

## Efecto de la luz, la temperatura y la competencia en la fase gametofítica de dos helechos nemorales: *Athyrium filix-femina* y *Dryopteris affinis* subsp. *affinis*

Emilia Pangua<sup>1</sup>; Santiago Pajarón<sup>2</sup>

**Resumen.** *Athyrium filix-femina* y *Dryopteris affinis* subsp. *affinis* son dos helechos nemorales que conviven con frecuencia. La viabilidad y la rapidez de germinación de las esporas, así como el posterior crecimiento del gametófito son claves para el éxito competitivo de los helechos en un determinado hábitat.

Se establecieron cultivos monoespecíficos y de ambas especies mezcladas, sometidos a 10°, 15° y 20°C, y a esta última temperatura, a bajas intensidades de luz, de 1.8 a 1.0  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Se calcularon los porcentajes y tiempos de germinación,  $T_{50}$ , y se estudiaron el desarrollo del gametófito y la expresión sexual, teniendo en cuenta que *Athyrium filix-femina* presenta un ciclo de reproducción sexual, mientras que *Dryopteris affinis* subsp. *affinis* es un taxón de apogamia obligada.

Los porcentajes de germinación final fueron elevados en general, siendo algo mayores en los cultivos con esporas mezcladas. Sin embargo, la temperatura influyó claramente en el tiempo de germinación ( $T_{50}$ ), siendo menor en *Dryopteris* a cualquiera de las temperaturas estudiadas. Cultivos con bajas intensidades de luz, alcanzaron altos porcentajes de germinación, disminuyendo significativamente a 1  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , especialmente en *Athyrium*.

La expresión sexual en cultivos con mezcla de esporas a 20°C y 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  en suelo, fue similar a los tres y seis meses, con un alto porcentaje de femeninos en *Athyrium*, favoreciendo un cruzamiento esporofítico, y con un elevado número de esporófitos apógamos en *Dryopteris*. En los cultivos control, monoespecíficos, se formaron mayoritariamente masculinos.

**Palabras clave:** *Athyrium*; *Dryopteris*; expresión sexual; gametófitos; germinación; luz; temperatura

### [en] Effect of light, temperature and competence in the gametophytic phase of two forest ferns: *Athyrium filix-femina* and *Dryopteris affinis* subsp. *affinis*

**Abstract.** *Athyrium filix-femina* and *Dryopteris affinis* subsp. *affinis* are forest ferns that live together frequently. Spore viability and speed in germination, together with gametophyte development are cues for the competitive success of ferns in a certain habitat.

Monospecific and mixed spore cultures were established, and kept at 10°, 15° and 20°C, and at low light intensity, from 1.8 to 1.0  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , the latter at 20°C. Total germination percentages and time ( $T_{50}$ ), were registered in each case. In addition, gametophyte development and sexual expression was studied in both species.

Final germination percentages were generally high, slightly higher in cultures with mixed spores. However, temperature clearly affected germination time that was shorter in *Dryopteris* at all tested temperatures. Cultures at low light intensities reached high germination percentages, decreasing markedly at 1  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , notably in *Athyrium*.

Sexual expression in mixed cultures, on soil at 20°C and 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , was similar after three and six months. *Athyrium* showed high percentages of female gametophytes promoting sporophytic outcrossing, while *Dryopteris* showed a high number of apogamous sporophytes.

**Keywords:** *Athyrium*, *Dryopteris*, sexual expression, gametophytes, germination, light, temperature

## Introducción

*Athyrium filix-femina* (L.) Roth y *Dryopteris affinis* (Lowe) Fraser-Jenkins subsp. *affinis* (en adelante nombradas como especies o *Athyrium* y *Dryopteris*), son dos helechos que habitan en bosques húmedos y umbrosos donde, cuando conviven, pueden ser dominantes. El primero es más abundante y de distribución más amplia, Reino Holártico y algunos puntos aislados de la costa pacífica de América del

sur, mientras que el segundo queda más restringido al oeste de Europa y noroeste de África (Salvo 1990).

Los helechos producen una inmensa cantidad de esporas, cuya viabilidad, rapidez de germinación y el posterior desarrollo del gametófito son fundamentales para el establecimiento con éxito del esporófito. El presentar un gametófito de vida libre supone una limitación para su establecimiento, ya que en esta fase son más susceptibles de ser eliminados (Page 2002).

<sup>1</sup> Unidad de Botánica. Departamento de Biodiversidad, Ecología y Evolución. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. C/ José Antonio Novais 12. 28040 Madrid (Spain)

Email: epangua@ucm.es  
ORCID: 0000-0003-3884-3807

<sup>2</sup> Unidad de Botánica. Departamento de Biodiversidad, Ecología y Evolución. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. C/ José Antonio Novais 12. 28040 Madrid (Spain)

Email: spajbot@ucm.es  
ORCID: 0000-0003-2499-9341

El éxito en la germinación viene determinado fundamentalmente por la luz, la temperatura, (Page 1979; Raghavan, 1989), la gravedad y el calcio, así como las giberelinas y el anteridiógeno (Schneller 2008; Suo et al. 2015). Estos factores afectan al establecimiento de los gametófitos, además de la producción y dispersión de las esporas (Rose & Dassler 2017 y referencias incluidas).

Generalmente se acepta que la distribución de los helechos en muchos casos está determinada por factores como el clima o el sustrato, ya que pueden dispersarse a grandes distancias y establecerse a partir de una sola spora por su capacidad de autofecundación (Tryon 1986; Barrington 1993), aunque para algunos autores (Richard et al. 2000; Wild & Gagnon 2005) más que la capacidad de dispersión es la disponibilidad de un hábitat adecuado la responsable de su distribución.

*Athyrium filix-femina* es una especie diploide con un ciclo de reproducción sexual característico, mientras que *Dryopteris affinis* subsp. *affinis* también diploide, es un taxón con apogamia, esto es, que produce esporófitos sin que haya una fusión sexual, por lo que podemos suponer que su ciclo reproductivo será más rápido (Whittier 1970; Gastony & Haufler 1976; Sheffield 2008).

Dada la convivencia de estos dos taxones en bosques frescos y húmedos, así como su capacidad para formar parte del banco de esporas (Schneller 1988; Schneller et al. 1990; Dyer & Lindsay 1992; Esteves & Dyer 2003) y la posibilidad de interacción entre sus gametófitos, nuestro objetivo ha sido comprobar si en el desarrollo de ambas especies, independientemente de su modo de reproducción, pueden influir factores abióticos, como la temperatura y la intensidad lumínica (Ranal 1999; Riaño et al. 2015) y por otra parte, si la posible competencia entre sus gametófitos puede favorecer el desarrollo de una de ellas.

## Material y Métodos

### Especies y obtención de esporas

Las esporas fueron obtenidas de una población de cada taxón. Se colectaron frondes fértiles de entre 15 y 20 esporófitos diferentes de cada población y se transportaron al laboratorio. Se lavaron con agua y se prensaron hasta la liberación de las esporas. Cada muestra se obtuvo de la mezcla de las esporas de todos los esporófitos colectados en cada población: *Athyrium filix-femina*: Madrid, entre Navacerrada y el Puerto de Navacerrada. Sustrato granítico. 5/10/2014, S.Pajarón y E. Pangua. *Dryopteris affinis* subsp. *affinis*: Guipúzcoa, San Sebastián, Monte Igueldo. Cunetas de la carretera. 10/10/2014, J.L. Hidalgo.

El índice de aborción esporal (SAI) se calculó en estas poblaciones a partir de cuatro preparaciones de esporas montadas en glicerogelatina, contando las

esporas abortadas de cada 100 en cada una de las preparaciones. En los experimentos llevados a cabo los cálculos de porcentajes de germinación se hicieron sobre las esporas bien desarrolladas. Las siembras se realizaron entre dos y ocho semanas después de su recolección.

