitness</i> reproductiva de <i>C. macrocarpa</i>	25
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	36
ANEXO	39



## RESUMEN

*Culcita macrocarpa* (Familia Dicksoniaceae), helecho relicto ibero-macaronésico, se encuentra catalogado por diversas normativas como “*en peligro de extinción*” debido a la fragmentación de su hábitat. En este trabajo pretendemos (i) caracterizar las comunidades vegetales y (ii) determinar las posibles diferencias en la *fitness* entre once poblaciones del norte de la Península Ibérica. Se realizaron inventarios florísticos para el análisis de los diferentes espectros (florístico, corológico, biológico, de polinización y de dispersión de las diásporas) y de la diversidad  $\alpha$  (riqueza específica, índice de Simpson) y  $\beta$  (índice de Jaccard) de las localidades. Se obtuvieron esporas en las poblaciones de Galicia, Asturias, Cantabria y Euskadi con las que se realizaron germinaciones *in vitro* para obtener los porcentajes de viabilidad, germinación máxima y velocidad de germinación. Se registraron un total de 79 especies pertenecientes a 47 familias; y la riqueza específica de los inventarios es de  $21 \pm 4$  especies, con valores del índice de Simpson cercanos a 0. El análisis de Jaccard muestra una separación entre las poblaciones occidentales (Galicia y Asturias) frente a las orientales (Cantabria y Euskadi). El análisis de la *fitness* mostró diferencias significativas entre los grupos, obteniendo porcentajes altos de viabilidad y germinación.

**PALABRAS CLAVE:** *Culcita macrocarpa*, diversidad vegetal, *fitness*, germinación

## RESUMO

*Culcita macrocarpa* (Familia Dicksoniaceae), feito relicto ibero-macaronésico, atópase catalogado por diversas normativas como “*en perigo de extinción*” debido á fragmentación do seu hábitat. Neste traballo pretendemos (i) caracterizar as comunidades vexetais e (ii) determinar as posibles diferenzas na *fitness* entre once poboacións do norte da Península Ibérica. Realizáronse inventarios florísticos para a análise dos diferentes espectros (florístico, corolóxico, biolóxico, de polinización e de dispersión das diásporas) e da diversidade  $\alpha$  (riqueza específica, índice de Simpson) e  $\beta$  (índice de Jaccard) das localidades. Obtivéronse esporas nas poboacións de Galicia, Asturias, Cantabria e Euskadi coas que se realizaron xermolacións *in vitro* para obter as porcentaxes de viabilidade, xermolación máxima e velocidade de xermolación. Rexistráronse un total de 79 especies pertencentes a 47 familias; e a riqueza específica dos inventarios é de  $21 \pm 4$  especies, con valores do índice de Simpson preto de 0. A análise de Jaccard amosa unha separación entre

as poboacións occidentais (Galicia e Asturias) fronte ás orientais (Cantabria e Euskadi). A análise da *fitness* mostrou diferenzas significativas entre os grupos, obtendo porcentaxes altos de viabilidade e xermolación.

**PALABRAS CLAVE:** *Culcita macrocarpa*, diversidade vexetal, *fitness*, xermolación

## ABSTRACT

*Culcita macrocarpa* (Dicksoniaceae), an ibero-macaronesian relict fern, is catalogued as “endangered” in many jurisdictions due to habitat fragmentation. Here, we intend to (i) analyse the plant communities that harbour this species in northern Spain and (ii) determine if there are differences in *fitness* among eleven populations from the region. Vegetation was studied using taxonomic inventories and spectra (floristic composition, chorology, life form, pollination and seed dispersal),  $\alpha$  diversity (specific richness, Simpson index) and  $\beta$  diversity (Jaccard index) in all populations. Spores were obtained from populations in Galicia, Asturias, Cantabria and Basque Country. *In vitro* germination assays were conducted with the collected spores, and three parameters related to the reproductive *fitness* of spores and gametophytes were considered (viability, germination percentage and germination speed). Overall, 79 species belonging to 47 families were registered in the floristic inventories. The average taxonomic richness detected was  $21 \pm 4$  species, with Simpson index values being close to 0. The Jaccard analysis showed a clear separation between the western (Galicia and Asturias) and eastern (Cantabria and Euskadi) populations. The *fitness* assay showed significant differences for all parameters across all populations, and high percentages of viability and germination were obtained.

**KEYWORDS:** *Culcita macrocarpa*, *fitness*, germination, plant diversity.



## INTRODUCCIÓN

Los helechos están considerados como el primer grupo de plantas vasculares que colonizaron el medio terrestre, y dada su antigüedad agrupan distintos linajes, muchos de ellos extintos (Frey, 2009). Dentro de su diversidad, los helechos presentan un ciclo vital constante y muy característico dentro de dos grandes categorías, las especies isospóreas y las heterospóreas. En todos los casos, la reproducción sexual requiere dos generaciones, gametófito y esporófito, de vida independiente (diplobiónticos). El gametófito, haploide, tiene estructura talosa (prótalo), y produce gametos masculinos flagelados en los anteridios (gametangios masculinos). Éstos son liberados al exterior y necesitan agua para desplazarse y alcanzar el arquegonio (gametangio femenino), donde se produce una fecundación parcialmente interna. La generación gametofítica y su éxito reproductivo precisan de unas condiciones de humedad ambiental muy específicas y altamente variables entre unas especies y otras (Bateman & DiMichelle, 1994). Si bien existen diversos modelos de desarrollo del gametófito (Nayar & Kaur, 1971), en todos los casos, dentro de los helechos isospóreos, la determinación del sexo en los prótalos será fundamentalmente ambiental (Tanaka *et al.*, 2014).

Por su parte, el esporófito, diploide, es un cormófito de vida a menudo larga y que, en algunos casos, puede alcanzar un porte arbóreo (Frey, 2009; Fig. 1). La naturaleza dual del ciclo de los helechos es decisiva para explicar la adaptación y la supervivencia de estas especies en los ambientes que ocupan, y constituye un factor limitante para la reproducción sexual en ambientes secos (Ranker & Haufler, 2008). Los planes de conservación de las especies de estos grupos deberán considerar la estructura del ciclo de vida, ya que las posibles alteraciones ambientales no afectarán igualmente a ambas fases (Pittermann *et al.*, 2013).

*Culcita macrocarpa* C Presl. (Clase Polypodiopsida, Orden Cyatheales, Familia Dicksoniaceae) es un helecho isospóreo de gran tamaño y perteneciente a la Geoflora Paleotropical de óptimo subtropical y origen terciario. Esta flora se desarrolló durante el Paleógeno y el Neógeno temprano en latitudes medias y bajas del hemisferio norte, incluyendo las regiones circum-mediterráneas (Patiño *et al.*, 2016). En la actualidad, se encuentra restringida a zonas de clima templado o subtropical que actuaron como refugio durante las Glaciaciones del Cuaternario, fundamentalmente la Macaronesia, las Penínsulas e Islas Mayores del Mediterráneo y zonas del N de África. Si bien existe discusión sobre la

antigüedad y el origen de los distintos elementos que componen la Geoflora Paleotropical (e.g. Kondraskov *et al.*, 2015), sí existe un consenso referido a su carácter relíctico y a la necesidad de establecer medidas que garanticen su conservación en un contexto de cambio global (e.g. Quintanilla *et al.*, 2002b; Mairal *et al.*, 2018).

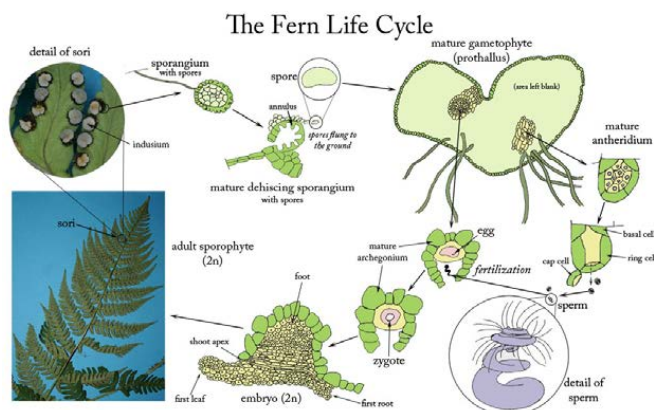


Figura 1. Ciclo vital digenético de un helecho isosporo (M.N. Sashital. New York Botanical Gardens)

*Culcita macrocarpa* presenta una distribución más restringida con respecto a otros elementos de la flora paleotropical; crece únicamente a lo largo de la Península Ibérica (principalmente en la zona Atlántica con poblaciones en el norte de Portugal, Galicia, Asturias, Euskadi y en Cádiz) y en la Macaronesia [Islas Canarias (Tenerife), Açores y Madeira] (Fig. 2). Si bien este helecho es considerado relicto en toda su área de distribución, estudios recientes no descartan la hipótesis de una recolonización posterior en algunas de sus poblaciones (Ben-Menni Schuler, 2019).

*Culcita macrocarpa* presenta un porte subarborescente-rastrero con un rizoma grueso y cubierto de páleas filiformes. Las frondes pueden llegar a medir hasta 3m y en el borde de estas se desarrollan los soros reniformes (Castroviejo *et al.*, 1986-2012), característicos de esta especie (Fig. 3). *C. macrocarpa* produce esporas recalcitrantes, esto quiere decir que son altamente sensibles a la pérdida de humedad lo que provoca una fuerte reducción de su viabilidad (Ballesteros *et al.*, 2012). Todas estas características limitan la amplitud ecológica de la especie a zonas umbrófilas cercanas a cauces de ríos, donde existe una alta humedad ambiental (Bañares *et al.*, 2004). Durante el desarrollo gametofítico aparecen primero los anteridios (gametangios masculinos) y posteriormente los arquegonios (Quintanilla *et al.*, 2005) favoreciendo la autogamia (Verma, 2001).

Sus particularidades biológicas y su vulnerabilidad ante los cambios ambientales hacen que, actualmente, existan 598 especies de helechos incluidos en alguna de las categorías de la Lista Roja y cerca de un 40% (225 especies) en alguna de las tres categorías de especies amenazadas ([www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org), 2021). *C. macrocarpa* se encuentra dentro de la categoría de “Casi Amenazado” a nivel global según la IUCN debido a amenazas como la fragmentación en la distribución de la especie y la fragilidad de su hábitat.



Figura 2. Mapa de distribución de *C. macrocarpa* ([www.anthos.es](http://www.anthos.es). Accedido el 23 de junio de 2021)

A nivel europeo, se encuentra incluida en el Anexo II de la Directiva Hábitats (Directiva 92/43/CEE del Consejo), donde se detallan las especies animales y vegetales de interés comunitario y que precisan la designación de zonas especiales de conservación. La transposición estatal de esta ley se encuentra en la actual Ley 42/2007, de 13 de diciembre, dónde se recoge el Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial (LESRPE) que incluye el Catálogo Español de Especies Amenazadas (CEEa). *C. macrocarpa* se encuentra incluida en el LESRPE, pero no en el CEEa.

A nivel autonómico, esta especie se encuentra dentro de los catálogos de Especies Amenazadas como “*En Peligro de Extinción*” en tres Comunidades Autónomas: Galicia (Decreto 88/2007, de 19 de abril), Cantabria (Decreto 120/2008, de 4 de diciembre) y País Vasco (Decreto Legislativo 1/2014, de 15 de abril). En el Catálogo Regional de Especies Amenazadas de la Flora del Principado de Asturias (Decreto 65/1995, de 27 de abril) describe otras dos categorías para las especies amenazadas (“*plantas sensibles a la alteración del hábitat*” y “*plantas de interés especial*”), incluyendo *C. macrocarpa* en la segunda. Finalmente, *C. macrocarpa* es considerada como especie “en peligro” en el *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España* desde su primera edición (Bañares *et al.*, 2004). Asimismo, está incluida como especie “críticamente em perigo” en

la *Lista Vermelha da Flora Vasculare de Portugal Continental* (<https://listavermelha-flora.pt/>).



Figura 3. Frondes de un individuo maduro de *C. macrocarpa* (foto: Eva Fernández)

Las principales amenazas que recaen sobre las poblaciones del norte de España son aquellas relacionadas con el hábitat, desde la expansión de explotaciones forestales y plantaciones de especies exóticas hasta alteraciones hidrológicas o incendios (Bañares *et al.*, 2004). El aumento de las temperaturas incrementa la sequedad ambiental, lo que supone un grave problema para las especies ligadas a zonas con humedad ambiental como los pteridófitos (Ballesteros *et al.*, 2012). El cambio climático pone en cuestión la conservación de las poblaciones en su área actual de distribución, o cuando menos su capacidad de llevar a cabo la reproducción sexual (Bueno Sánchez *et al.*, 2017). Cualquier plan de recuperación o conservación de una especie, ya sea mediante la conservación del hábitat en el que se encuentra (*in-situ*) como en bancos de germoplasma (*ex-situ*), requiere un conocimiento preciso de su biología reproductiva y de las fases críticas en su desarrollo. En el caso de los helechos, la fase más problemática de su ciclo vital ocurre desde la liberación de las esporas hasta el momento en que se realiza la fecundación en los protalos (Goller & Rybczynski, 2007). Esto obliga a desarrollar estrategias para una correcta recolección y conservación de las esporas, así como un conocimiento del desarrollo gametofítico (Denton-Giles, 2006). El ciclo vital de *C. macrocarpa* es, además, especialmente complicado debido a su lento desarrollo, tanto de la fase gametofítica como la esporofítica (en otras especies de pteridófitos, como *Athyrium filix-femina*, los gametófitos completan su ciclo vital en 3 meses, observación personal). El éxito reproductivo de los gametófitos será una dimensión importante de la *fitness* de las especies de helechos, y *Culcita macrocarpa* no es una excepción en este sentido. Entendiendo por *fitness* el conjunto de características necesarias para la reproducción y/o supervivencia de los organismos dentro de una población, considerándose dos componentes de la misma la viabilidad y la fertilidad (Sober, 2001).

