

Efecto de las interacciones sobre el desarrollo temprano en cultivo *in vitro* de tres musgos comunes en la Península Ibérica

Miguel Ángel Gómez Molinero

Máster en Biodiversidad



MÁSTERES
DE LA UAM
2018 - 2019

Facultad de Ciencias

Máster en Biodiversidad

Efecto de las interacciones sobre el desarrollo temprano en cultivo *in vitro* de tres musgos comunes en la Península Ibérica

Miguel Ángel Gómez Molinero



FACULTAD DE
CIENCIAS

Directora: Belén Estébanez Pérez
Co-directora: Nagore García Medina
Lugar de realización: Unidad de Botánica,
Departamento de Biología

Trabajo Fin de Máster. Curso 2018-2019

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN	3
Importancia ecológica de los musgos y su relación con las interacciones bióticas	4
El ciclo biológico de los briófitos.....	6
Interacciones bióticas en esporas y protonemas de musgos.	7
OBJETIVOS	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
Material vegetal	12
Condiciones de cultivo.....	15
Pruebas preliminares.....	16
1. El método de los pocillos	16
2. Método de las coronas concéntricas de Watson.....	17
3. Método modificado del sándwich	18
Interacciones entre musgos y con lechuga por medio del método del sándwich.....	19
Cruces intra- e interespecíficos de musgos	20
Siembras con semillas de lechuga.....	20
Pruebas para evaluar efectos de hormonas, nutrientes y densidad de esporas sobre <i>D. scoparium</i>	21
Condiciones de cultivo.....	21
Cuantificación del desarrollo del material vegetal receptor.....	21
Análisis estadístico	23
RESULTADOS.....	25
Resultados de los diseños experimentales:	25
1.Método de los pocillos	25
2.Método de las coronas concéntricas de Watson.....	25
3.Método del sándwich	25
Experimentos del sándwich con cruces entre musgos: desarrollo protonemático	27
Germinación de las semillas de lechuga	33
Experimentos con adición de hormonas y nutrientes, y con distintas densidades de esporas (<i>D. scoparium</i>): desarrollo protonemático	34
DISCUSIÓN	36
Diseños experimentales:	36
Efectos sobre el desarrollo protonemático.....	37
Posibles moléculas implicadas en nuestras interacciones.....	40
Efectos sobre la germinación de las lechugas.....	41
Futuras perspectivas.....	43
CONCLUSIONES	46
AGRADECIMIENTOS	46
BIBLIOGRAFÍA	47

RESUMEN

Pese a ser un elemento imprescindible en la dispersión y establecimiento de los briófitos, el pequeño tamaño de sus esporas y su baja diversidad morfológica intra- e interespecífica dificultan el estudio de sus interacciones en cultivo, y ha condicionado que sean una fase peor estudiada que los adultos. En consecuencia, este trabajo tiene un objetivo doble: por un lado, encontrar el método más adecuado para el estudio *in vitro* de las interacciones en esporas y fases tempranas del desarrollo, y por otro, estudiar las interacciones intra- e interespecíficas en distintas fases del desarrollo gametofítico en tres especies de musgos (*Dicranum scoparium* Hedw., *Hypnum cupressiforme* Hedw. y *Tortula muralis* Hedw.). Presentamos una técnica estandarizada para verificar la existencia de alelopatías entre plantas vasculares a partir de una modificación del método del sándwich con material vivo potencialmente alelopático. Empleando esta técnica se evaluaron las interacciones intra- e interespecíficas sobre el desarrollo protonemático de todos los cruces posibles entre ápices y esporas de las tres especies; así como su potencial alelopático en semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), una especie diana estándar en bioensayos de interacciones vegetales. Finalmente, para *D. scoparium* se evaluó en medio líquido el efecto dependiente de la densidad de esporas, y el efecto de algunas hormonas y vitaminas. Los cultivos se analizaron cuantificando el desarrollo y analizando la cobertura final con técnicas de análisis de imagen. Los resultados más destacables muestran que el desarrollo temprano de *D. scoparium* se favorece por la presencia de material vivo de otras especies, Esto apunta a que el desarrollo temprano de *D. scoparium* necesita posiblemente una sustancia orgánica para su desarrollo, y es consistente con la presencia de *D. scoparium* en fases intermedias de la sucesión forestal. En este trabajo, por primera vez, se demuestran interacciones positivas entre protonemas de musgos de distintas especies. Además, se han constatado interacciones negativas y neutras entre los distintos tipos de material vegetal. Destaca el escaso efecto que tienen estas especies sobre las semillas de lechuga, así como el efecto negativo o neutro de hormonas y nutrientes. Estos resultados abren nuevas perspectivas de estudio en el campo de las interacciones bióticas que afectan a briófitos tanto en condiciones controladas como en su medio natural.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, muchos expertos coinciden en que estamos enfrentando la “sexta extinción masiva”, con tasas de extinciones de especies de 100 a 1000 veces mayores que las consideradas naturales (Ceballos *et al.*, 2015, 2017), dato más preocupante aún si tenemos en cuenta que solo conocemos una fracción muy pequeña de las especies del planeta, y que al ritmo de alteración de los ecosistemas, muchas especies se extinguirán antes de que sean registradas (Wilson, 1985; Savage, 1995; Singh, 2002; Valdecasas, 2011).