### Tratamientos experimentales

Las esporas de ambos taxones se sembraron en medio de cultivo enriquecido con agar (Dyer 1979), previamente esterilizado en autoclave a 20 atm, y 125°C durante 20 minutos. Se utilizaron placas Petri de 5.5 cm de diámetro, esterilizadas, y selladas con Parafilm (American National Can, Chicago) para evitar su desecación. Con el fin de evitar la contaminación se añadió Nystatin (100U ml<sup>-1</sup>). El antifúngico fue añadido al medio después del autoclavado. En todas las siembras las muestras de esporas fueron cribadas a través de dos capas de tejido para lentes (Whatman International Ltd. Maidstone, n° 2105841) para eliminar impurezas, p.ej., restos de esporangios o de paredes esporales, etc.

Se llevaron a cabo diferentes experimentos de cultivo.

### Experimento 1: Efecto de la temperatura y de la interacción esporal en la germinación

Se establecieron cultivos de esporas de ambas especies mezcladas y sin mezclar (monoespecíficas) para comparar el efecto de la temperatura sobre la germinación. Las esporas de *Athyrium* y *Dryopteris* son fácilmente distinguibles por su color y ornamentación. Las placas se incubaron en cámaras de cultivo Ibercex F4, con un fotoperiodo de 16h luz: 8h oscuridad, a 10°, 15° y 20°C. La radiación fotosintética activa (Photosynthetically Active Radiation, PAR) se fijó en 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Se utilizaron 4 placas para cada especie y temperatura tanto para los cultivos monoespecíficos, como los llevados a cabo con las esporas de las dos especies mezcladas (12 placas para cada tipo de cultivo). Una spora se consideró germinada con la emergencia del primer rizoide (Miller 1968).

Se registraron dos variables, el tiempo de germinación, considerado como el número de días necesario para alcanzar el 50% de la germinación final,  $T_{50}$  (Coolbear et al. 1984), y los porcentajes de germinación final. La tasa de germinación se calculó basándose en el conteo de 100 esporas escogidas al azar de cada placa sobre esporas bien desarrolladas, obviando las deformes o abortadas.

### Experimento 2: Efecto de la intensidad de luz en la germinación y desarrollo de los gametófitos

Para comprobar el efecto de la intensidad de la luz sobre la germinación y el posterior desarrollo del ga-

metófito en ambas especies, se utilizaron diversas intensidades de luz con filtros que permitieron obtener PAR de 1.8, 1.25 y 1  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Se utilizaron cuatro placas para cada intensidad de luz. Este experimento se realizó a 20°C ya que fue la temperatura a la que se obtuvo el menor tiempo de germinación en ambas especies. Las placas de los cultivos monoespecíficos de *Athyrium* y *Dryopteris* del experimento 1, a 20°C y 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  se utilizaron como control. Estas bajas intensidades de luz se seleccionaron basándonos en los resultados de Jiménez (2009). El fotoperiodo fue el mismo que en el experimento 1.

La tasa de germinación se calculó en base al recuento de 100 esporas, seleccionadas al azar, de cada una de las cuatro placas cada dos días hasta los 32.

A los 2 meses de cultivo se quitaron los filtros y se mantuvieron los cultivos otro mes a 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A continuación se muestrearon aproximadamente 50 gametófitos al azar entre las cuatro placas para cada intensidad de luz y especie. Los gametófitos muestreados se incubaron en cloral-hidrato-aceto-carmín (Edwards & Miller 1972) durante dos horas en un baño de agua a 50°C. Posteriormente se lavaron en agua destilada, se montaron en un portaobjetos, y se examinaron en un microscopio para comprobar la posible presencia de órganos sexuales y se midieron utilizando un escáner de alta resolución y el programa ImageJ (Abràmoff et al. 2004).

### Experimento 3: Efecto de la interacción de los gametófitos a 20°C

Con objeto de ver la posible interacción entre las especies sobre el desarrollo del gametófito, referidos a su expresión sexual y tamaño, se sembraron esporas de cada una de las especies (cultivos control) y mezcla de las dos especies, con una densidad homogénea, en cajas de plástico transparente de 10x10 cm de lado (Bibby Sterilin, Barloworld Scientific, Stone, Staffordshire, UK). Se rellenaron con suelo comercial (Compo Sana Semilleros Compo. Barcelona) hasta completar 1 cm de profundidad. Se utilizaron 4 réplicas en cada caso, se regaron una vez por semana y fueron selladas con Parafilm para evitar su desecación. Los muestreos se realizaron a los 3 y 6 meses después de la siembra. Las condiciones de cultivo fueron 20°C y 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El fotoperiodo el mismo que en los experimentos anteriores.

Los gametófitos no se confunden, ya que los de *Dryopteris* presentan tricomas y los de *Athyrium*

no. Para cada tiempo de muestreo se seleccionaron de cada una de las 4 cajas de cada especie, de forma aleatoria, dos cuadros de 2x2 cm, muestreando todos los gametófitos que aparecían en ellas. Para su observación al microscopio y obtención de su área, los gametófitos se trataron de la misma forma que en el experimento 2. Se indicó su expresión sexual, masculinos, femeninos, bisexuales o apógamos, cuando se observa un esporófito apógamo en estado inicial o ya desarrollado, aunque estos gametófitos presentaban además anteridios

### Análisis de datos

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVAS de dos vías en el caso del efecto de la especie y la temperatura sobre el tiempo de germinación, y de la especie y la intensidad lumínica sobre el tamaño de los gametófitos. ANOVAS de una vía se realizaron para analizar el efecto del tratamiento (cultivos monoespecíficos y mezclados) sobre la germinación final y el efecto de la intensidad de la luz sobre el porcentaje de la germinación total de cada especie. Todos los análisis se llevaron a cabo con IBM-SPSS-25 (IBM Corp. Released 2017).

### Resultados

El índice de esporas abortadas en la población estudiada de *Dryopteris* fue del 4.5%, mientras que en la de *Athyrium* se redujo al 0.5%

### Efecto de la temperatura y la interacción esporal en la germinación

En todos los casos, a las temperaturas (10°, 15° y 20°C) y tratamientos (esporas en cultivos monoespecíficos y mezcla de las dos especies) estudiados, se alcanza un alto porcentaje en la germinación, entre 80% y 100%. En *Athyrium*, a 10° y 15°C, se observa un 10% menos de germinación en los cultivos mezcla (Fig.1 a, b). En *Dryopteris* estas diferencias son mínimas (Fig. 1 d-f). Al final del experimento solo se observaron diferencias significativas entre cultivos monoespecíficos y mezcla en *Athyrium* a 10° y 15°C ( $F=12.835$ ,  $p<0.05$ ;  $F=37.696$ ,  $p<0.001$  respectivamente). En ambos casos se alcanzó un porcentaje de germinación mayor cuando estaban mezcladas esporas de ambas especies (Fig. 1).