La mayor parte de las amenazas que afectan a *C. macrocarpa* tienen impacto directo sobre el propio hábitat y junto con las características propias ya mencionadas, este hecho precisa de un ecosistema estable en cuanto a condiciones de temperatura, sombra y humedad ambiental (Sharpe & Mehltreter, 2010). Por ello es necesario caracterizar las especies que conforman su comunidad, responsables de esas condiciones (Ordóñez et al., 2003, Brummitt et al., 2016).

En este trabajo se pretende completar estudios anteriores sobre la variación de los valores de la *fitness* en *C. macrocarpa* a lo largo de su rango de distribución en el norte de la Península Ibérica, así como valorar el estado de conservación de su hábitat mediante el análisis detallado de la vegetación. Los resultados recogidos en este estudio podrán ayudar a futuros proyectos de conservación *in-situ* y *ex-situ* de la especie.

## **OBJETIVOS**

La hipótesis de partida del presente estudio es la existencia de diferencias entre las distintas poblaciones de *C. macrocarpa* del norte de España, asociadas al tamaño poblacional o a las particulares condiciones ambientales. Esas diferencias pueden ser tanto a nivel de su biología como del ecosistema en el que se encuentran. Para ello se plantean diferentes cuestiones:

- ¿Existen realmente diferencias tanto en la composición como en la estructura de las comunidades vegetales en las que se desarrolla *C. macrocarpa* en el N de la Península Ibérica?
- ¿Cuáles serían los factores que provocan las diferencias (si existen) en los parámetros de la *fitness*?
- ¿Cómo afecta a la capacidad de germinación de la spora su conservación a menos 20°C durante un periodo limitado de tiempo?

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Poblaciones estudiadas y recolección de las esporas**

La selección de las poblaciones se realizó en base a la información existente sobre su tamaño poblacional y diversidad genética (Ben-Menni Schuler, 2019; Betancourt, 2018),

intentado cubrir todo su rango de distribución en el norte de la Península Ibérica. En total se seleccionaron 11 poblaciones: 4 en Galicia, 2 en Asturias, 2 en Cantabria y 3 en País Vasco (Tabla 1, Fig. 4). En cada una de ellas se llevaron a cabo tres actividades a lo largo de enero y febrero de 2020 (Tabla 2): (i) realización de inventarios florísticos en cada población; (ii) estimación “*in situ*” del número de individuos intentando realizar una clasificación por edades en base al tamaño de la fronde; y (iii) recolección de trozos de frondes con soros maduros para la extracción de espora en el laboratorio según el procedimiento descrito en Fernández Martínez (2019).



Figura 4. Mapa de las once poblaciones estudiadas de *C. macrocarpa* a lo largo del norte de la península Ibérica.

## 2. Caracterización de las poblaciones

La caracterización ambiental de las poblaciones se realizó recopilando información sobre la estructura poblacional, las comunidades vegetales en las que se desarrolla, el clima y la edafología obtenidas tanto de fuentes bibliográficas como de datos recogidos en campo.

Relacionado con la estructura poblacional se han realizado censos “*in situ*” de tamaños poblacionales, aunque hay que tener en cuenta: (i) la dificultad de diferenciar entre individuos y (ii) la gran extensión que alcanzan algunas de las poblaciones de *C. macrocarpa*. Los datos obtenidos nos permitieron clasificar las poblacionales en tres categorías: población grande aquellas con más de 500 individuos; mediana las que tienen entre 10 y 100 individuos; y pequeña con menos de 10 individuos. También se han utilizado los datos genéticos de riqueza clonal (genR, tabla 5, anexo) y de diversidad genotípica (genL, tabla 5, anexo) (Ben-Menni Schuler, 2019).

Otros datos recogidos durante las visitas fueron la altitud (tabla 1) y la geolocalización de los individuos recogidos para la obtención de esporas, así como diferentes coordenadas del perímetro para obtener mediante herramientas de GIS (QGIS 3.12) la superficie ocupada por las poblaciones. Con estas mismas herramientas también se calculó la distancia al mar de cada una de ellas (tabla 4, anexo) por ser una de las características que influyen sobre la amplitud térmica junto con la elevación (Quintanilla *et al.*, 2000).

Con los datos de las comunidades vegetales, tras la realización de los inventarios florísticos, se categorizaron las poblaciones según su estado de conservación basándose en el número de especies alóctonas presentes: hábitats bien conservados (A) con 0 especies alóctonas; hábitats en proceso de degradación que presentan 1 o 2 especies; y hábitats mal conservados con 3 o 4 especies alóctonas (tabla 5, anexo). Esta es una característica relevante, ya que dos de las amenazas que afectan a *C. macrocarpa* son la fragmentación del hábitat y la presencia de especies alóctonas, como los eucaliptos, que encuentran en este tipo de bosques su hábitat ideal (Quintanilla *et al.*, 2002a).

Todas las poblaciones se encuentran en el piso Mesotemplado de la Región Eurosiberiana, según la clasificación bioclimática de Rivas-Martínez (Rivas Martínez *et al.*, 2004), presentando un clima hiperoceánico submediterráneo las poblaciones gallegas y asturianas (de la C01 a la C06) y oceánico las de Cantabria y País Vasco (de la C07 a C11). Para una caracterización climática más precisa, se han utilizado las 19 variables bioclimáticas y la incidencia de radiación solar (tablas 2 y 3, anexo) descargadas de WorldClim ([www.worldclim.org](http://www.worldclim.org), tabla 1, anexo), que ofrece información en formato ráster, lo que facilita su manejo mediante programas GIS y presenta una serie histórica de datos recopilados entre 1970 y 2000, con una resolución espacial de 30s (tamaño de píxel de aproximadamente 1km<sup>2</sup>).

En lo que se refiere a las características edafológicas y litológicas, las poblaciones de Galicia y Asturias se encuentran sobre un dominio litológico silíceo (Instituto Geográfico Nacional, 1978) que presentan principalmente rocas metamórficas con alto contenido en cuarzo (Instituto Geológico y Minero de España, 1972-2006) excepto la de Seixo de Landoi (C02) (Instituto Geológico y Minero de España, 1972-2006) sobre sustrato ultrabásico. Por el contrario, las poblaciones pertenecientes a Cantabria y Euskadi se encuentran sobre un dominio calizo donde la litología son rocas sedimentarias de tipo areniscas, limos y argilolitas (Instituto Geológico y Minero de España, 1972-2006). Según el mapa de suelos

todas las poblaciones se encuentran sobre umbrisoles excepto la de Nueva (Llanes, Asturias, C05) con suelos de tipo leptosol y la de Castro-Urdiales (Cantabria, C08) con suelos de tipo cambisol (Instituto Geográfico Nacional, 2001), (Tabla 4, anexo).

Tabla 1: Datos descriptivos de las poblaciones de *C. macrocarpa* incluidas en el estudio. PN., Parque Natural; PNac., Parque Nacional; Coord., coordenadas; Alt., altitud; Tam. Pob., tamaño población.

<b>Código</b>	<b>Población</b>	<b>Coord.</b>	<b>Alt.</b>	<b>Tam. pob.</b>
C01	PN Fragas do Eume, Pontedeume, A Coruña	43°25'N 8°6'W	224m	Grande
C02	Seixo de Landoi, Ortigueira, A Coruña	43°41'N 7°55'W	295m	Grande
C03	Ambosores, Muras, Lugo	43°31'N 7°43'W	553m	Mediana
C04	PN Fragas do Eume, Monfero, A Coruña	43°24'N 8°4'W	338m	Mediana
C05	Nueva, Llanes, Asturias	43°25'N 4°56'W	180m	Grande
C06	PNac Picos de Europa, Cuñaba, Asturias	43°16'N 4°39'W	590m	Grande
C07	Liendo, Cantabria	43°22'N 3°22'W	175m	Grande
C08	Castro-Urdiales, Cantabria	43°23'N 3°13'W	133m	Mediana
C09	Trucios-Turtzioz, Vizcaya	43°17'N 3°19'W	323m	Pequeña
C10	Bakio, Vizcaya	43°25'N 2°50'W	168m	Pequeña
C11	Artike, Bermeo, Vizcaya	43°23'N - 2°43'W	201m	Mediana

### 3.-Análisis de las comunidades vegetales

En todas las poblaciones se realizaron inventarios florísticos para caracterizar los hábitats en los que se desarrollaban los individuos de *Culcita macrocarpa* en el N de la Península Ibérica. Para la elaboración de estos inventarios se siguió la metodología SIGMATISTA (Braun Blanquet, 1979), que consiste en anotar las especies presentes en la población adjudicándoles índices de cobertura y sociabilidad (Braun Blanquet *l.c.*). En aquellas poblaciones donde hay diversas manchas de *C. macrocarpa*, se realizaron inventarios florísticos en cada una de ellas para detectar posibles diferencias dentro de la misma localidad, elaborando un inventario final de máximos que será el utilizado para la comparación entre poblaciones.

Asimismo, para cada especie presente en los inventarios se buscaron, en diferentes fuentes bibliográficas, características biológicas (familia, tipo biológico, geoelemento, tipo de polinización y dispersión, grado de conservación) que permitan analizar el funcionamiento de las comunidades vegetales. Con esas características se efectuaron histogramas de frecuencias (espectros) que permitan comparar las poblaciones entre sí, realizándolos en base a las frecuencias absolutas o a la cobertura de las especies. Los



espectros realizados fueron los siguientes:

### **3.1 Espectro florístico**

Con el que se pretende comparar la riqueza florística de cada una de las poblaciones caracterizada en base a la diversidad de familias presentes. En el histograma se han eliminado aquellas familias citadas solo en una población (Tabla 6, anexo).

### **3.2 Espectro corológico**

Basado en la distribución natural de las especies con el que se pretende determinar el origen de la flora, además de detectar la presencia de especies de interés biogeográfico (endemismos, relictos) o especies introducidas. Para definir los geoelementos se han utilizado diferentes fuentes: Aizpuru *et al.* (1999), Tutin *et al.* (1964-1993) y Castroviejo *et al.* (1986-2012).

### **3.3 Espectro biológico**

Para elaborar este espectro se utilizaron los tipos biológicos definidos por Braun Blanquet (1979) con el objetivo de analizar la estructura de las comunidades. Según este autor los tipos biológicos se diferencian en base a la situación de los órganos persistentes de la planta durante la estación desfavorable.

### **3.4 Espectro de polinización**

Este espectro se basa en analizar los factores que afectan al proceso de reproducción sexual, lo que vendría determinado por los mecanismos de dispersión del polen en fanerógamas o del gameto masculino en pteridófitos. Se diferencian 3 mecanismos: anemófilos e hidrófilos (abióticos) y entomófilos (bióticos).

### **3.5 Espectro de dispersión de diásporas**

Con este espectro se analizan los procesos que favorecen la dispersión de las diásporas (semillas, frutos, esporas) en las poblaciones estudiadas. Se han establecido dos mecanismos generales según su agente dispersor: procesos abióticos (barocoria, anemocoria y semacoria) y procesos bióticos (diszoocoria, epizoocoria, endozoocoria, mirmecocoria y autocoria), pudiendo estar presentes varios mecanismos en la misma especie.

### **3.6 Análisis estadístico de las comunidades vegetales**

La comparación entre los espectros permitió detectar las diferencias entre las distintas

poblaciones, así como la obtención de diversos índices de biodiversidad, tanto de la diversidad  $\alpha$  (riqueza específica, índice de Simpson (Simpson, 1949)) como de la diversidad  $\beta$  (índice de Jaccard (Jaccard, 1908)). Se aplicaron métodos de estadística multivariante para detectar la existencia de factores subyacentes que afectan a la ordenación de las localidades en el espacio generado por las variables seleccionadas. Más concretamente, se llevaron a cabo un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) y un análisis Cluster, aplicado a la matriz de similitud basada en el índice de Jaccard. El análisis de los datos se realizó con el programa RStudio (<http://www.rstudio.com/>) a través del paquete de BiodiversityR (Kindt & Coe, 2005).