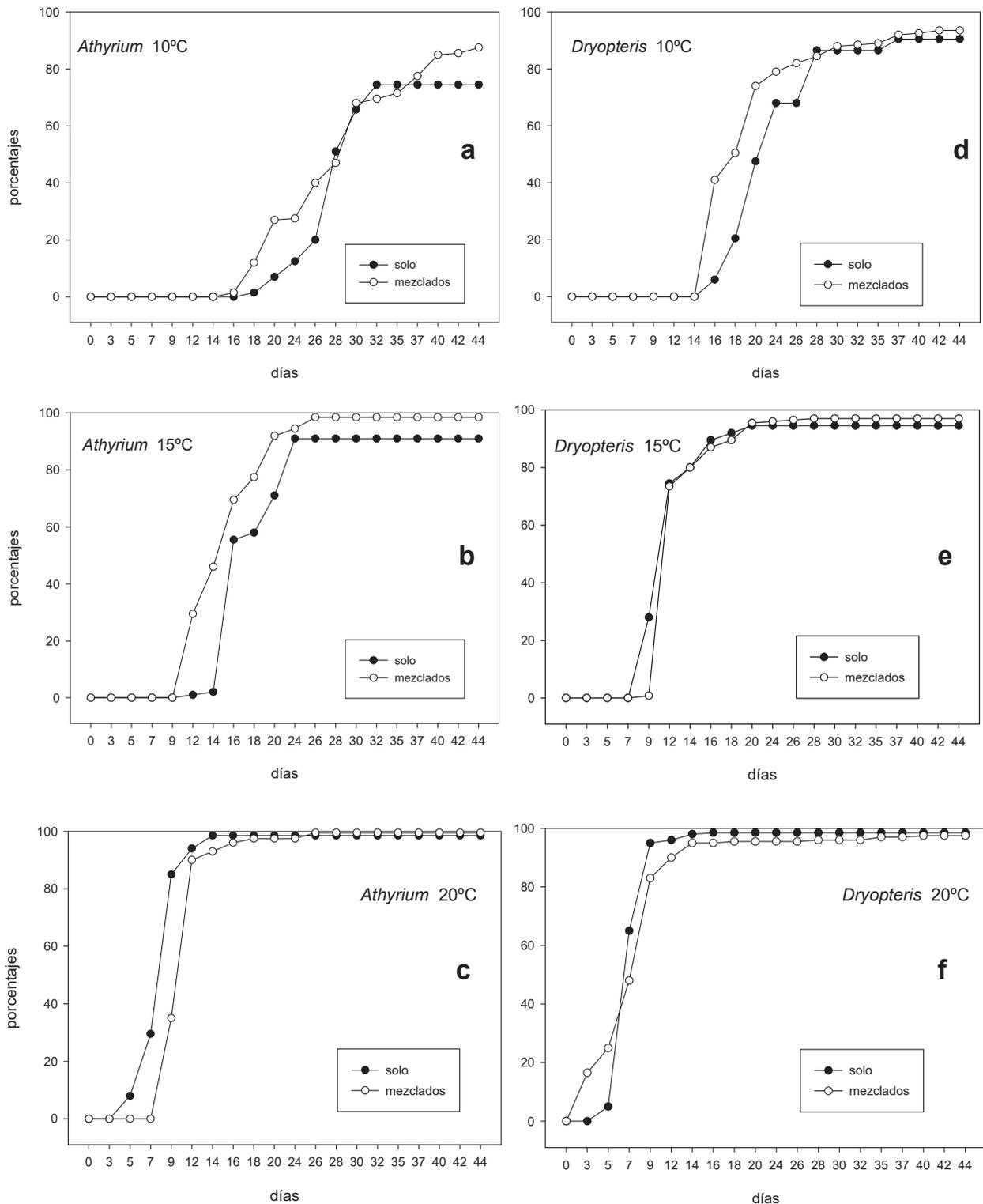


Figura 1.- Porcentajes de germinación a lo largo de 44 días de muestreo a 10°, 15° y 20°C en *Athyrium filix-femina* (a-c) y *Dryopteris affinis* subsp. *affinis* (d-f) en cultivos monoespecíficos (círculos negros) y con esporas mezcladas (círculos blancos).

En cuanto al tiempo de germinación, no se encontraron diferencias entre los cultivos monoespecíficos y mezcla. El análisis del efecto de la especie y de la temperatura sobre el tiempo de germinación,  $T_{50}$ , mostró que existía una interacción estadísticamente significativa entre los efectos de la especie y la temperatura sobre el tiempo de germinación ( $F=36.407$ ,  $p<0.001$ ). Los análisis de efectos princi-

pales simples mostraron que el tiempo de germinación era significativamente más corto en *Athyrium* a 20°C que a 15° o 10°C (Fig. 2). Incluso era significativamente más corto a 15° que a 10°C. Un efecto similar se da en *Dryopteris* donde, además, el tiempo de germinación es significativamente menor que en *Athyrium* para todas las temperaturas estudiadas (Fig. 2).

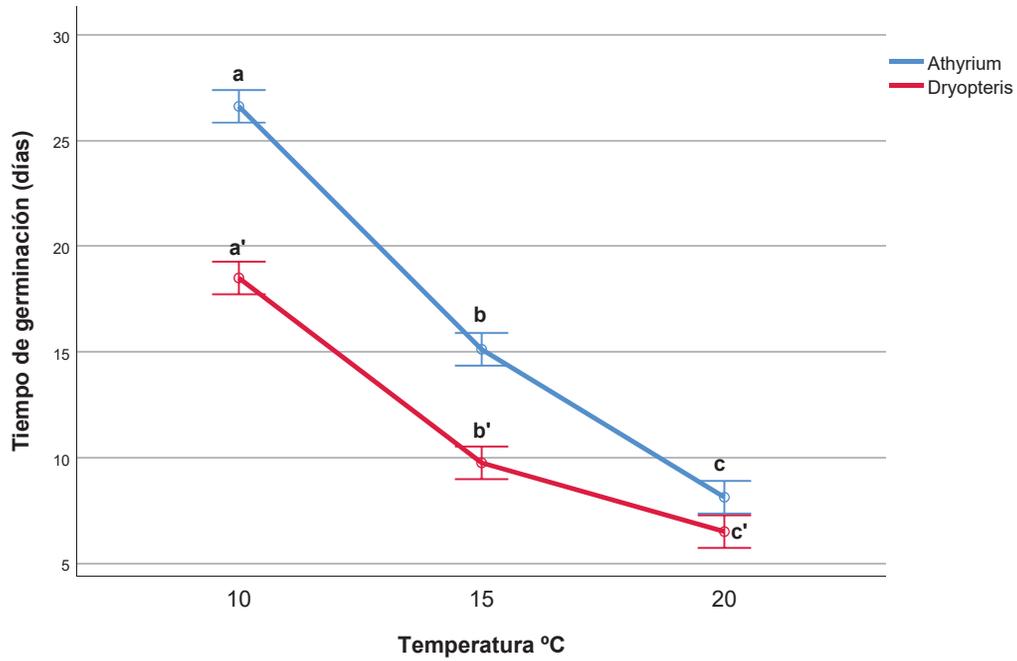


Figura 2.- Tiempo de germinación en días para ambas especies, a 10°, 15° y 20°C. Diferentes letras en el gráfico indican diferencias significativas ( $p < 0.001$ ).

**Efecto de la intensidad de luz en la germinación y desarrollo de los gametófitos**

En ambas especies los porcentajes de germinación finales fueron semejantes excepto para 1  $\mu\text{mol}$

$\text{m}^{-2}\text{seg}^{-1}$  que fueron menores (Fig. 3 a-b), especialmente en *Athyrium*, que no alcanzó el 20%. También en esta especie la germinación a 1,25  $\mu\text{mol}$   $\text{m}^{-2}\text{seg}^{-1}$  fue un 10% menor que para las intensidades más altas.

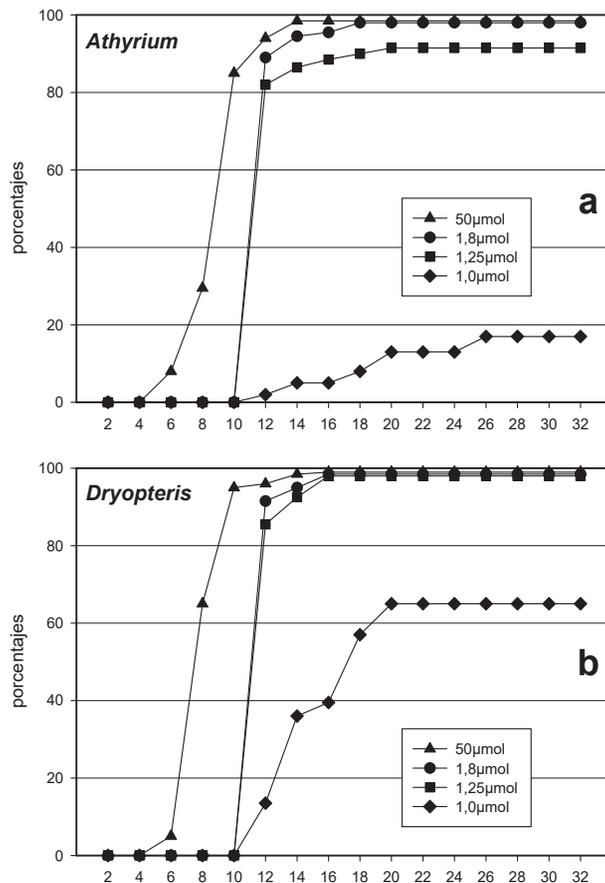


Figura 3.- Porcentajes de germinación a lo largo de 32 días en *Athyrium filix-femina* (a) y *Dryopteris affinis* subsp. *affinis* (b) a diferentes intensidades de luz.

A  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$  la germinación es más rápida que al resto de las intensidades lumínicas estudiadas. A valores de  $1.8$  y  $1.25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$  las esporas retrasan su germinación aproximadamente una semana, pero los valores finales son similares a los del control. Sin embargo, a  $1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$  *Athyrium* no superó el 17% y *Dryopteris* alcanzó algo más del 60% (Fig. 3). Veinte días después de la siembra, una vez estabilizados los porcentajes de germinación, se encontraron diferencias significativas en ambas especies entre la germinación a  $1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$  y la

del resto de intensidades lumínicas (*Dryopteris*,  $F=96,942$ ;  $p<0,001$  y *Athyrium*,  $F=136,065$ ;  $p<0,001$ ).

Transcurridos dos meses desde la siembra, en las placas control ( $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ) se observan gametófitos bien desarrollados (Fig. 4, d y h), sin embargo, a menores intensidades de luz, los gametófitos alcanzaron solamente un estado de pocas células o un pequeño filamento (Fig. 4, a-c y e-g). Tras retirar los filtros, se mantuvieron un mes a  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , y llegaron a formar pequeñas láminas, permaneciendo en estado presexual.

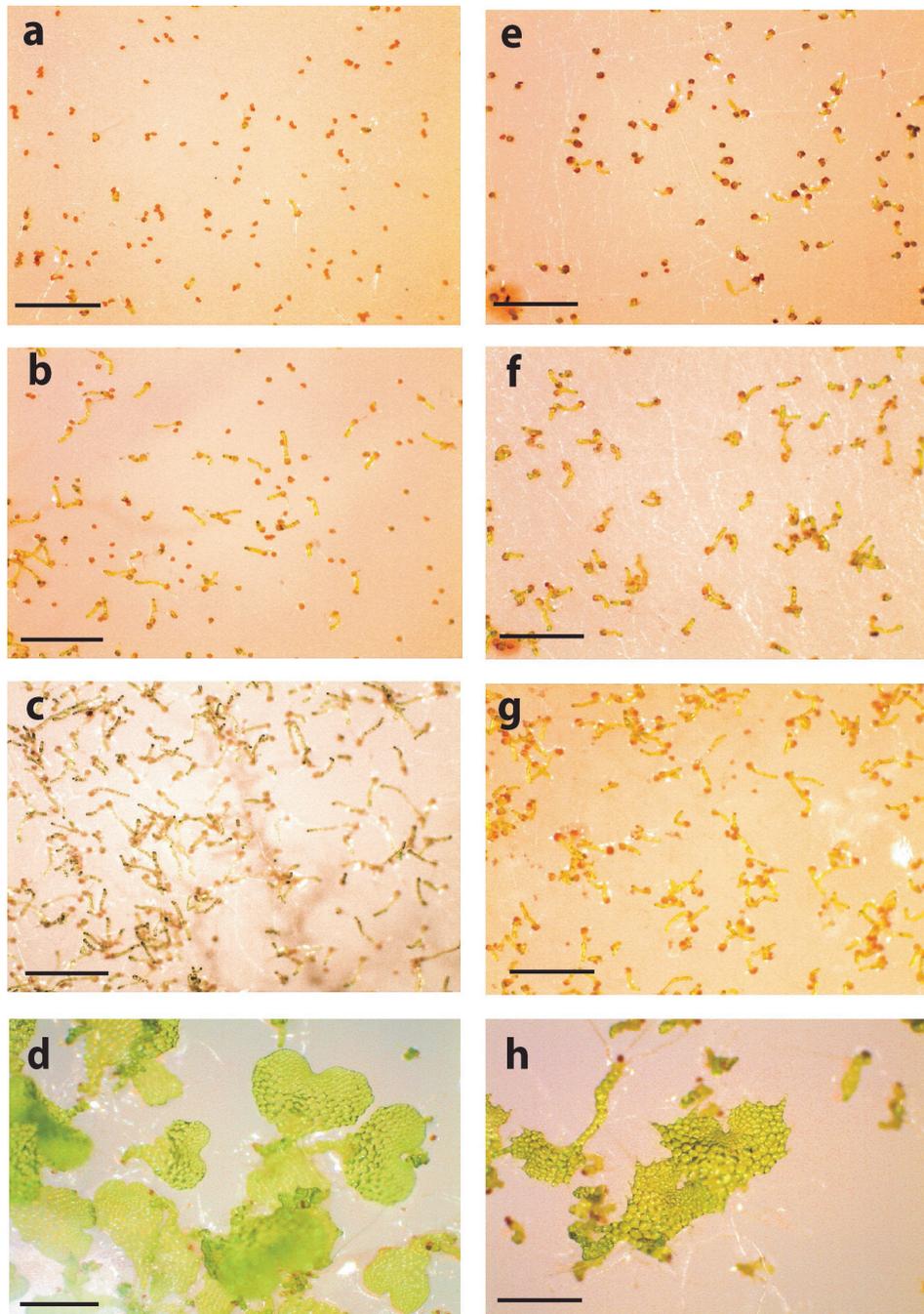


Figura 4.- Fotografías de los cultivos a los dos meses en agar de *Athyrium filix-femina* (a-d) y *Dryopteris affinis* subsp. *affinis* (e-h). a, e:  $1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ; b, f:  $1.25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ; c, g:  $1.8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$  y d, h:  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ . Escala:  $450 \mu\text{m}$ .

En ambas especies, tras estos tres meses, se encontraron diferencias significativas de tamaño entre

el control, más grandes y con algunos gametófitos masculinos, y el resto de las intensidades de luz estu-

diadas (Fig. 5). También mostraron diferencias significativas los gametófitos de *Athyrium* a 1.8  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$  frente a los de 1 y 1.25  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ . En

todos los casos los gametófitos permanecieron con tamaños muy reducidos.

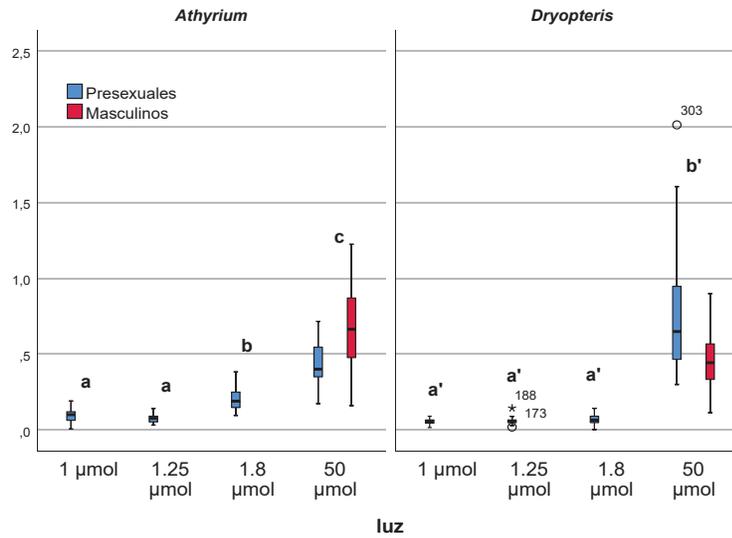


Figura 5.- Medias del tamaño y expresión sexual de los gametófitos de *Athyrium filix-femina* y *Dryopteris affinis* subsp. *affinis* a diferentes intensidades de luz. Diferentes letras en el gráfico indican diferencias significativas ( $p < 0.001$ ).