#### **4.-Estudio de la *fitness* reproductiva en *C. macrocarpa***

##### **4.1 Componentes de la *fitness***

Para el estudio de la *fitness* se analizaron tres parámetros: la viabilidad inicial de las esporas, su tasa y su velocidad de germinación. La elección de estos parámetros se debe a: (i) son factores limitantes dentro del ciclo vital de los helechos y (ii) se pueden realizar comparaciones con datos previos obtenidos siguiendo la misma metodología (Fernández Martínez, 2019; Hermida Vázquez, 2020; Martínez Veiga, 2020). La viabilidad y la germinación se indican en porcentaje, mientras que la velocidad se valora según la fórmula indicada en Fernández Martínez (2019).

##### **4.2 Ensayos de germinación**

###### **•Germinación de las esporas *in vitro***

Obtención de las esporas en el laboratorio se realizó según Fernández Martínez (2019) con siembra posterior en placas Petri siguiendo la técnica descrita por Dyer (1983) con las modificaciones de Estrelles (2004) y Fernández Martínez (2019). El cultivo de las esporas se realizó siguiendo los parámetros indicados por Quintanilla (2000), manteniendo las placas en cámara de cultivo a 20°C y con un fotoperiodo de 16:8h (luz/oscuridad). El análisis de viabilidad se realizó siguiendo la metodología descrita en Fernández Martínez (2019).

La selección de los individuos para sembrar se basó en la cantidad de material vegetal recogido, utilizando un máximo de 15 individuos por población (una placa por individuo escogido aleatoriamente) debido a la limitación de espacio en las cámaras de cultivo de la Facultad de Ciencias. De este modo, se sembraron 15 individuos en las poblaciones de mayor tamaño (C01, C02, C05, C06 y C07) y la totalidad de individuos recogidos para el

resto de poblaciones (C03, C04, C08, C09, C10 y C11).

#### •Siembra de las esporas recién recogidas ( $S_0$ )

Debido a la situación de alarma provocada por el SARS-CoV-19, los ensayos iniciales para estudiar la viabilidad de las esporas recién recogidas tuvieron que ser parados y solamente se realizaron siembras con las esporas recién recogidas de algunas de las poblaciones (C02, C04, C05, C09 y C11) (tabla 2). Las placas sembradas de estas poblaciones se mantuvieron en las condiciones anteriormente indicadas, realizándose el conteo de viabilidad y algunos iniciales de germinación, si bien la germinación máxima no pudo ser obtenida hasta el día 72 de cultivo. Por este motivo, solamente se consiguieron datos de viabilidad y germinación máxima, pero no de velocidad.

#### •Siembra de las esporas congeladas ( $S_c$ )

Ante la situación especial producida este 2020, se decidió explorar más en profundidad el efecto de la conservación de las esporas en frío debido a que en estudios preliminares se obtuvieron datos no coincidentes con los publicados por otros autores (Quintanilla *et al.*, 2000). Se realizó una nueva siembra con todas las poblaciones recolectadas tras 7 meses (Tabla 2) de su conservación en frío (-20°C en seco), siguiendo todos los pasos descritos anteriormente de siembra, mantenimiento en cámaras de cultivo y contajes de los parámetros a estudiar.

### 4.3 Análisis estadísticos de la *fitness*

Para el estudio de la *fitness* de *C. macrocarpa*, se llevaron a cabo análisis estadísticos comparando los dos ensayos realizados ( $S_0$  y  $S_c$ ). Dichos análisis se efectuaron con el programa RStudio (<http://www.rstudio.com/>) a través del paquete de BiodiversityR (Kindt&Coe, 2005).

#### •Comparación entre $S_0$ y $S_c$

Primero, para todas las poblaciones se realizaron análisis exploratorios numéricos (determinación de la media, desviación típica, máximos y mínimos) representando los resultados mediante diagramas de caja (box-plots); posteriormente se realizó un análisis de la distribución de los datos (test de normalidad de Shapiro-Wilk) dado el bajo número de muestras en todas las poblaciones (< 50).

La comparación de medias entre las esporas recién recogidas ( $S_0$ ) y congeladas ( $S_c$ ) de cada población se llevó a cabo aplicando test paramétricos con la prueba T de Student, o no

paramétricos mediante la prueba U de Mann-Whitney para aquellos bloques de datos que no mostraban distribución normal. Se comprobó la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene.

### • Análisis de 3 parámetros fitness en poblaciones S<sub>C</sub>

En la siembra S<sub>C</sub> se obtuvieron datos de los tres parámetros de la *fitness* de las 11 poblaciones, de modo que se trató de observar si las posibles diferencias entre ellas se mantenían tras la congelación de las esporas y si los efectos de la misma sobre la viabilidad de las esporas. Para ello se realizaron los mismos análisis exploratorios numéricos y gráficos que sobre la siembra S<sub>0</sub> (medias, desviación típica, máximos y mínimos, boxplots), y el uso del test de Shapiro-Wilk para estudiar la normalidad de los datos.

Para analizar la existencia de diferencias significativas entre las poblaciones se utilizaron métodos no paramétricos (Test de Kruskal-Wallis) combinados con pruebas post-hoc como el test de Dunn-Bonferroni. Por último, se aplicaron técnicas de análisis multivariante como el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), para representar los datos en un espacio no correlacionado y relacionar las poblaciones con las características ambientales analizadas. El uso de los datos ambientales requiere de la realización de una regresión múltiple previa para observar si la correlación con las variables de la *fitness* es estadísticamente significativa.

Tabla 2. Fechas de recogida de material en las diferentes poblaciones y de las siembras realizadas. Rec.esp.=fecha recogida, S<sub>0</sub>= inicial, S<sub>C</sub>= congelación; N°=Número

Población	Rec. esp.	Siembra S <sub>0</sub>	N° placas S <sub>0</sub>	Siembra S <sub>C</sub>	N° placas S <sub>C</sub>
C01	22/01/2020	--	--	04/09/2020	15
C02	14/02/2020	09/03/2020	15	18/09/2020	15
C03	12/02/2020	--	--	18/09/2020	10
C04	22/01/2020	09/03/2020	5	04/09/2020	5
C05	31/01/2020	18/02/2020	15	10/09/2020	15
C06	31/01/2020	--	--	10/09/2020	15
C07	30/01/2020	--	--	10/09/2020	15
C08	30/01/2020	--	--	10/09/2020	9
C09	29/01/2020	18/02/2020	4	10/09/2020	3
C10	28/01/2020	--	--	10/09/2020	3
C11	29/01/2020	09/03/2020	7	10/09/2020	7

Para analizar la existencia de diferencias significativas entre las poblaciones se utilizaron métodos no paramétricos (Test de Kruskal-Wallis) combinados con pruebas post-hoc como el test de Dunn-Bonferroni. Por último, se aplicaron técnicas de análisis

multivariante como el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), para representar los datos en un espacio no correlacionado y relacionar las poblaciones con las características ambientales analizadas. El uso de los datos ambientales requiere de la realización de una regresión múltiple previa para observar si la correlación con las variables de la *fitness* es estadísticamente significativa.

## RESULTADOS

### 1. Análisis de las comunidades vegetales

En total se han contabilizado 79 especies en las 11 poblaciones, siendo la población de Artike, en el País Vasco (C11) con 29 taxones la más diversa, junto a Nueva (C05) de Asturias y Liendo (C07) de Cantabria con 27 cada una. Las poblaciones con menos especies fueron la de Castro (C08) con 15 y con 16 la del Sor (C03) en Galicia y Trucio en el País Vasco.

#### 1.1 Espectro florístico

El espectro florístico basado en la cobertura máxima de las especies se muestra en la Figura 5. Las 79 especies encontradas en las 11 poblaciones estudiadas pertenecen a 47 familias. De estos taxones, 17 se encuentran únicamente en una de las poblaciones, mientras que solamente 4 familias aparecen en las once poblaciones estudiadas (Blechnaceae, Dicksoniaceae, Dryopteridaceae y Fagaceae). En cuanto a las familias con mayor representación de especies, Dryopteridaceae son las más frecuentes (23 citas), seguidas por Fagaceae (17 citas), Betulaceae y Blechnaceae (14 citas) y Rosaceae y Poaceae (13 citas).

La familia que generalmente ofrece mayores valores de cobertura es F. Betulaceae, con gran representación en todos los inventarios a excepción de C03, C08, C09 y C10. En segundo lugar, aparece F. Dicksoniaceae, por la gran cobertura que presenta *C. macrocarpa* en las poblaciones con mayor número de individuos y F. Fagaceae aunque presenta muy baja cobertura en C03, C06 y C08.

Dentro del espectro florístico (Fig. 5), es destacable la presencia de F. Hymenophyllaceae, que aunque tiene la baja cobertura en las dos poblaciones en las que aparece (C02 y C03) por las propias características de las especies que la componen, se

trata de una familia relictica en la Península Ibérica, y por lo tanto, detectar su presencia es de gran importancia para la conservación y desde un punto de vista biogeográfico.

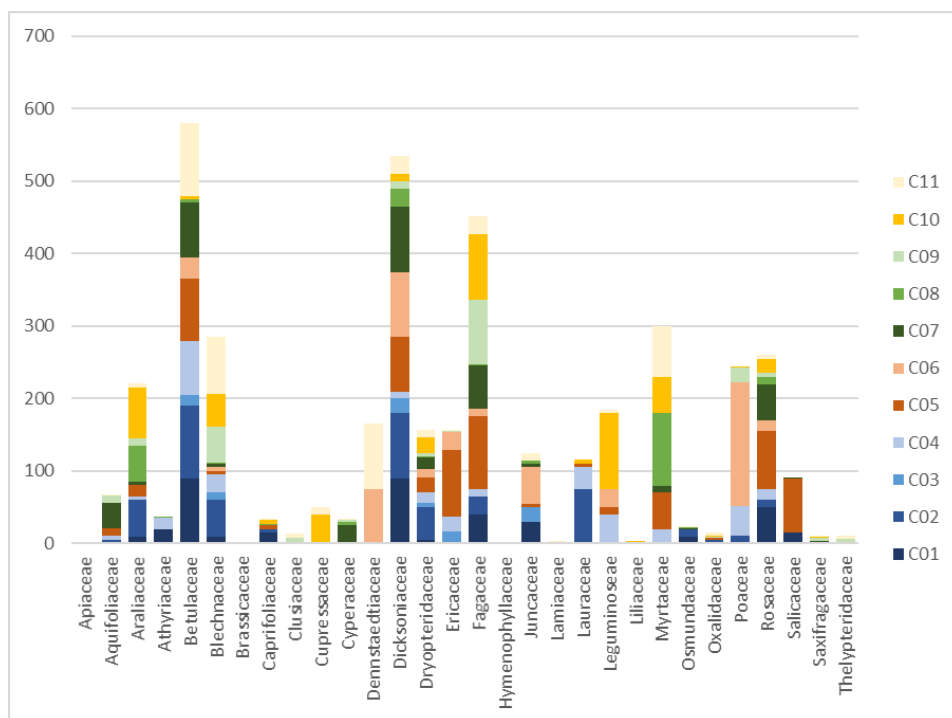


Figura 5. Espectro florístico basado en los valores de cobertura máxima para las 11 poblaciones analizadas de *C. macrocarpa*

## 1.2 Espectro corológico

En total se han identificado 11 geoelementos (Fig. 6), los de mayor representación son el Atlántico y el Eurosiberiano con una cobertura especialmente amplia en las poblaciones C05 y C07. Ambos inventarios están dominados por especies representativas de bosques templados tales como *Salix atrocinerea* Brot., *Betula alba* L., *Corylus avellana* L., *Quercus robur* L., *Rubus ulmifolius* J. Presl & C. Presl, *Hedera hibernica* (G.Kirchn.) Carrière, *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. o *Dryopteris affinis* Fraser-Jenk.

En lo que se refiere a las especies alóctonas, la cobertura más alta se da en las localidades C08 (donde solo aparece *Eucalyptus globulus* Labill. con una cobertura del 100%), C10 (donde aparecen varias especies, principalmente *Acacia melanoxylon* R.Br., *Chamaecyparis lawsoniana* (A.Murray bis) Parl. y *E. globulus*) y C11 (con *E. globulus*, *C. lawsoniana* y *Pinus radiata* D.Don). *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, una especie

subcosmopolita, está también presente en estas localidades, principalmente C11.

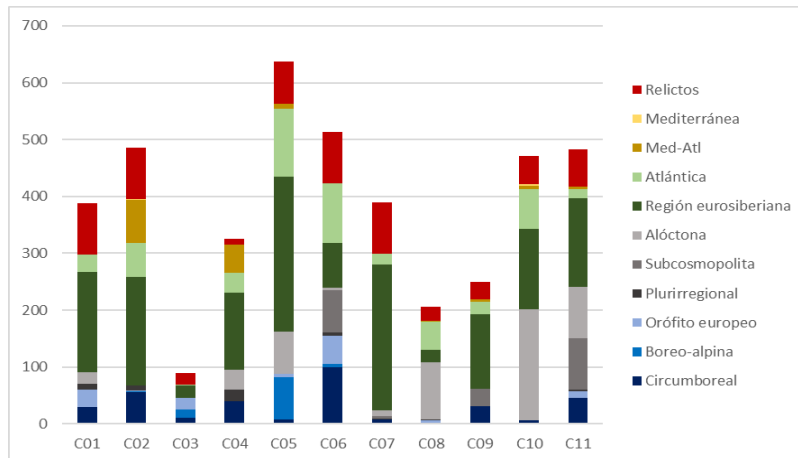


Figura 6. Espectro corológico basado en los valores de cobertura máxima para las 11 poblaciones analizadas de *C. macrocarpa*.