**Efecto de la interacción de los gametófitos a 20°C**

La expresión sexual de los gametófitos para los tratamientos control y mezcla, a los 3 y 6 meses, refleja algunas diferencias entre *Athyrium* y *Dryopteris* (Fig.

6). En los cultivos control el porcentaje de masculinos es muy elevado en ambas especies, especialmente a los tres meses, que ronda el 80%.

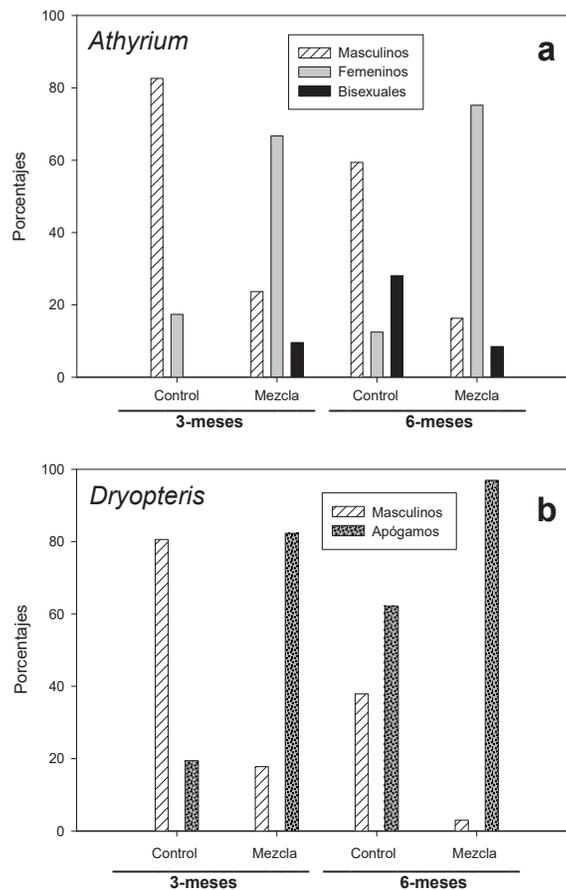


Figura 6.- Porcentajes de las diferentes expresiones sexuales para los distintos tratamientos: control (cultivos monoespecíficos) y mezcla (cultivos de ambas especies juntas) a los 3 y 6 meses de cultivo.

En *Athyrium* se observan masculinos, femeninos y bisexuales, tanto en la mezcla a los 3 meses como en ambos tratamientos a los 6 meses (Fig. 6a). En cuanto al éxito reproductivo en esta especie se observó, a los seis meses, un 6% de esporófitos en los gametófitos femeninos en los cultivos mezcla.

En *Dryopteris* en los cultivos mezcla, a los tres meses, un 80% de gametófitos con anteridios habían desarrollado esporófitos apógamos, y un 20% en el cultivo control (Fig. 6b). A los 6 meses, en las placas control, más del 60% de los gametófitos habían desarrollado esporófitos apógamos, llegando casi al 100% en los cultivos mezcla. Estos esporófitos, llegaron a formar hasta seis hojas bien desarrolladas.

En relación con los tamaños obtenidos (Fig. 7) se observó un comportamiento muy diferente entre

ambas especies. En el caso de los gametófitos de *Athyrium*, a los 3 meses alcanzaron mayor tamaño los gametófitos femeninos que crecían en cultivos mezcla que los del control. Estas diferencias disminuyeron a los seis meses. Se mantuvo la relación de tamaño, masculinos < bisexuales < femeninos.

Los gametófitos de *Dryopteris* que permanecieron masculinos presentaron un tamaño menor que los que formaron esporófitos (Fig. 7). En cualquier caso, los gametófitos de *Dryopteris* presentaron un tamaño mucho menor que los de *Athyrium*, por ejemplo, a los seis meses el tamaño medio de los gametófitos con esporófitos apógamos, oscilaba entre 12 y 15 mm<sup>2</sup>, mientras que los valores de los gametófitos femeninos de *Athyrium* variaron entre 44 y 49 mm<sup>2</sup> (Fig. 7).

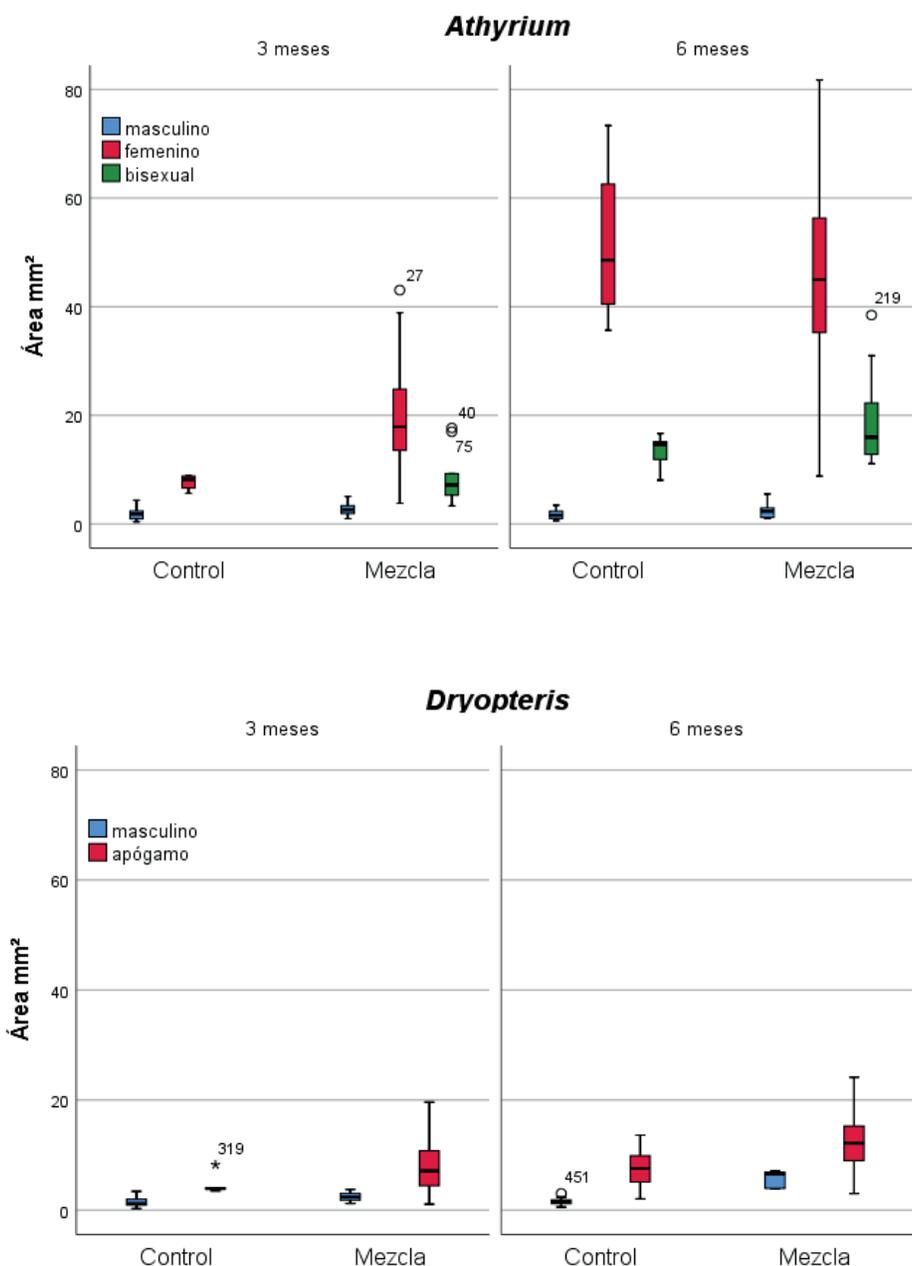


Figura 7.- Área y expresión sexual de los gametófitos para los distintos tratamientos: control (cultivos monoespecíficos) y mezcla (cultivos de ambas especies juntas) a los 3 y 6 meses de cultivo.

## Discusión

### Efecto de la temperatura y la interacción esporal en la germinación

El porcentaje de esporas viables germinadas fue muy alto en todos los casos, especialmente a 20°C. En la mayor parte de los helechos estudiados se alcanza una germinación óptima entre 15°-30°C (Miller 1968; Raghavan 1989).

Hay que tener en cuenta que el índice de aborción esporal (SAI) fue más elevado en *Dryopteris* que en *Athyrium*, datos que coinciden con los encontrados por Hornykch & Ekrt (2017) para ambas especies y por Quintanilla & Escudero (2006) para varias poblaciones de *Dryopteris affinis* de Galicia. En *Athyrium*, la tasa de germinación final aumenta cuando sus esporas están mezcladas con las de *Dryopteris*, lo que favorecería el desarrollo de los gametófitos de *Athyrium* cuando conviven. Además, esta especie produce hojas fértiles desde junio hasta septiembre, por lo que el número de esporas originado es mayor que en *Dryopteris*, donde el número de hojas fértiles se establece al inicio de la primavera y es fijo (Schneller 1988; Landi et al. 2012).

El tiempo de germinación fue menor en *Dryopteris*, aunque en ambas especies aumenta al disminuir la temperatura. Estos resultados coinciden con los de Quintanilla & Escudero (2006) para otras especies de *Dryopteris*, donde el tiempo de germinación decrecía al aumentar la temperatura en un rango entre 8°-25°C, independientemente de los porcentajes totales de germinación alcanzados. Ranal (1999) para temperaturas entre 18° y 29°C obtuvo resultados similares en la germinación de especies de bosques mesófilos, donde el menor tiempo de germinación se correspondía con las temperaturas más altas.

Nuestros resultados indicarían una ventaja de *Dryopteris* especialmente a 10°C, temperaturas que se alcanzan al inicio de la primavera, donde el tiempo de germinación se reduce en más de 10 días, aunque con el aumento de la temperatura la diferencia en el tiempo de germinación se va reduciendo notablemente (Fig. 2).

La mayor abundancia de *Athyrium* en los hábitats compartidos, nos sugiere que el establecimiento de estas especies probablemente tenga factores abióticos más limitantes que la temperatura, como por ejemplo la luz, humedad, tipo de suelo, etc. (Raghavan 1989; Ranal 1999; Johnson et al. 2000; Nondorf et al. 2003; Godefroid et al. 2006; Suo et al. 2015), así como la interacción y competencia con otras plantas (Petersen & Fairbrothers 1980; Bremer 2010; Testo et al. 2014).

### Efecto de la intensidad de luz en la germinación y desarrollo de los gametófitos

La luz interfiere en la germinación esporal (Brum & Randi, 2002; Pérez-García et al. 2007; Hiendlmeyer

et Randi 2007; Riaño & al. 2015) y en la expresión sexual de los gametófitos (Hauke 1971; Guillon & Fievet 2003; Jiménez 2009).

En algunos helechos arborescentes que se desarrollan en bosques de niebla, con intensidades de luz de 0.25  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , se han obtenido porcentajes de germinación superiores al 50% (Riaño et al. 2015). Las especies estudiadas por nosotros han mostrado altos porcentajes de germinación, excepto a 1  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$  que experimentan un notable descenso, aunque superando el 20% de germinación. Estos resultados apoyan la idea de que algunos helechos pueden sobrevivir en el interior de bosques, con condiciones de iluminación demasiado bajas para el desarrollo de angiospermas competidoras (Page 2002).

El máximo desarrollo alcanzado por los gametófitos durante el tiempo del experimento fue el de una lámina de pequeño tamaño para todas las intensidades de luz estudiadas, y sólo en el control se formaron órganos sexuales. Estos datos contrastan con el hecho de que *Athyrium* y *Dryopteris* presentan anteridiógeno, que puede inducir la germinación en oscuridad y el desarrollo de anteridios en gametófitos de pocas células (Schneller 1981; 1988). Nuestros cultivos no reflejaron ningún efecto del anteridiógeno, probablemente debido al escaso desarrollo de los gametófitos (Fig. 4), que no alcanzaron el estado de madurez necesario para producirlo, ya que esta hormona es producida por gametófitos arquegoniados o merísticos (Döp 1950; Näf 1979; Schneller et al. 1990; Schneller 2008).

En cuanto a la expresión sexual, que afecta a los modos de reproducción (Willson 1981; Korpelainen 1998; Hornykch et al. 2021), en las muestras control solo se observaron gametófitos presexuales y masculinos, aunque alcanzaron un tamaño significativamente mayor que a las menores intensidades de luz estudiadas. Muchos de los gametófitos presexuales eran merísticos, con posibilidad de secretar anteridiógeno y favorecer la presencia de masculinos en ambas especies (Schneller 2008). Estos cultivos control, siempre a 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$  y en agar, presentaron diferencias con los cultivos control realizados en sustrato de compost en el experimento tres, con las mismas condiciones de luz y temperatura. Estas diferencias en la expresión sexual pueden deberse, por tanto, al medio de cultivo. Ranker & Houston (2002) indican, en base a los resultados obtenidos por Schneller (1979), que para *Athyrium filix-femina* la expresión sexual de los gametófitos cultivados en medio enriquecido con agar no es un buen indicador de lo que ocurre en la naturaleza, ya que presentan un porcentaje mucho más elevado de gametófitos presexuales.

En definitiva, en las condiciones de baja intensidad lumínica estudiadas, ambas especies presentan elevados porcentajes de germinación, y posterior formación de filamentos con células clorofílicas, por lo que estas condiciones no serían limitantes para el establecimiento de los gametófitos de ninguna de ellas.

## Efecto de la interacción de los gametófitos a 20°C

La interacción entre ambas especies en *Athyrium*, con un elevado porcentaje de gametófitos femeninos, tiende a favorecer el cruzamiento esporofítico, es decir, la fecundación que se produce entre dos gametófitos que provienen de esporas de distintos esporófitos (Hauffler et al. 2016). Por otro lado, en *Dryopteris*, aumenta notablemente el número de esporófitos apógamos, lo que podría favorecer su establecimiento, y una rápida ocupación de los microhábitats compartidos.

El éxito reproductivo, referido a la formación de esporófitos, fue muy elevado en *Dryopteris*, especialmente cuando aparece mezclado con *Athyrium*, ya que, en nuestros cultivos, tras formar anteridios en gametófitos con un área muy reducida, origina esporófitos apógamos en prácticamente la totalidad de los gametófitos. En el caso de *Athyrium* sólo se observaron esporófitos en gametófitos femeninos de los cultivos mezcla a los seis meses, y con un porcentaje de sólo el 6%.

El tamaño alcanzado por los gametófitos de *Athyrium* es mucho mayor que el de los de *Dryopteris*, y en ambos casos, los masculinos fueron de menor tamaño.

El área reducida de los gametófitos de *Dryopteris* estaría relacionada con la mayor rapidez en el crecimiento y maduración de los gametófitos, asociada al tipo de reproducción asexual en la formación del esporófito apógamo (Whittier 1970; Gastony & Hauffler 1976; Huang et al. 2011). Mientras en *Athyrium* los gametófitos femeninos alcanzan un mayor tamaño, necesario para sostener arquegonios funcionales y mantener el desarrollo de jóvenes esporófitos sexuales, en *Dryopteris*, se ahorran recursos en el desarrollo del gametófito, pequeños y sin arquegonios, al comenzar rápidamente el desarrollo del esporófito apógamo.

La formación de anteridios en gametófitos apomícticos quizá sea una respuesta al anteridiógeno y, aunque la presencia de un sistema hormonal controlando la expresión sexual en una especie apógama parezca superflua, juega un papel importante en las interacciones entre estas especies y otras congénicas sexuales (Hauffler & Gastony 1978; Schneller 1981; Hornych et al. 2021). En concreto, se pueden producir híbridos entre especies apomícticas, que en su mayoría no producen arquegonios (Whittier 1968; Bell 1990; Yatskievych 1993), con especies sexuales relacionadas, que a su vez se reproducirán por apogamia (Ekrt et al. 2009; Hornych et al. 2021).