Del resto de afinidades geográficas, es destacable la presencia de geoelementos mediterráneos o mediterráneo-atlánticos en las localidades C02 y C04 (*Laurus nobilis* L. o *Arbutus unedo* L.) y en menor porcentaje en C05 y C10, todas poblaciones próximas a la costa; mientras que las especies de origen boreo-alpino o circumboreal se encuentran más representadas en la población C06, localizada en Picos de Europa, la de mayor altitud (590m) y en la C03, de Muras (553m), con por ejemplo, *Vaccinium myrtillus* L., *Luzula sylvatica* (Huds.) Gaudin y *Molinia caerulea* (L.) Moench. Las poblaciones con mayor cobertura de elementos relictos son: C01, C02, C05, C06, C07, C10 y C11. Además, es destacable que se ha detectado la existencia de otras dos especies relictas: *W. radicans*, en las poblaciones C09, C10 y C11, e *Hymenophyllum tunbrigense* (L.) Sm. en la C02 y C03.

### 1.3 Espectro biológico

En los inventarios se detectaron seis tipos biológicos: fanerófitos perennes y caducos, caméfitos, geófitos, hemicriptófitos y terófitos. En base a la presencia, apenas hay diferencias entre las localidades; existe una dominancia de hemicriptófitos (alcanzando casi el 50% en varias poblaciones como la C03, C07, C08 o C09); seguida por el estrato arbóreo compuesto de fanerófitos perennes y caducos (que alcanza un 30% de las especies registradas). Las diferencias estructurales de la vegetación se acentúan en cuanto analizamos los inventarios según las coberturas obtenidas (Fig. 7). Los fanerófitos alcanzan un porcentaje cercano al 50% en la mayoría de las localidades (excepto C03 y C06, en las

que la cobertura desciende hasta un 10%), siendo hemicriptófitos y geófitos los siguientes tipos biológicos predominantes. Se trata de las dos poblaciones localizadas a mayor altitud (Picos y Muras).

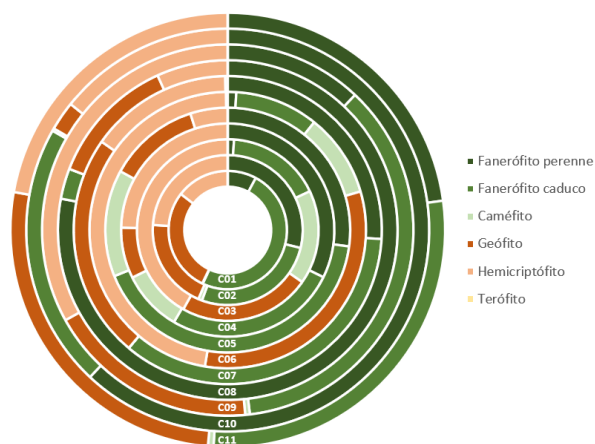


Figura 7. Espectro biológico basado en los valores de cobertura máxima para las 11 poblaciones analizadas de *C. macrocarpa*.

La cobertura de fanerófitos es especialmente alta en algunas de las poblaciones como la C10 donde se detectó una gran presencia de *Acacia melanoxylon*, *Chamaecyparis lawsoniana* y *Eucaliptus globulus*, pero también de *Quercus robur* y *Hedera hibernica*. En la C08, observamos una gran cobertura de *E. globulus* y *H. hibernica*; mientras que en la localidad C05 predominan fanerófitos como *Betula alba*, *Castanea sativa* Mill., *Q. robur* o *Salix atrocinerea*.

En poblaciones como la C06, C07, C09 y C11 se observa un aumento de la cobertura de geófitos, debido principalmente a la abundancia de pteridófitos como la propia *Culcita macrocarpa*, *Pteridium aquilinum* o, el escaso, *Adiantum capillus-veneris* L. en la C09. Los hemicriptófitos solamente muestran una proporción elevada en la población C06 (*Molinia caerulea*, *Agrostis curtisii* Kerguélen o *Luzula sylvatica*).

#### 1.4 Espectro de polinización

Los mecanismos de polinización presentan patrones muy similares entre los inventarios de presencia, siendo el mecanismo mayoritario la entomofilia con un 50% de las especies registradas, mientras que los mecanismos abióticos (anemofilia e hidrofilia) aparecen en un 25% cada uno, sin grandes variaciones entre todas las poblaciones estudiadas. Las diferencias entre poblaciones se observan cuando se tienen en cuenta las



coberturas (Fig. 8).

En la mayor parte de las localidades se aprecia una cobertura superior de las especies con sistemas de polinización abióticos, siendo especialmente claro el caso de la población C09, donde la cobertura de estas especies alcanza el 90% (Fig. 8). La excepción a este patrón serán la población C08, donde la polinización entomófila es mayoritaria debido a la alta cobertura que presentan *E. globulus*, *H. hibernica* y *R. ulmifolius* (siendo solamente alrededor de un 20% la cobertura de las especies que presentan sistemas de polinización abióticos) y la C10, donde la alta cobertura que presenta *A. melanoxylon*, *E. globulus* y *H. hibernica*. En la C11 encontramos una alta presencia de helechos (hidrofilia) como *Blechnum spicant*, *Pteridium aquilinum*, *Culcita macrocarpa* y *Woodwardia radicans*.

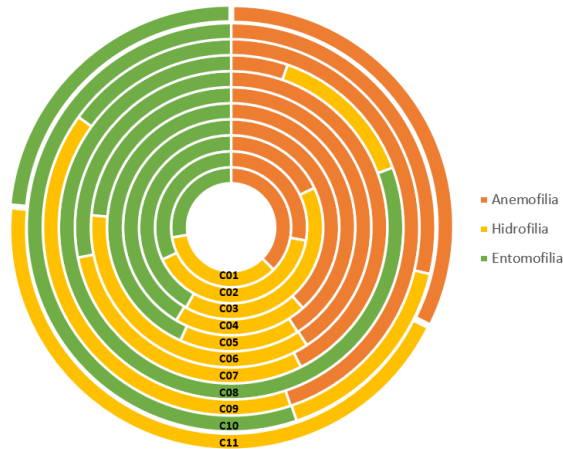


Figura 8. Espectro de los mecanismos de polinización basado en los valores de cobertura máxima para las 11 poblaciones analizadas de *C. macrocarpa*

### 1.5 Espectro de dispersión de las diásporas

La dispersión de diásporas no muestra grandes diferencias entre los espectros basados en la presencia (no se muestran) y la cobertura (no se muestran) si se clasifican a grandes rasgos en mecanismos en abióticos (barocoria, anemocoria y semacoria) y bióticos (diversos tipos de zoocoria y autocoria). En ambos casos, la media de los mecanismos abióticos supone un 66%. Únicamente la localidad C11 (75% abióticos) y la C10 (50% abióticos) muestran variaciones claras respecto a los porcentajes generales obtenidos.

Se observan mayores diferencias cuando se distingue entre los mecanismos incluidos dentro de las categorías de “biótico y “abiótico” (Fig. 9). En lo que se refiere a los mecanismos abióticos, las localidades C05 y C11 presentan un amplio porcentaje de

barocoria debido a la dominancia de especies con grandes aquenios, *Quercus robur* o *Corylus avellana*. Asimismo, también destaca en estas poblaciones la anemocoria, debido a la abundancia de especies con frutos tipo sámara como *Betula alba* y por la gran cobertura de helechos cuyas esporas se dispersan por el aire. La C06 también tiene un alto porcentaje de mecanismos abióticos, pero en este caso dominados por la anemocoria (gran cobertura de helechos, principalmente *Calcita macrocarpa* y *Pteridium aquilinum*) y semacoria (abundancia de especies que tienen métodos mixtos como *Molinea caerulea*, *Agrostis curtisii*, *Luzula sylvatica* y *Erica tetralix* L.).

En cuanto a los mecanismos bióticos, la gran mayoría son producidos por animales recolectores mediante endozoocoria o diszoocoria. El primer mecanismo es especialmente relevante en las localidades C02, C05 y C10 donde hay gran cobertura de especies productoras de bayas como *Laurus nobilis* (C02), *Vaccinium myrtillus* (C05) o *Hedera hibernica* o de drupas como *Rubus ulmifolius*. La diszoocoria se encuentra más extendida en la C11 por la presencia de especies productoras principalmente de aquenios (*Q. robur*, *C. avellana*), ya que es común que el mismo tipo de fruto presente varios mecanismos de dispersión. Por el contrario, solamente en la C06 predomina la dispersión no intencionada mediante epizoocoria (*M. caerulea*, *A. curtisii*).

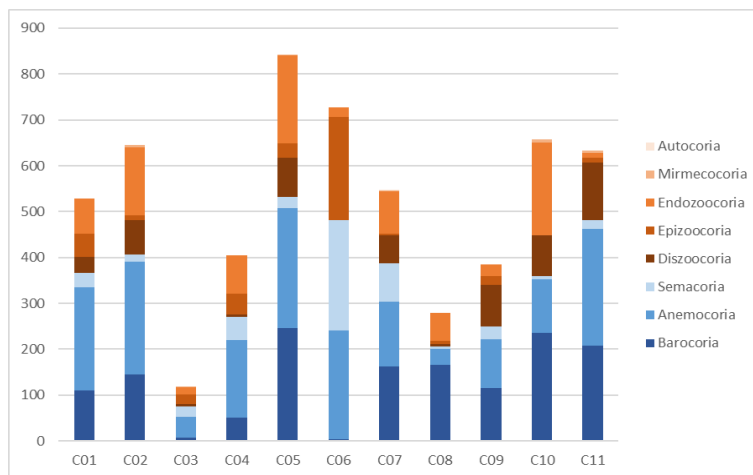


Figura 9. Espectro de dispersión de diásporas basado en los valores de cobertura máxima para las 11 poblaciones analizadas de *C. macrocarpa*.

### 1.6 Análisis de la diversidad vegetal observada

El análisis de la diversidad  $\alpha$ , basado en la riqueza específica de cada inventario (Tabla 3) muestra que el rango de diversidad osciló entre las 15 especies presentes en Castro

Urdiales (Cantabria, C08, mediana) y las 29 de Artike (Vizcaya, C11, mediana). Ocho poblaciones superaron las 20 especies, siendo las más diversas C05 (Llanes, Asturias, Grande), C07 (Liendo, Cantabria, grande) y C11 (Artike, Vizcaya, mediana) y las menos diversas: C03 (Muras, Lugo, mediana), C08 (Cantabria, C08, mediana) y C09 (Trucios, Vizcaya, pequeña).

Dentro de la diversidad  $\alpha$ , para analizar la estructura de la comunidad, se utilizó el Índice de Simpson (1949), considerando la cobertura de las especies como reflejo de su abundancia. Este índice nos indica que, por lo general, son poblaciones bastante diversas, es decir, se trata de comunidades dominadas por diferentes especies, debido a que todos los valores son cercanos a 0, entre 0,09 y 0,31 (Tabla 3). La excepción más notable a este patrón es la población C08 (Castro-Urdiales, Cantabria, mediana), con 15 especies, presenta un valor de 0,31, lo que indica la existencia de un menor número de especies con elevada abundancia. El estudio de las coberturas de dicha población frente a otras permite observar cómo esta está dominada solamente por tres especies (*E. globulus* con un 100%, *H. hibernica* con un 50% y *C. macrocarpa* con un 25%.) mientras que los restantes taxones muestran coberturas de menos del 10%. La población que muestra menor índice de Simpson es la C05 (0,09 con 26 especies), cuya cobertura se encuentra dominada por múltiples especies (*R. ulmifolius*, *B. alba*, *Q. robur*, *S. atrocinerea*, *E. globulus* y *C. sativa*); algunas de ellas compartidas con el inventario de la C04 (*B. alba*, *L. nobilis*, *R. ulmifolius* o *E. globulus*) que muestra un índice de Simpson similar (0,10).

Para analizar la diversidad  $\beta$ , utilizamos el índice de similitud de Jaccard (1908). El análisis clúster realizado para agrupar las poblaciones en base a su grado de similaridad (Fig. 10) pone de manifiesto la relación geográfica existente entre las poblaciones de Asturias y Galicia frente a las de Cantabria y País Vasco. En el dendrograma se pueden observar dos grupos relativos a las dos áreas geográficas comentadas. Dentro del grupo Galaico-Asturiano, las poblaciones se entremezclan, así la C05 asturiana es más similar a las C02 y C01 de Galicia, todas localizadas en zonas costeras, y las tres se unen a la población C03 de Muras, localizada en la cabecera del valle del río Sor, con condiciones climáticas más térmicas. En este grupo también es destacable la relación entre la población C06 de Picos de Europa, a 590m, de altitud con la población C04, de Fragas do Eume, a 338m, ambas de características más continentales.

Tabla 3. Diversidad  $\alpha$  (riqueza específica e Índice de Simpson) obtenida del análisis de los inventarios de las 11 poblaciones estudiadas.