En definitiva, en *Athyrium* se observa un comportamiento habitual en especies sexuales con la formación de gametófitos femeninos numerosos y grandes, necesario para mantener jóvenes esporófitos tras la fecundación. Por el contrario, en *Dryopteris* la estrategia sería favorecer la pronta formación de numerosos esporófitos apógamos para aprovechar la rapidez en la ocupación de espacios favorables.

Sin embargo, en muchos de los hábitats en que conviven ambos taxones, existe una dominancia de *Athyrium* frente a diversas especies de *Dryopteris* (Bremer 2010; Onandia et al. 2013), que también aparece reflejada en los bancos de esporas (Schneller 1988; Esteves & Dyer 2003; Hernández et al. 2012). Esto indica que el dominio de una u otra especie depende, no sólo del gametófito y las interacciones de este con el resto de las plantas con las que convive, sino también de las exigencias ecológicas del esporófito (Johnson et al. 2000; Page 2002).

## Conclusiones

La germinación a las temperaturas estudiadas, así como a las bajas intensidades de luz a 20°C, indican que no serían limitantes para la instalación de poblaciones gametofíticas de estas dos especies, aunque *Dryopteris* presenta un menor tiempo de germinación, y mayor rapidez en el desarrollo del gametófito y formación de esporófitos, como se podía esperar al ser una especie apógama. Sin embargo, en las zonas donde conviven estas especies, existe una dominancia de *Athyrium* frente a *Dryopteris*, reflejada además en sus bancos de esporas.

Es posible que la falta de variabilidad genética en el helecho apógamo merme las facultades de *Dryopteris* frente a *Athyrium*, que mantiene un nivel alto de variabilidad genética al mantener el cruzamiento esporofítico como sistema de reproducción dominante en la naturaleza (Schneller & Holderegger 1997).

Los helechos necesitan un microhábitat que permita el desarrollo de los gametófitos y su reproducción, pero esto no asegura el desarrollo y establecimiento del esporófito, ya que ambas fases pueden presentar diferentes requerimientos ecológicos.

## Referencias bibliográficas

- Abràmoff, M.D., Magelhães, P.J. & Ram, S.J. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36-42.
- Barrington, D.S. 1993. Ecological and historical factors in fern biogeography. *Journal of Biogeography* 20: 275-280. doi.org/10.2307/2845635
- Bell, P.R. 1990. Life cycles of European pteridophytes. In: Rita, J. (ed.), *Taxonomía, Biogeografía y Conservación de Pteridófitos*: 29-37. Institut Menorquí d'Estudis, Societat d'Història Natural de les Illes Balears. Palma de Mallorca.
- Bremer, P. 2010. The colonization of woodland gaps by ferns and horsetails. *Fern Gazette* 18: 308-318.
- Brum, F.R. & Randi, A.M. 2002. High irradiance and temperature inhibit the germination of spores of the fern *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae). *Revista Brasileira de Botânica*. 25: 391-396. / dx.doi.org/10.1590/S0100-84042002012000002.

- Coolbear, P., Francis, A. & Grierson, D. 1984. The effect of low temperature pre-sowing treatment on the germination performance and membrane integrity of artificially aged tomato seeds. *Journal of Experimental Botany* 35: 1609–1617. doi.org/10.1093/jxb/35.11.1609
- Döp, W. 1950. Eine die Antheridienbildung bei Farne fördernde Substanz in den Prothallien von *Pteridium aquilinum* (L.) Kuntz. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 63: 139-147. doi.org/10.1111/j.1438-8677.1951.tb01498.x
- Dyer, A.F. 1979. The culture of ferns gametophytes for experimental investigation. In: Dyer, A. (ed.), *The experimental biology of ferns*: 253-305. Academic Press. London.
- Dyer, A.F. & Lindsay, S. 1992. Soil spore banks of temperate ferns. *American Fern Journal* 82: 89-122. doi.org/10.2307/1547792
- Edwards, M.E. & Miller, J.H. 1972. Growth regulation by ethylene in fern gametophytes. III. Inhibition of spore germination. *American Journal of Botany* 59: 458-465. doi.org/10.1002/j.1537-2197.1972.tb10116.x
- Ekrt, L., Trávníček, P., Jarolímová, V., Vít, P. & Urfus, T. 2009. Genome size and morphology of the *Dryopteris affinis* group in Central Europe. *Preslia* 81: 261-280.
- Esteves, L.M. & Dyer, A.F. 2003. The vertical distribution of live and dead fern spores in the soil of a semi-natural woodland in Southeast Scotland and their implications for spore movement in the formation of soil spore banks. In: Chandra, S. & Srivastava, M. (eds.), *Pteridology in the new millennium*: 261-282. Kluwer Academic Publishers. doi.org/10.1007/978-94-017-2811-9\_20
- Gastony, G.J. & Haufler, C.H. 1976. Chromosomes numbers and apomixes in the fern genus *Bommeria* (Gymnogrammaceae). *Biotropica* 8: 1-11. doi:10.2307/2387815.
- Godefroid, S., Rucquoid, S. & Koedam, N. 2006. Spatial variability of summer microclimates and plant species response along transects within clearcuts in a beech forest. *Plant Ecology* 185: 107-121. doi.org/10.1007/s11258-005-9088-x
- Guillon J.-M. & Fievet, D. 2003. Environmental sex determination in response to light and biased sex ratios in *Equisetum* gametophytes. *Journal of Ecology* 91: 49-57. doi.org/10.1046/j.1365-2745.2003.00744.x
- Haufler, C.H. & Gastony, G.J. 1978. Antheridiogen and the breeding system in the fern genus *Bommeria*. *Canadian Journal of Botany* 56: 1594-1601. doi.org/10.1139/b78-189
- Haufler, C.H., Pryer, K.M., Schuettpelz, E., Sessa, E.B., Farrar, D.R., Moran, R., Schneller, J.J., Watkins, J.E. & Windham, M.D. 2016. Sex and the single gametophyte: Revising the homosporous vascular plant life cycle in light of contemporary research. *BioScience* 66: 928-937. doi.org/10.1093/biosci/biw108
- Hauke, R.L. 1971. The effect of light quality and intensity on sexual expression in *Equisetum* gametophytes. *American Journal of Botany* 58: 373-377. doi.org/10.1002/j.1537-2197.1971.tb09985.x
- Hernández, J.J., Flores, B., Gómez, D., Pajarón, S., & Pangua, E. 2012. El banco de esporas de *Athyrium filix-femina* y *Dryopteris filix-mas* en un pinar de la Sierra del Guadarrama. *Botánica Complutensis* 36: 79-83. doi.org/10.5209/rev\_BOCM.2012.v36.39445
- Hiendlmeyer, R. & Randi, A.M. 2007. Responses of spores and young gametophytes of *Cyathea delgadii* Sternb. (Cyatheaceae) and *Blechnum brasiliense* Desv. (Blechnaceae) to different light levels. *Acta Botanica Brasílica* 21: 909-915. dx.doi.org/10.1590/S0102-33062007000400015.
- Hornych, O. & Ekrt, L. 2017. Spore abortion index (SAI) as a promising tool of evaluation of spore fitness in ferns: an insight into sexual and apomictic species. *Plant Systematics and Evolution* 303: 497-507. doi.org/10.1007/s00606-016-1386-3
- Hornych, O., Testo, W.L., Sessa, E.B., Watkins Jr., J.E., Company, C.E., Pittermann, J. & Ekrt, L. 2021. Insights into the evolutionary history and widespread occurrence of antheridiogen systems in ferns. *New Phytologist* 229: 607-619. DOI: 10.1111/nph.16836
- Huang, Y.-M., Hsu, S.-Y., Hsieh, T.-H., Chou, H.-M., & Chiou, W.-L. 2011. Three *Pteris* species (Pteridaceae: Pteridophyta) reproduce by apogamy. *Botanical Studies* 52: 79-87.
- IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Jiménez, A. 2009. Biología reproductiva y genética de poblaciones de *Dryopteris corleyi* y sus especies parentales, un complejo diploide-poliploide. Tesis doctoral. Universidad Rey Juan Carlos.
- Johnson, G.N., Rumsey, F.J., Headley, A.D. & Sheffield, E. 2000. Adaptation to extreme low light in the fern *Trichomanes speciosum*. *New Phytologist* 148: 423-431. doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00772.x
- Korpelainen, H. 1998. Labile sex expression in plants. *Biological Reviews* 73: 157-180. doi.org/10.1111/j.1469-185X.1997.tb00028.x
- Landi, M., Zoccola, A., Bacaro, G. & Angiolini, C. 2014. Phenology of *Dryopteris affinis* subsp. *affinis* and *Polystichum aculeatum*: modeling relationships to the climatic variables in a Mediterranean area. *Plant Species Biology* 29: 129-137. doi.org/10.1111/1442-1984.12000
- Miller, J.H. 1968. Fern gametophytes as experimental material. *Botanical Review* 34: 361-440. doi.org/10.1007/BF02859133
- Näf, U. 1979. Antheridiogens and antheridial development. In Dyer, A.F. (ed.), *The experimental biology of ferns*. London. Academic Press: 436-470.
- Nondorf, S., Dooley, M., Palmieri, M. & Swatzell, L. 2003. The effects of pH, temperature, light intensity, light quality, and moisture levels on spore germination in *Cheilanthes feei* of southeast Missouri. *American Fern Journal* 93: 55-68. doi.org/10.1640/0002-8444(2003)093[0056:TEOPTL]2.0.CO;2
- Onandia, M., Ametzaga-Arregui, I., San Sebastián, M., Mitxelena, A., Rodríguez-Loinaz, G., Peña, L. & Alday, J.G. 2013. Can understorey native woodland plant species regenerate under exotic pine plantations using natural succession? *Forest Ecology and Management* 308: 136-144. doi.org/10.1016/j.foreco.2013.07.046