	C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11
<b>Riqueza específica</b>	20	22	16	21	26	21	25	15	16	20	29
<b>Ind. Simpson</b>	0.12	0.11	0.16	0.10	0.09	0.12	0.14	0.31	0.18	0.13	0.12

Dentro del clúster formado por las poblaciones vasco-cantábricas, la C07 cántabra se parece más a la C11 en Vizcaya, la primera de tamaño grande, a 175m y la segunda de tamaño mediano, a 201m de altitud. Ambas también muy similares a la C09 y C10, vascas, de tamaño pequeño y que ocupan un rango altitudinal amplio, de 323m la primera a 168m la segunda. La población más diferenciada es la C08, cántabra, más cercana a la costa, a 133m de altitud y de tamaño mediano.

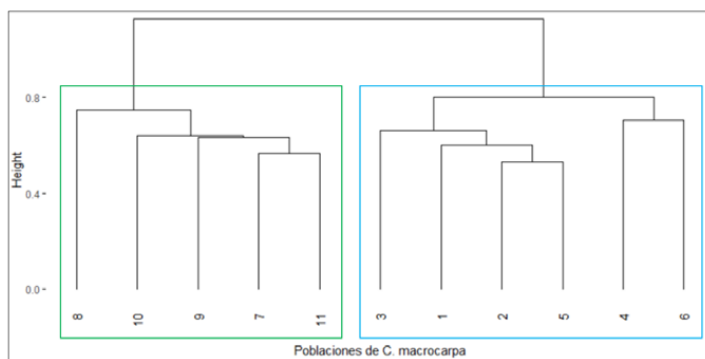


Figura 10. Dendrograma obtenido en base a la matriz de similitud utilizando el índice de Jaccard. Las poblaciones marcadas en azul son las pertenecientes a Galicia (C01-C04) y Asturias (C05-C06) y las marcadas en verde pertenecen a Cantabria (C07-C08) y País Vasco (C09-C11).

El mismo resultado se puede observar en el análisis MDS aplicado a la matriz de similitud calculada con el índice de Jaccard (Fig. 11). En este caso, las poblaciones se distribuyen en un espacio bidimensional estableciéndose un gradiente entre las poblaciones occidentales galaico-asturianas (C01-C06) y las poblaciones orientales (C07-C11).

Dentro del grupo galaico-asturiano, las poblaciones más separadas son la C06 y la C01, de tamaño grande, una situada en Galicia y otra en Asturias, ambas con un número elevado de especies 21 y 20, respectivamente y con un índice de diversidad de Simpson igual (0.12), lo que indica que existe un mayor número de especies dominantes como *B. alba* y *L. sylvatica*. En el grupo vasco-cantábrico vuelve a ser la población C08, de

Cantabria, la que se separa del resto. Se trata de la población que presenta menor número de especies pero con un valor medio de diversidad (0.31), por lo que hay menor número de especies dominantes (ej.: *E. globulus*, *H. hibernica*).

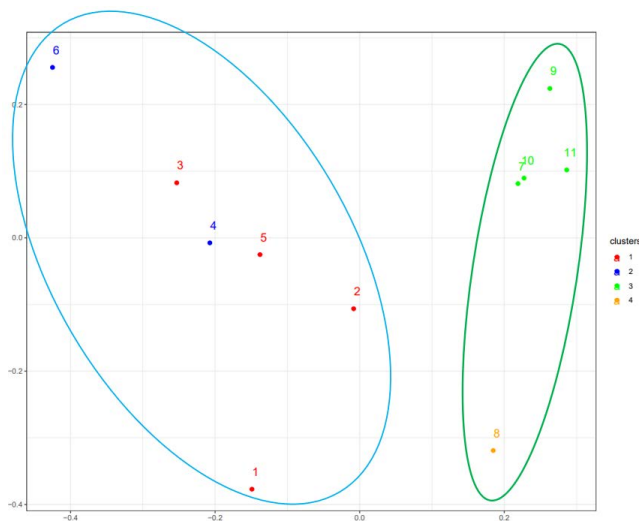


Figura 11. Diagrama MDS. Las poblaciones enmarcadas en azul son las pertenecientes a Galicia (C01-C04) y Asturias (C05-C06) y las marcadas en verde a Cantabria (C07-C08) y País Vasco (C09-C11).

## 2. Estudio de la *fitness* reproductiva en *C. macrocarpa*

### •Comparación entre $S_0$ y $S_c$

La viabilidad obtenida en el análisis de las esporas realizado justo tras su recolección (Tabla 4) muestra valores bastante variables entre las poblaciones, con tasas que oscilan entre 0,27 (población C04) y 0,90 (población C11). La viabilidad desciende claramente para todas las poblaciones tras su conservación en frío, a excepción de la C04 que aumenta de forma llamativa (datos procedentes de Martínez Veiga, 2020). En el caso de la población C11, también se observa una gran variabilidad en la viabilidad de los individuos una vez las esporas fueron sometidas al tratamiento de frío, aspecto que no se observó en las esporas recién recogidas (Fig.12).

La tasa de germinación máxima obtenida durante la  $S_0$  muestra valores medios similares para las distintas poblaciones, oscilando entre 0,67 (C09) y 0,80 (C04 y C11), con poca dispersión de los datos (Tabla 4). Al contrario de lo que ocurre con los valores de viabilidad, las germinaciones obtenidas tras la congelación aumentan, al igual que la varianza de los datos. Esto se observa muy claramente en la distribución de los datos de la C02 y la C11 (Fig. 12), donde la mediana se mantiene (o incluso aumenta en la C02), pero debido a la dispersión de los datos, el valor medio de germinación desciende en la  $S_c$ . En la

C09 se observa un descenso debido a la pérdida total de viabilidad (y por tanto de la capacidad de germinación) en algunos de los individuos sembrados.

Tabla 4. Análisis exploratorio (media, desviación típica) de los datos de viabilidad, germinación máxima y velocidad de germinación en las distintas poblaciones. S<sub>0</sub>, siembra inicial; S<sub>C</sub>, siembra de la espora congelada; Desv. tip, desviación típica.

Pob.	S.	VIABILIDAD		GERMINACIÓN		VELOCIDAD	
		Media	Desv. tip	Media	Desv. tip	Media	Desv. tip
C01	S <sub>C</sub>	0,60	0,10	0,92	0,05	3,71	1,23
C02	S <sub>0</sub>	0,71	0,26	0,75	0,06	--	--
	S <sub>C</sub>	0,45	0,22	0,66	0,31	1,86	1,23
C03	S <sub>C</sub>	0,50	0,15	0,60	0,29	2,50	1,40
C04	S <sub>0</sub>	0,27	0,31	0,80	0,08	--	--
	S <sub>C</sub>	0,71	0,08	0,88	0,19	3,53	1,56
C05	S <sub>0</sub>	0,83	0,12	0,71	0,10	--	--
	S <sub>C</sub>	0,72	0,14	0,85	0,07	2,63	0,41
C06	S <sub>C</sub>	0,65	0,11	0,77	0,18	3,14	0,94
C07	S <sub>C</sub>	0,60	0,16	0,78	0,16	2,80	0,75
C08	S <sub>C</sub>	0,46	0,23	0,65	0,38	2,42	1,95
C09	S <sub>0</sub>	0,51	0,38	0,67	0,11	--	--
	S <sub>C</sub>	0,23	0,38	0,27	0,47	0,88	1,52
C10	S <sub>C</sub>	0,70	0,04	0,79	0,08	2,74	0,33
C11	S <sub>0</sub>	0,90	0,05	0,80	0,08	--	--
	S <sub>C</sub>	0,58	0,29	0,64	0,33	2,15	1,12

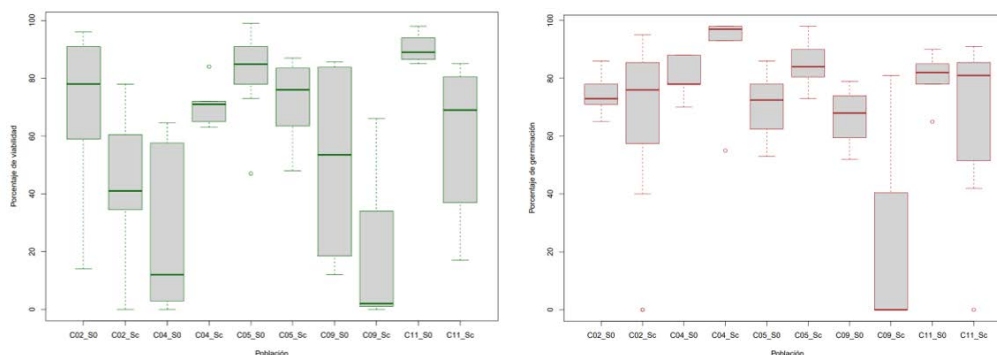


Figura 12. Diagramas de caja donde se compara la viabilidad (izq.) y tasa de germinación (dcha.) obtenida con la espora recién recogida (S<sub>0</sub>) y la espora congelada (S<sub>C</sub>)

Los resultados obtenidos de la  $S_0$  se han comparado con los datos de la misma población obtenidos en la  $S_c$  mediante test-T en aquellos grupos de datos que presentaban normalidad y la prueba de U de Mann-Whitney para los que no seguían una distribución normal. No se han observado diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos (resultados no mostrados), a excepción de la viabilidad de la población C02 (p-valor = 0.0001221) y la tasa de germinación de la población C04 (p-valor = 0.03615). Por el contrario, sí hay una diferencia en la dispersión de los datos obtenidos al realizar el test de Levene para el análisis de las varianzas, donde se obtienen diferencias significativas en la viabilidad de las poblaciones C02 (p-valor = 0,0009786), C09 (p-valor = 0.0336) y C11 (p-valor = 0.008647); y en la germinación de C11 (p-valor = 0.01198).

#### •Comparación entre poblaciones ( $S_c$ )

Los valores medios de viabilidad obtenidos para las esporas sometidas al tratamiento de frío ( $S_c$ ) varían bastante entre las 11 poblaciones estudiadas (tabla 4), desde el valor más bajo obtenido en la C09 (0,23) hasta el máximo de la C05 (0,72). Si bien muchas de las poblaciones apenas muestran varianza entre los individuos; C02, C08, C09 y C11 muestran una gran dispersión entre los datos (Fig. 13).

La germinación máxima, por el contrario, tiene valores algo más similares, entre 0,60 y 0,92 (C03 y C01 respectivamente, tabla 4), con la única excepción de la población C09 en la que la tasa de germinación registrada fue de 0,27. Apenas se observa dispersión entre los individuos sembrados de cada población (a excepción de C03, C09, y C11, Fig. 13).

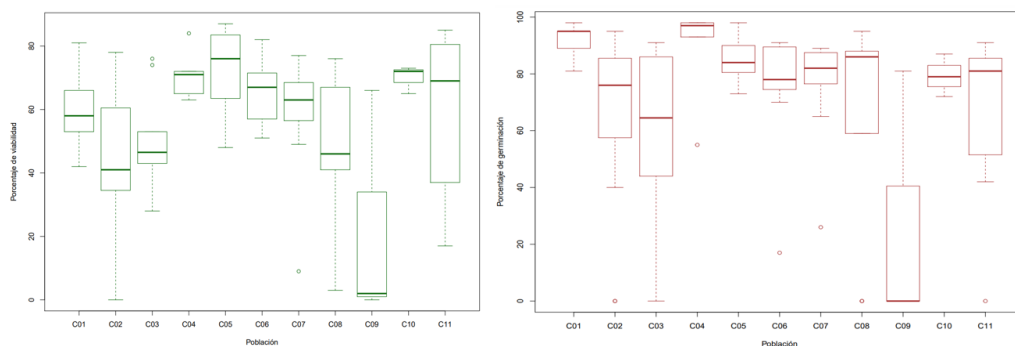


Figura 13. Diagrama de cajas de los datos de viabilidad (izquierda) y tasa de germinación (derecha) de cada una de las poblaciones tras congelar las esporas ( $S_c$ ).

La velocidad de germinación solamente se ha obtenido para las esporas sometidas a congelación ( $S_c$ ), y se ha visto que la mayoría de las poblaciones tienen tasas de germinación de entre un 2-3% por día (la población más lenta ha sido la C09 con un  $0,88\% \cdot d^{-1}$ , mientras que la más rápida en obtener su valor de germinación máxima ha sido la C01 con un  $3,71\% \cdot d^{-1}$ ) (Tabla 4). Observando la distribución de los datos obtenidos (Fig. 14), vemos como las poblaciones gallegas (C01-C04) muestran una mayor dispersión, mientras que el resto de poblaciones (a excepción de la C09, población de 3 individuos en la que 2 de ellos perdieron toda la viabilidad) muestran valores más similares y con menor dispersión de los datos individuales.