- Page, C.N. 1979. Experimental aspects of fern ecology. In: Dyer, A.F. (ed.), *The experimental biology of ferns*: 551- 589. Academic Press. London.
- Page, C.N. 2002. Ecological strategies in fern evolution: a neopteridological overview. *Review of Paleobotany and Palinology* 119: 1-33. DOI: 10.1016/S0034-6667(01)00127-0.
- Pérez-García, B., Mendoza-Ruiz, A., Sánchez-Coronado M. & Orozco-Segovia, A. 2007. Effect of light and temperature on germination of spores of four tropical ferns species. *Acta Oecologica* 32: 172-179. doi.org/10.1016/j.actao.2007.03.012
- Petersen, R.L. & Fairbrothers, D.E. 1980. Reciprocal allelopathy between the gametophytes of *Osmunda cinnamomea* and *Dryopteris intermedia* *American Fern Journal* 70: 73-78. doi.org/10.2307/1546221
- Quintanilla, L. & Escudero, A. 2006. Spore fitness components do not differ between diploid and allotetraploid species of *Dryopteris* (Dryopteridaceae). *Annals of Botany* 98: 609–618. doi.org/10.1093/aob/mcl137
- Raghavan, V. 1989. *Developmental biology of fern gametophytes*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Ranal, M.A. 1999. Effects of temperature on spore soil germination in some fern species from semideciduous mesophytic forest. *American Fern Journal* 89: 149-158. doi.org/10.2307/1547349
- Ranker, T.A. & Houston, H.A. 2002. Is gametophyte sexuality in the laboratory a good predictor of sexuality in nature? *American Fern Journal* 92: 112-118. doi.org/10.1640/0002-8444(2002)092[0112:IGSITL]2.0.CO;2
- Riaño K., Briones, O. & Pérez-García, B. 2015. Spore germination of three tree fern species in response to light, water potential, and canopy openness. *American Fern Journal* 105: 59-72. doi.org/10.1640/amfj-105-02-59-72.1
- Richard, M., Bernhardt, T. & Bell, G. 2000. Environmental heterogeneity and the spatial structure of fern species diversity in one hectare of old-growth forest. *Ecography* 23: 231-245. doi.org/10.1111/j.1600-0587.2000.tb00279.x
- Rose, J.P. & Dassler, C.L. 2017. Spore production and dispersal in two temperate fern species, with an overview of the evolution of spore production in ferns. *American Fern Journal* 107: 136-155. doi:10.2307/44858029
- Salvo, E. 1990. *Guía de helechos de la Península Ibérica y Baleares*. Ediciones Pirámide. Madrid.
- Schneller, J. 1979. Biosystematic investigations on the lady fern (*Athyrium filix-femina*). *Plant Systematics and Evolution* 132: 255-277. doi.org/10.1007/BF00982389
- Schneller, J.J. 1981. Bemerkungen zur Biologie der Wurmfarngruppe. *Farnblätter* 7: 9-17.
- Schneller, J.J. 1988. Spore bank, dark germination and gender determination in *Athyrium* and *Dryopteris*. Results and implications for population biology of Pteridophyta. *Botanica Helvetica* 98: 77- 86. doi.org/10.5169/seals-68572
- Schneller J.J. 2008. Antheridiogens. In: Ranker T.A. & Haufler, C.H. (eds.), *Biology and evolution of ferns and lycophytes*: 134-158. Cambridge University Press. Cambridge. doi.org/10.1017/CBO9780511541827.006
- Schneller, J.J. & Holderegger, R. 1997. Vigor and survival of inbred and outbred progeny of *Athyrium filix-femina*. *International Journal of Plant Sciences* 158: 79-82. doi.org/10.1086/297416
- Schneller, J.J., Haufler, C.H. & Ranker, T.A. 1990. Antheridiogen and natural gametophyte populations. *American Fern Journal* 80: 143-152. doi.org/10.2307/1547202
- Sheffield, E. 2008. Alternation of generations. In: Ranker, T.A. & Haufler, C.H. (eds.), *Biology and evolution of ferns and lycophytes*: 49-74. Cambridge University Press. Cambridge. doi.org/10.1017/CBO9780511541827.003
- Suo, J., Chen, S., Zhao, Q., Shi, L. & Dai, S. 2015. Fern spore germination in response to environmental factors. *Frontiers in Biology* 10: 358-376. doi.org/10.1007/s11515-015-1342-6
- Testo, W.L., Grasso, M.S. & Barrington, D.S. 2014. Beyond antheridiogens: chemical competition between gametophytes of *Polypodium appalachianum* and *Polypodium virginianum*. *Journal of the Torrey Botanical Society* 141: 302-312. doi.org/10.3159/TORREY-D-14-00019.1
- Tryon, R. 1986. The biogeography of species, with special reference to ferns. *Botanical Review* 52: 117-156. doi.org/10.1007/BF02860999
- Whittier, D.P. 1968. Rate of gametophyte maturation in sexual and apogamous forms of *Pellaea glabella*. *American Fern Journal* 58: 12-19. doi.org/10.2307/1546272
- Whittier, D.P. 1970. The rate of gametophyte maturation in sexual and apogamous species of ferns. *Phytomorphology* 20: 30-35.
- Wild, M. & Gagnon, D. 2005. Does lack of available suitable habitat explain the patchy distributions of rare calcicole fern species? *Ecography* 28: 191-196. doi.org/10.1111/j.0906-7590.2005.04113.x
- Willson, M.F. 1981. Sex expression in fern gametophytes: Some evolutionary possibilities. *Journal of Theoretical Biology* 93: 403-409. doi.org/10.1016/0022-5193(81)90112-0
- Yatskievych, G. 1993. Antheridiogen response in *Phanerophlebia* and related taxa genera. *American Fern Journal* 83: 30-36. doi.org/10.2307/1547359.