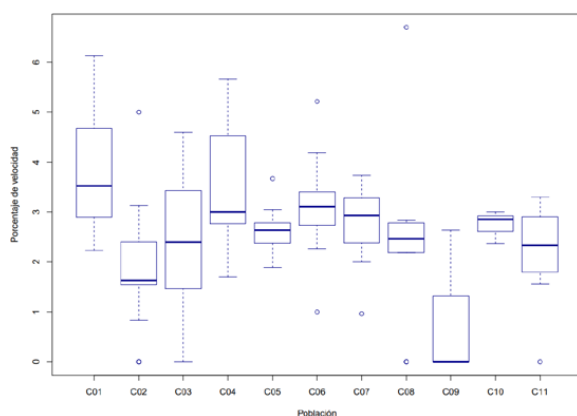


Figura 14. Diagrama de cajas de los datos de velocidad de germinación de cada una de las poblaciones tras congelación ( $S_c$ ).

El test de Kruskal-Wallis (tabla5) para la comparación de las medias de los parámetros de la *fitness* de las poblaciones de *C. macrocarpa* ( $S_c$ ) mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ellas en todos los parámetros a estudiar. Por el contrario, al comparar las varianzas mediante el test de Levene no muestran diferencias significativas entre las distintas poblaciones para ninguna de las variables (tabla 5).

Tabla 5. Resultados obtenidos para las tres variables de la *fitness* mediante las pruebas comparativas de medias (Kruskal-Wallis) y de varianzas (Levene). K., estadístico de Kruskal-Wallis; gl., grados de libertad; F., estadístico de Levene.

	Test de Kruskal-Wallis			Test de Levene		
	K	gl	p-valor	F	gl	p-valor
<b>Viabilidad</b>	29,34	10	0,0011	1,77	10	0,0750
<b>Germinación</b>	35,32	10	0,0001	1,82	10	0,0660
<b>Velocidad</b>	30,08	10	0,0008	1,29	10	0,2457

En las comparaciones dos a dos mediante el test de Dunn-Bonferroni, se ha observado



que algunas poblaciones se diferencian significativamente del resto. Así, en viabilidad la C05 difieren de la C02, C03 y C08; para la germinación, la C01 frente a C02, C03, C06, C07, C09 y C11 y para la velocidad, la C02 respecto a C01 y C06.

Previo a la realización del análisis multivariante se comprobó si las variables ambientales cuantitativas estaban correlacionadas con los parámetros de la *fitness* mediante una regresión lineal, no observándose ninguna relación estadísticamente significativa. Con respecto a las variables cualitativas, tamaño poblacional y la conservación del hábitat, el PCoA realizado solo detectó relación entre el grado de conservación del hábitat y los parámetros de la *fitness*. De este modo, en la figura 15 se puede ver como la población C09 (comunidad bien conservada) muestra los valores más bajos para todos los parámetros de la *fitness*; mientras que la población C04 (hábitat mal conservado) muestra valores altos de *fitness*, especialmente de velocidad de germinación.

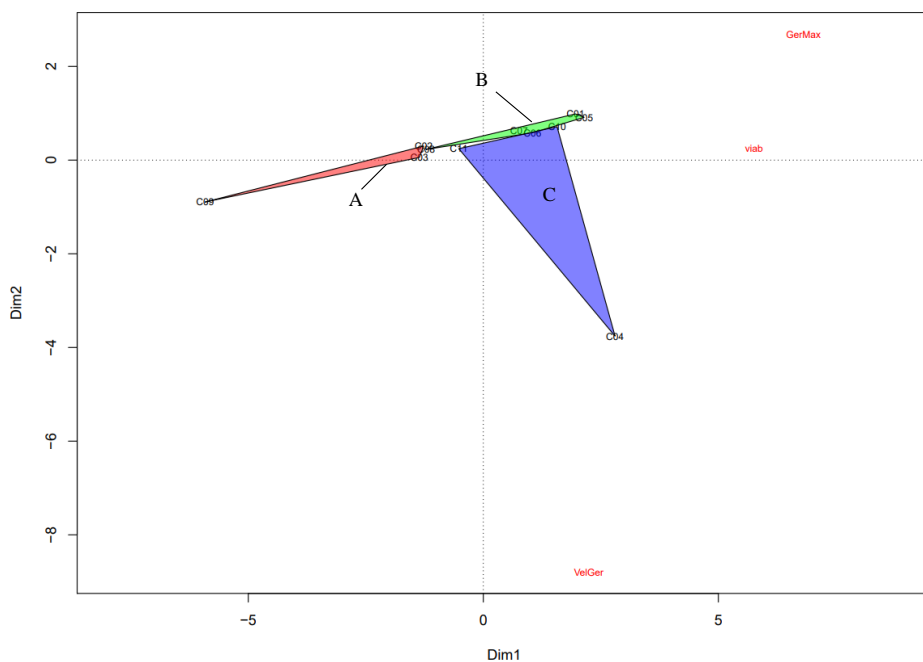


Figura 15. Gráfico de dispersión de los datos de *fitness* de las poblaciones en las coordenadas generadas por el análisis PCoA, agrupándose las poblaciones en base a la conservación del hábitat. Rojo: hábitat bien conservado (A), verde: hábitat en proceso de degradación (B), azul: hábitat mal conservado (C). GerMax., germinación máxima; viab., viabilidad; VelGer., velocidad de germinación.

## DISCUSIÓN

Este trabajo pretende caracterizar las poblaciones de *C. macrocarpa* y las comunidades vegetales en las que se desarrollan, con el objetivo de determinar si existe relación entre éstas y la *fitness* de este pteridófito relicto (medida como viabilidad, capacidad de germinación y velocidad de germinación de las esporas). Los resultados obtenidos amplían el conocimiento de la biología de esta especie amenazada, y son aplicables a futuros planes para su conservación.

### 1. Análisis de las comunidades vegetales

Las comunidades vegetales en las que aparece *C. macrocarpa* y otros helechos relictos son reflejo de las condiciones ambientales en las que se desarrollan, observándose un gradiente desde las poblaciones de Galicia y Asturias hasta las más orientales de Cantabria y País Vasco (Fig. 10, 11). Todas las poblaciones se sitúan en la Provincia Cantabro-Atlántica pero dentro de dos sectores bien diferenciados, el sector Galaico-Asturiano y el sector Santanderino-Vizcaino (Peinado Lorca & Rivas Martinez, 1987). En concreto, la situación de las poblaciones determinaría la existencia de dos tipos de comunidades según Rivas Martinez (1987) con dominancia de robledales acidófilos pertenecientes a las asociación *Blechno spicanti-Quercetum roboris*, con variantes costeras ricas en *Laurus nobilis*, para las localidades de zonas más bajas de Galicia y fresnedas con roble para las poblaciones de Cantabria y el País Vasco, pertenecientes a la asociación *Polystico setiferi – Fraxinetum excelsioris*, con variantes ricas en Laurel, con encinas o robledales pero caracterizados por la presencia de *Tamus communis* L. (*Tammo comuni-Quercetum roboris*). Las poblaciones de Asturias supondrían un estado intermedio, al presentar tanto fresnedas como robledales pero, estos últimos, definidos por la existencia de *Blechnum spicant*, al igual que Galicia. La población de Picos de Europa, se caracteriza por la dominancia del haya (*Fagus sylvatica* L.; *Carici sylvaticae-Fageto sigmetum*), con especies en el dosel herbáceo compartidas con las poblaciones más occidentales. En general, los datos obtenidos concuerdan con inventarios publicados para este tipo de comunidades por Izco et al., (1990) y Guitián et al. (2011), donde el dosel arbóreo está dominado por *Q. robur*, *B. alba*, *C. sativa* o *C. avellana*.

La riqueza específica observada en los inventarios realizados (que presentan entre 15 y 29 especies) coincide con la descrita, en comunidades similares, por diversos autores, que dan una media de 25 (Amigo & Norman, 1995) y 30 especies (Izco et al., 1990). Si bien

nuestra media sería algo inferior ( $21 \pm 4$  especies), esto es debido probablemente a la realización de los inventarios durante el invierno, de manera que no ha sido posible registrar toda la diversidad existente. Se observó que las especies características coinciden con diferentes inventarios realizados en zonas similares (Izco et al., 1990; Ordóñez et al., 2003), así como la presencia de especies acompañantes con gran cobertura como *B. spicant*, diversas especies de *Dryopteris*, *Hedera hibernica* o *Vaccinium myrtillus*. Es relevante la presencia de *Luzula sylvatica* en la mayoría de los inventarios (en algunos con una cobertura importante), puesto que junto con *Rubus sp* y *Viola riviniana* Rchb. se considera un indicador de zonas con posible presencia de helechos relictos terciarios (Amigo & Norman, 1994).

En cuanto a la caracterización de las comunidades mediante los espectros, en general se observaron concordancias con lo publicado para bosques de las zonas templadas (Costa Tenorio et al. 1998), si bien se apreciaron también diferencias. Así, en el espectro biológico (Fig. 7), obtenemos una dominancia de fanerófitos y hemicriptófitos, a pesar de que la flora global de la zona geográfica a estudio está dominada por hemicriptófitos y terófitos (Buide et al., 1998). Una vez más, esta diferencia es atribuible a la época de realización del estudio, ya que los terófitos están ausentes en los meses de invierno. En cuanto al espectro de polinización, se encontró que en todos los casos domina la polinización abiótica, lo que no coincide con lo publicado para la Península Ibérica (Buide et al., 1998) o para las regiones templadas a nivel mundial (Ricklefs & Renner 1994), esto es justificable porque se trata de un tipo de hábitat muy concreto, dominados por especies arbóreas, con mecanismos de polinización anemófilos o en algunos casos por pteridófitos, dependientes del agua para que se produzca la reproducción sexual (pop C08, Fig.8). Lo mismo sucede con los mecanismos de dispersión de diásporas, siendo dominantes los abióticos, lo que puede estar relacionado con el estado de conservación de las comunidades estudiadas, como indican Guitián & Sanchez (1992); una elevada dominancia de la dispersión abiótica indicaría un menor grado de estructura en la comunidad vegetal (van der Pijl, 1982). El grado de conservación de las poblaciones puede abordarse teniendo en cuenta los resultados del espectro corológico (Fig. 6), donde el peso de especies introducidas o de carácter subcosmopolita, es importante en la mayoría de las poblaciones analizadas (excepto C02 y C03). Asimismo, los valores de los índices de diversidad (Tabla 4) son, por lo general, bajos, lo que es reflejo de un mayor número de especies dominantes. De todas formas, un análisis más detallado de la conservación de la comunidad requeriría

un estudio anual de la vegetación.

La homogeneidad observada entre las poblaciones de *C. macrocarpa* en lo relativo a las características de la comunidad vegetal acompañante hace difícil establecer relaciones entre este parámetro y los tamaños poblacionales. Aquellas localidades donde la conservación parece ser mejor en función de la cobertura de especies alóctonas (en muchos casos con potencial alelopático; e.g. May & Ash, 1990) no necesariamente presentan tamaños poblacionales mayores (Tabla 1). Así, por ejemplo, las poblaciones C03 y C09 (Ambosores y Trucíos, respectivamente) no presentan cobertura de especies alóctonas (Fig. 6) y albergan poblaciones de tamaño mediano o pequeño. Por el contrario, las poblaciones C05, C10 y C11, con cobertura de especies alóctonas claramente superior (Fig. 6), son de tamaño grande, pequeño y medio, respectivamente. Nuestros resultados parecen apuntar a que el posible efecto de las especies alóctonas invasoras (por ejemplo de los géneros *Eucalyptus* o *Acacia*) no deriva de su presencia o potencial alelopático a baja densidad, sino de su capacidad de alterar la iluminación o el equilibrio hídrico del suelo (Betancourt, 2018).

Dentro del espectro corológico (Fig. 6), llama la atención que en la mayor parte de los casos *C. macrocarpa* es el único elemento relicto presente en las localidades. Las excepciones a este patrón son las poblaciones C10 y C11 (donde aparece también *W. radicans*) y C03 (donde se encontró *H. tunbrigense*). Es interesante que no se aprecia una correlación entre el tamaño de la población de *C. macrocarpa* y la diversidad y cobertura de especies de helechos relictos, que normalmente se describen como un grupo ecológico homogéneo (e.g. Quintanilla *et al.*, 2007). Esto podría deberse a las diferencias entre los nichos concretos utilizados por cada especie, analizados ya en detalle en algunas de las poblaciones visitadas (C05) por otros autores (Ordóñez *et al.*, 2003). Dicho lo anterior, análisis preliminares de la brioflora asociada a las poblaciones de *C. macrocarpa* sí presentan gran abundancia de especies hiperoceánicas de óptimo subtropical (relictas) de criptógamas no vasculares (resultados no publicados).

## **2. Estudio de la *fitness* reproductiva de *C. macrocarpa***

Si bien la situación provocada por el SARS-CoV-19 causó problemas en el desarrollo del trabajo, también nos permitió explorar los cambios que se producen en las *fitness* de las esporas tras un periodo de conservación en frío. Así, se compararon estos resultados con los obtenidos en los análisis con esporas recién recolectadas (datos propios y

bibliográficos; Figs. 12). El análisis detallado de las diferencias entre las poblaciones solo pudo realizarse con las esporas conservadas en frío (Figs. 13-15), que eran de las que se disponía al final del confinamiento.

Los datos obtenidos para la viabilidad de las esporas recién recolectadas ( $S_0$ ) muestran una gran variabilidad, oscilando entre un 27% y un 90% dependiendo de las poblaciones. Tras el periodo de conservación en frío se produce un ligero descenso en la viabilidad en todos los casos, obteniéndose el máximo de viabilidad en la población de Nueva (C05, Asturias) con un 72%. En lo que se refiere a la germinación de las esporas viables, este porcentaje es alto en ambos ensayos. Para las esporas recién recogidas se observan valores que varían entre 67% y 80%; y una vez conservadas en frío este valor aumenta, en algunos casos -si bien el comportamiento es muy irregular-, alcanzando tasas de germinación del 92% en la población C01 (Fragas do Eume, A Coruña). La velocidad de germinación es coherente con los resultados del porcentaje de germinación, siendo nuestros datos semejantes a otros estudios realizados con otros helechos de la Superclase Moniliformopses (Quintanilla et al., 2002a).

Nuestros datos coinciden con lo observado en otros trabajos llevados a cabo en este laboratorio (Fernández Martínez, 2019 y Martínez Veiga 2020), donde la tasa de viabilidad desciende proporcionalmente según el tiempo de conservación. El descenso observado es menor que el indicado por otros autores que han analizado los métodos de conservación de esporas (e.g. Quintanilla et al., 2002a). Ballesteros (2012) señaló que el método ideal de conservación es la conservación en húmedo, de forma que se recreen las condiciones que las esporas tienen en el suelo forestal. La conservación en seco parece un método prometedor dado que se reduce el espacio de conservación y el tiempo de manejo de las esporas manteniéndose un valor alto de viabilidad y germinación en casi todos los casos. De todas formas, la pérdida de viabilidad de las esporas resulta un problema para la conservación del germoplasma a largo plazo (Quintanilla et al., 2002a), por lo que diversos autores han sugerido la crio-preservación de los gametófitos como el método más apropiado de conservación (Mikula *et al.*, 2011).

Los análisis de comparación entre poblaciones han señalado la existencia de diferencias significativas en todas las variables de la *fitness*, por lo que este será un parámetro a tener en cuenta a la hora de seleccionar localidades para la extracción de germoplasma o en posibles proyectos de traslocación de individuos. Sin embargo, sería

necesario repetir los análisis en más años para asegurar que los efectos que se ven son permanentes en el tiempo, y no dependientes de las condiciones ambientales específicas y transitorias de cada población individual. Por otro lado, las diferencias observadas afectan a las poblaciones sin que se observe un patrón concreto en los análisis de correlación, de forma que estas variaciones no se pueden atribuir a alguna de las variables cuantitativas consideradas. En lo que se refiere a las variables cualitativas (i.e. grado de conservación de las poblaciones en la Fig. 17), nuestros análisis no muestran una relación clara entre éstas y los parámetros de la *fitness* (tampoco en lo que se refiere a la diversidad genética observada por Ben Menni-Schuler, 2019). Esos parámetros, por lo tanto, no podrán emplearse como *proxies* del rendimiento reproductivo.

El objetivo inicial de este trabajo era caracterizar las comunidades vegetales donde se desarrolla *C. macrocarpa* en el N de la Península Ibérica y analizar su *fitness* para detectar si existe alguna relación entre ambos. A este respecto, podemos decir que si bien se han observado poblaciones significativamente diferentes por la eficacia de sus esporas, estas diferencias no han podido atribuirse a ningún parámetro ambiental concreto. Por otro lado, los valores de *fitness* son por lo general muy altos para todas las poblaciones. Si a esto le añadimos la gran cantidad de esporas que producen estos organismos, podemos ver que la viabilidad no sería un factor limitante a la hora de escoger una fuente de germoplasma entre las diferentes poblaciones, como tampoco parece que lo sea para la supervivencia de las mismas. Sin embargo, sería necesario completar el estudio de la diversidad genética y habría que ampliar el estudio a años sucesivos para confirmar los resultados.

En cuanto a la metodología seguida, sería recomendable en futuros estudios, realizar el estudio de las curvas de germinación (la germinación de las esporas puede separarse en dos fases: una de crecimiento exponencial y otra donde se alcanza la estabilidad de germinación) para una mejor determinación de la velocidad de germinación, así como de la germinación máxima. Sería también necesario repetir el estudio empleando únicamente esporas recién recogidas para ver si los datos se repiten. Finalmente, habría que comenzar el estudio de otros parámetros de la historia de vida del organismo, por ejemplo la susceptibilidad a los aumentos de luz en el substrato o a la presencia de sustancias alelopáticas, para continuar el estudio detallado de la conservación de la especie.

## CONCLUSIONES

-La composición y estructura de las comunidades vegetales en las que se desarrolla *C. macrocarpa* en el N de la Península Ibérica, medidas en base a la riqueza específica, dominancia de las especies y funcionamiento biológico, no fueron homogéneas entre las poblaciones, aunque la información recopilada fue coherente con lo descrito para esta zona geográfica, encontrándose un gradiente entre las poblaciones de Galicia y Asturias frente a las de Cantabria y País Vasco.

- Con los datos obtenidos se puede afirmar que existen diferencias entre las poblaciones basándonos en los parámetros de la *fitness* analizados, si bien no se han podido determinar los factores que afectan a la misma, al no encontrar una clara relación entre la *fitness* y las variables ecológicas y poblacionales analizadas. En futuros estudios, sería necesario investigar otros factores como el estado fisiológico de los individuos y la diversidad genética intrapoblacional.

-El método utilizado para la conservación de las esporas de *C. macrocarpa* afecta a la viabilidad de las mismas, reduciendo los porcentajes observados. La conservación de las esporas en frío seco (-20°C) podría ser, de todas formas, un método útil para los estudios con esta especie, ya que los valores de viabilidad y germinación se mantuvieron altos y el procedimiento no requiere de manipulaciones complejas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aizpuru, I. (1999). *Claves ilustradas de la flora del País Vasco y territorios limítrofes*. Servicio central de publicaciones del Gobierno Vasco.
- Amigo, J. & Norman, G. (1995). Identification of site-types important for rare ferns in an area of deciduous woodland in northwest Spain. *Vegetatio*, 116 (2), 133-146.
- 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.) (2004). *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.
- Ben-Menni Schuler, S. (2019). *Diversidad genética y modelo filogeográfico de cuatro especies de helechos relictos del Terciario: Vandemboschia speciosa (Willd.) G. Kunkel, Diplazium caudatum (Cav.) Jermy, Pteris incompleta Cav. y Culcita macrocarpa C. Presl*. (tesis doctoral). Universidad de Granada, Granada.
- Betancourt, Z. (2018). *Descripción, caracterización del biotopo e identificación de amenazas de los núcleos poblacionales de la especie de helecho Culcita macrocarpa, relicto macaronésico del Parque Natural Fragas do Eume* (Trabajo de Fin de Máster). Universidade da Coruña, Galicia.
- Braun Blanquet, J. (1979). *Fitosociología. Bases para el estudio de las comunidades vegetales*. H. Blume Ediciones. Madrid. 820pp.
- Brummitt, N., Aletrari, E., Syfert, M. M., & Mulligan, M. (2016). Where are threatened ferns found? Global conservation priorities for pteridophytes. *Journal of Systematics and Evolution*, 54 (6), 604–616. <https://doi.org/10.1111/jse.12224>.
- Bueno Sánchez A, Valderrábano Luque J, Fernández Prieto JA. (2017). *Culcita macrocarpa C.Presl. Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare amenazada de España. Adenda 2017*. Ministerio de Transición Ecológica. Madrid.
- Buide, M. L.; Sánchez, J. M. & Guitián, J. (1998). Ecological characteristics of the flora of the Northwest Iberian Peninsula. *Plant Ecology*, 135 (1), 1-8.
- Castroviejo, S. (coord. gen.) (1986-2012). *Flora iberica* 1-8, 10-15, 17-18, 21. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC.
- Costa Tenorio, M.; Morla Jurasti, C. & Sainz Ollero (1998). *Los bosques ibéricos*. Ed. Planeta. 597
- 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.
- 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 Martínez, E. (2019). *Análisis de la viabilidad de las esporas en poblaciones del helecho relicto amenazado Culcita macrocarpa* (trabajo de fin de grado). Universidade da Coruña, A Coruña.
- Frey, W. (2009). *Syllabus of Plant Families, Bryophytes and seedless Vascular Plants*. Borntraeger, Stuttgart.
- Goller, K., & Rybczynski, J. J. (2007). Gametophyte and sporophyte of tree ferns in vitro culture. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 76(3), 193–199.
- Gutián, M. A. R.; da Costa, J. F.; Rego, P. R. & Pose, G. L. (2011). Caracterización ambiental, demografía y amenazas para su conservación de la población lucense de *Culcita macrocarpa* C. Presl. (NW ibérico). *Recursos Rurais*, 7.
- Gutián, J., & Sánchez, J. M. (1992). Seed dispersal spectra of plant communities in the Iberian Peninsula. *Vegetatio*, 98 (2), 157-164.
- Hermida Vázquez, M. (2020). *Culcita macrocarpa Presl.: posición filogenética y estudio de la biología reproductiva en poblaciones naturales de un helecho amenazado*. (trabajo de fin de grado). Universidade da Coruña, A Coruña.
- Instituto Geográfico Nacional (1978) *Mapa litológico*. [mapa] 1:10000000. Madrid: Instituto Geográfico Nacional.
- Instituto Geográfico Nacional (2001) *Mapa de suelo*. [mapa] 1:3000000. Madrid: Instituto Geográfico Nacional.
- Instituto Geológico y Minero de España (1972-2006). *Mapa geológico de España a escala 1:50000* [Mapa digital] Madrid: Instituto Geológico y Minero de España.
- Izco, J., Amigo Vázquez, J., & Guitian, J. (1990). Los robledales galaico-septentrionales. *Acta bot. malacit.*, 15.
- Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.*, 44, 223-270.
- Kindt, R. & Coe, R. (2005). *Tree diversity analysis. A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies*. World Agroforestry Centre (ICRAF), Nairobi.
- Kondrakov P, Schütz N, Schüssler C, Menezes de Sequeira M, Santos Guerra A, *et al.* (2015). Biogeography of Mediterranean hotspots biodiversity: Re-evaluating the “Tertiary Relict” hypothesis of Macaronesian laurel forests. *PLoS One*, 10: e0132091
- Mairal M, Caujapé-Castells J, Pellissier L, Jaén-Molina R, Álvarez N, *et al.* (2018). A tale of two forests: ongoing aridification drives population decline and genetic diversity loss at continental scale in Afro-Macaronesian evergreen-forest archipelago endemics. *Annals of Botany* 122: 1005-1017.
- Martínez Veiga, E. (2020). *Os feitos relictos do Terciario en Galicia: análise filoxenética e estudo ecolóxico de poboacións de Culcita macrocarpa Presl. na Península Ibérica*. (trabajo de fin de grado). Universidade da Coruña, A Coruña.
- May, F.E. & Ash, J.E. (1990). An assessment of the allelopathic potential of *Eucalyptus*. *Australian Journal of Botany* 38, 245-254.

- Mikula, A.; Makowski, D.; Walters, C. & Rybczynski, J.J. (2011). Exploration of Cryo-methods to Preserve Tree and Herbaceous fern Gametophytes. In, Fernández, H.; Kumar, A. & Revilla, M.A. (eds.). *Working with ferns. Issues and Applications*. Springer. Nueva York
- Nayar BK, Kaur S. (1971). Gametophytes of homosporous ferns. *The Botanical Review*, 37, 296-382.
- Patiño J, Mateo RG, Zanatta F, Marquet A, Aranda SC, *et al.* (2016). Climate threat on the Macaronesian endemic bryophyte flora. *Scientific Reports*, 6: 29156.
- Peinado Lorca, M. & Rivas-Martínez, S. (Eds.) (1987). *La vegetación de España*. Universidad de Alcalá de Henares, Madrid.
- Pittermann J, Bodersen C, Watkins JE. (2013). The physiological resilience of fern sporophytes and gametophytes: advances in water relations offer new insights into an old lineage. *Frontiers in Plant Science*, 4, 285.
- Ordóñez, M. C. F.; González, T. E. D. & Prieto, M. Á. C. (2003). Evaluación de la biodiversidad briopteridofítica de la cuenca del río de Nueva (Llanes, Asturias, N Península Ibérica): bases para su protección y conservación. Evaluation of the biodiversity in Bryophytes and Peridophytes in Nueva's river basin. *Acta botánica barcinonensia*, 191-208.
- Quintanilla, L. G.; Amigo, J.; Pangua, E. & Pajarón, S. (2002a) 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 peridoflora de la sierra de la Capelada (La Coruña, España). *Lazaroa*, 23, 17–24.
- 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), pp. 187–194.
- Quintanilla, L. G.; Pajarón, S.; Pangua, E. & Amigo, J. (2007). Allozyme variation in the sympatric ferns *Culcita macrocarpa* and *Woodwardia radicans* at the northern extreme of their ranges. *Plant Systematics and Evolution*, 263 (3), 135-144.
- Ranker, T. A. & Haufler, C. H. (2008) *Biology and evolution of ferns and lycophytes*. Cambridge University Press.
- Rivas Martínez, S; Penas, A & Díaz, T. E. (2004) *Bioclimatic map of Europe* [https://www.globalbioclimatics.org/form/bi\\_med.htm](https://www.globalbioclimatics.org/form/bi_med.htm) [último acceso 28 de junio de 2021].
- Ricklefs, R. E. & Renner, S. S. (1994). Species richness within families of flowering plants. *Evolution*, 48, 1619–1636.
- Sharpe JM, Mehlreter K. (2010). Ecological insights from fern population dynamics. In: Mehlreter K, Walker LR, Sharpe JM eds. *Fern ecology*. Cambridge: Cambridge University Press. 61–110.
- Simpson, E.H. (1949). Measurement of diversity. *Nature*, 163, 688.

- Sober, E. (2001). The Two Faces of Fitness. en Singh, R.; Paul, D.; Krimbas, C. & Beatty, J. (Eds.) *Thinking about Evolution: Historical, Philosophical, and Political Perspectives*. Cambridge University Press, 309-321.
- Tanaka J, Yano K, Aya K, Hirano K, Takehara S, Koketsu E et al. (2014). Antheridiogen determines sex in ferns via a spatiotemporally Split gibberellin synthesis pathway. *Science*, 346, 469-473.
- Tutin, T.G.; Heywood, V.H.; Burges, N.A.; Moore, D.M.; Valentine, D.H.; Wlators, S.M. & Webb, D.A. (1964-1993). *Flora Europaea*. Cambridge University Press, Cambridge.
- van der Pijl, L. (1982). *Principles of dispersal in higher plants*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Verma, S.C. (2001). Genetic implications of diversity in gametophyte biology and isolate potential of homosporous ferns. *Phytomorphology*, 51, 33-39.

## ANEXO

Tabla 1. Descripción de las variables bioclimáticas obtenidas en formato ráster de [www.worldclim.org/](http://www.worldclim.org/)

<b>Código</b>	<b>Variable WorldClim</b>
BIO1	Temperatura anual media
BIO2	Rango diario medio (temperatura máxima – temperatura mínima)
BIO3	Isotermalidad [(BIO2/BIO7)*100]
BIO4	Coefficiente de variación de temperatura [desviación estándar * 100]
BIO5	Temperatura máxima del mes más cálido
BIO6	Temperatura mínima del mes más frío
BIO7	Rango anual de temperatura [BIO5 – BIO6]
BIO8	Temperatura media del cuatrimestre más húmedo
BIO9	Temperatura media del cuatrimestre más seco
BIO10	Temperatura media del cuatrimestre más cálido
BIO11	Temperatura media del cuatrimestre más frío
BIO12	Precipitación anual
BIO13	Precipitación del mes más húmedo
BIO14	Precipitación del mes más seco
BIO15	Coefficiente de variación de precipitación
BIO16	Precipitación del cuatrimestre más húmedo
BIO17	Precipitación del cuatrimestre más seco
BIO18	Precipitación del cuatrimestre más cálido
BIO19	Precipitación del cuatrimestre más frío
srad	Radiación solar ( $\text{kJ m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ )

Tabla 2. Variables bioclimáticas correspondiente a las diferentes características de temperatura de cada una de las poblaciones. Pob., población.

<b>Pob</b>	<b>bio1</b>	<b>bio2</b>	<b>bio3</b>	<b>bio4</b>	<b>bio5</b>	<b>bio6</b>	<b>bio7</b>	<b>bio8</b>	<b>bio9</b>	<b>bio10</b>	<b>bio11</b>
<b>C01</b>	13,26	7,77	44,64	350,25	22,80	5,40	17,40	10,12	17,48	17,92	9,37
<b>C02</b>	12,48	7,21	43,69	345,16	21,60	5,10	16,50	9,47	16,60	17,07	8,68
<b>C03</b>	11,67	8,08	43,89	383,70	22,10	3,70	18,40	8,20	16,38	16,75	7,42
<b>C04</b>	12,50	7,93	44,03	367,09	22,50	4,50	18,00	9,18	16,98	17,38	8,43
<b>C05</b>	12,91	8,34	42,34	426,03	23,00	3,30	19,70	10,87	18,15	18,32	7,88
<b>C06</b>	11,58	8,48	40,36	464,87	22,80	1,80	21,00	9,27	17,33	17,50	6,13
<b>C07</b>	13,33	8,84	46,05	394,07	23,80	4,60	19,20	11,87	18,10	18,52	9,05
<b>C08</b>	13,75	8,69	45,51	393,29	24,10	5,00	19,10	10,20	18,48	18,90	9,43
<b>C09</b>	12,56	9,03	45,35	412,22	23,60	3,70	19,90	8,77	17,58	17,97	8,03
<b>C10</b>	13,68	8,33	44,52	397,28	23,70	5,00	18,70	10,05	18,43	18,83	9,28
<b>C11</b>	13,28	8,28	43,78	405,09	23,50	4,60	18,90	9,53	18,15	18,55	8,77

Tabla 3. Variables bioclimáticas correspondiente a las diferentes características de precipitación y radiación de cada una de las poblaciones. Pob., población.

<b>Pob</b>	<b>bio12</b>	<b>bio13</b>	<b>bio14</b>	<b>bio15</b>	<b>bio16</b>	<b>bio17</b>	<b>bio18</b>	<b>bio19</b>	<b>srad</b>
<b>C01</b>	1194	160	34	41,53	446	128	157	435	12764,25
<b>C02</b>	1213	157	39	38,00	439	142	172	427	12434,75
<b>C03</b>	1343	175	42	39,01	487	152	185	476	12529,92
<b>C04</b>	1320	178	37	41,54	492	142	172	484	12762,75
<b>C05</b>	884	96	48	24,53	279	147	157	252	12361,33
<b>C06</b>	863	91	45	24,63	266	145	151	245	12750,00
<b>C07</b>	1180	137	57	25,09	373	203	214	329	12521,42
<b>C08</b>	1171	136	55	25,83	373	202	212	332	12567,58
<b>C09</b>	1148	129	58	24,04	355	201	207	318	12535,75
<b>C10</b>	1226	143	57	26,52	393	210	221	352	12512,08
<b>C11</b>	1229	142	59	25,06	390	215	224	349	12465,17

Tabla 4. Variables ambientales de las diferentes poblaciones estudiadas. Alt., altitud (m); D.Mar., distancia al mar (m); DomLito., dominio litológico

<b>Pob</b>	<b>Alt.</b>	<b>D.mar</b>	<b>DomLito</b>	<b>suelo</b>	<b>Roca</b>
<b>C01</b>	224,32	4571,61	siliceo	umbrisol	Facies graníticas muy deformadas. Heterogéneos
<b>C02</b>	294,83	4673,35	siliceo	umbrisol	Eclogitas
<b>C03</b>	553,20	19363,09	siliceo	umbrisol	Filitas
<b>C04</b>	337,85	8264,42	siliceo	umbrisol	Cuarzo-esquistos, arcosas. Esquistos verdes
<b>C05</b>	179,82	3783,58	siliceo	leptosol	Paraconglomerados, cuarcitas blancas, areniscas y limolitas
<b>C06</b>	589,98	14090,08	siliceo	umbrisol	Ortocuarcitas blancas con tramos pizarrosos
<b>C07</b>	175,47	4598,85	calizo	umbrisol	Areniscas y limos arcillosos
<b>C08</b>	133,01	725,46	calizo	cambisol	Areniscas y limos arcillosos
<b>C09</b>	322,55	11861,40	calizo	umbrisol	Areniscas y arcillas limolíticas
<b>C10</b>	168,32	796,95	calizo	umbrisol	Calizas y argilolitas
<b>C11</b>	201,42	3645,77	calizo	umbrisol	Argilolitas y cuarzenitas

Tabla 5. Variables de la estructura poblacional. Pob., población; N° ind., número de individuos; Tam.pob., tamaño de población

<b>Pob</b>	<b>Area</b>	<b>N° ind.</b>	<b>Tam. pob.</b>	<b>genR</b>	<b>genL</b>	<b>conservacion</b>
<b>C01</b>	4365	3911	G	0	0	B
<b>C02</b>	3301	5.000	G	0,166	0,38	A
<b>C03</b>	588	41	M	--	--	A
<b>C04</b>	26	37	M	--	--	C
<b>C05</b>	7039	>500	G	0,586	0,942	B
<b>C06</b>	1814	>1000	G	0,759	0,982	B
<b>C07</b>	499	>500	G	0	0	B
<b>C08</b>	89	23	M	--	--	B
<b>C09</b>	59	6	P	--	--	A
<b>C10</b>	169	9	P	0,118	0,503	C
<b>C11</b>	1021	28	M	0,454	0,803	C

Tabla 6. Familias eliminadas del espectro florístico por aparecer solo en una población

<b>Población</b>	<b>Familia</b>	<b>Especie</b>
<b>C01</b>	Rhamnaceae	<i>Frangula alnus</i>
<b>C02</b>	Primulaceae	<i>Primula acaulis</i>
	Ranunculaceae	<i>Anemone nemorosa</i>
<b>C04</b>	Woodsiaceae	<i>Cystopteris fragilis</i>
<b>C06</b>	Campanulaceae	<i>Jasione montana</i>
	Polygonaceae	<i>Rumex acetosella</i>
<b>C07</b>	Compositae	<i>Cirsium palustre</i>
	Geraniaceae	<i>Geranium robertianum</i>
	Violaceae	<i>Viola riviniana</i>
<b>C08</b>	Aspleniaceae	<i>Asplenium billotii</i>
<b>C09</b>	Adiantaceae	<i>Adiantum capillus-veneris</i>
	Scrophulariaceae	<i>Scrophularia auriculata</i>
<b>C10</b>	Smilacaceae	<i>Smilax aspera</i>
<b>C11</b>	Iridaceae	<i>Crocoshmia x crocosmiflora</i>
	Oleaceae	<i>Fraxinus excelsior</i>
	Pinaceae	<i>Pinus radiata</i>
	Polypodiaceae	<i>Polypodium sp.</i>

### **CARTOGRAFÍA: hojas utilizadas de la serie MAGNA 50 (IGME)**

- Arce Duarte, J. M. & Fernández Tomás, J. (1976). *Mapa geológico de España E. 1:50000: Vivero*. [Mapa digital] Madrid: Instituto Geológico y Minero de España.
- Espejo Molina, J. A. (1975). *Mapa geológico de España E. 1:50000: Bermeo* [Mapa digital] Madrid: Instituto Geológico y Minero de España
- Fernández Pompa, F. & Piera Rodríguez, T. (1975). *Mapa geológico de España E. 1:50000: Puente deume* [Mapa digital] Madrid: Instituto Geológico y Minero de España
- Fernández Pompa, F. & Fernández Martínez, F. (1977). *Mapa geológico de España E. 1:50000: Cariño* [Mapa digital] Madrid: Instituto Geológico y Minero de España.
- Martínez García, E.; Marquínez, J.; Heredia, N.; Navarro, D. & Rodríguez Fernández, L. R. (1984). *Mapa geológico de España E. 1:50000: Careña-Cabrales* [Mapa digital] Madrid: Instituto Geológico y Minero de España
- Navarro, D. (1986). *Mapa geológico de España E. 1:50000: Ribadesella* [Mapa digital] Madrid: Instituto Geológico y Minero de España
- Olivé Davó, A.; Martín Alafont, J. M.; Ramírez del Pozo, J. & Portero García, J.M. (1982). *Mapa geológico de España E. 1:50000: Castro-Urdiales* [Mapa digital] Madrid: Instituto Geológico y Minero de España
- Portero García, J. M.; Ramírez del Pozo, J.; Olivé Davó, A.; del Olmo Zamora, P.; Aguilar Tomás, M. J. & Martín Alafont, J. M. (1978). *Mapa geológico de España E. 1:50000: Valmaseda* [Mapa digital] Madrid: Instituto Geológico y Minero de España

### **LEGISLACIÓN:**

- Unión Europea. 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. Diario Oficial de las Comunidades Europeas 206, 22 de julio de 1992, pp. 7 a 50.
- España. Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad. Boletín Oficial del Estado, 14 de diciembre de 2007, núm. 299, pp. 51275 a 51327.
- Asturias. Decreto 65/1995, de 27 de abril, por el que se crea el Catálogo Regional de Especies Amenazadas de la Flora del Principado de Asturias y se dictan normas para su protección. Boletín Oficial del Principado de Asturias, 5 de junio de 1995, núm. 128, pp. 6118 a 6120.
- Cantabria. Decreto 120/2008, de 4 de diciembre por el que se regula el Catálogo Regional de Especies Amenazadas de Cantabria. Boletín Oficial de Cantabria, núm. 249, pp. 17608 a 17622.
- Galicia. Decreto 88/2007, de 19 de abril, por el que se regula el Catálogo gallego de especies amenazadas. Diario Oficial de Galicia, 9 de mayo de 2007, núm. 89, pp. 7409 a 7423.
- País Vasco. Decreto Legislativo 1/2014, de 15 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Conservación de la Naturaleza del País Vasco. Boletín Oficial del País Vasco, 19 de mayo de 2014, núm. 92, pp. 2014 a 2158.