Esta falta de documentación es aún mayor si tenemos en cuenta que el conocimiento de la biodiversidad va más allá de la categorización de las especies. Así, la diversidad genética y molecular, la estructura de las comunidades y ecosistemas, o las funciones y procesos derivados de las redes de interacciones que establecen los seres vivos entre sí y con el medio, son una parte esencial de la biodiversidad (Halffter, 1994; Swingland & Levin, 2001; Singh, 2002).

De hecho, aspectos de la biodiversidad como el equilibrio en las interacciones bióticas están siendo afectados de forma generalizada por el cambio global (Tylianakis *et al.*, 2008); e incluso se habla de la “extinción de las interacciones” (Valiente-Banuet *et al.*, 2015). Sin embargo, carecemos de información sobre la historia natural y las interacciones bióticas para un gran número de las especies descritas.

Además, el conocimiento acumulado tiene importantes sesgos taxonómicos. Por ejemplo, los insectos están peor representados que las aves en la literatura científica en relación con la cantidad de especies de cada grupo (Troudet *et al.*, 2017). Por su parte, dentro de la botánica, están mejor representados las fanerógamas que otros grupos como las algas o los briófitos. Estos últimos, aunque crecientemente considerados, aún se estudian menos probablemente por ser de menor tamaño, menos atractivos visualmente, no formar parte de nuestra dieta ni de la de nuestro ganado, o estar poco explotados comercialmente (Estébanez *et al.*, 2011; Troudet *et al.*, 2017).

Por lo tanto, son necesarios estudios que analicen las interacciones bióticas en aquellos grupos en los que la información es más escasa, como ocurre, entre las plantas, con los briófitos.

Importancia ecológica de los musgos y su relación con las interacciones bióticas

Los briófitos son un grupo diverso y, según la bibliografía más reciente monofilético (Puttick *et al.*, 2018; Cole *et al.*, 2019; Sousa *et al.*, 2019) que engloba los antocerotas, las hepáticas y los musgos. Se estima que comprende unas 18.000 especies en total, repartidas en 12.800 especies de musgos, 5000 de hepáticas y unas 200 de antocerotas (Vanderpoorten & Goffinet, 2009; Villarreal *et al.*, 2014). Además de ser el segundo grupo más diverso entre las plantas, los briófitos participan en interacciones esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas, incluso en la regulación de los ciclos biogeoquímicos del carbono y del nitrógeno (Zhang & Guo, 2007).

Por ejemplo, se asocian con microorganismos capaces de incorporar nitrógeno a la biosfera (DeLuca *et al.*, 2002; Rousk *et al.*, 2013). *Blasia pusilla* presenta colonias de cianobacterias fijadoras de *Nostoc* en el talo (Figura 1), un fenómeno que está aún más extendido entre los antocerotas (Ligrone *et al.*, 2012a; Liaimer *et al.*, 2016); también podemos encontrar asociaciones micorrícicas u hongos endófitos (Zhang & Guo, 2007; Liepiņa, 2012; Ligrone *et al.*, 2012a; Pressel *et al.*, 2014). De hecho, la hepática *Cryptothallus mirabilis* (actualmente *Aneura mirabilis*) es un parásito obligado que obtiene sus nutrientes indirectamente de las raíces de otras plantas a través de sus micorrizas (Bidartondo *et al.*, 2003).

Las interacciones más estudiadas son las que implican a los musgos de turbera del género *Sphagnum*. Esto es así porque este género es el género dominante amplias zonas de las regiones frías del planeta. Además, tiene un destacado papel en la fijación de carbono a escala global (Van Breemen, 1995; Turetsky *et al.*, 2010), y una importante capacidad de regulación de las condiciones microclimáticas (Jones *et al.*, 1994; Lindo & Gonzalez, 2010; Elbert *et al.*, 2012), de forma que permiten el establecimiento de invertebrados que los emplean como refugio o guardería en las regiones frías del planeta (Kreutz & Foissner, 2006; Božanić *et al.*, 2013).

Otros briófitos ofrecen también ejemplos interesantes de relaciones mutualistas con estos invertebrados ofreciendo refugio a cambio de restos nitrogenados. Es el caso de las hepáticas del género *Frullania* y su relación con los rotíferos (Figura 1) (Puterbaugh *et al.*, 2004; Glime, 2017). En otras hepáticas, estas relaciones pueden derivar incluso a casos de carnivoría, como en *Colura zoophaga* y *Pleurozia purpurea* (Barthlott *et al.*, 2000; Hess *et al.*, 2005).

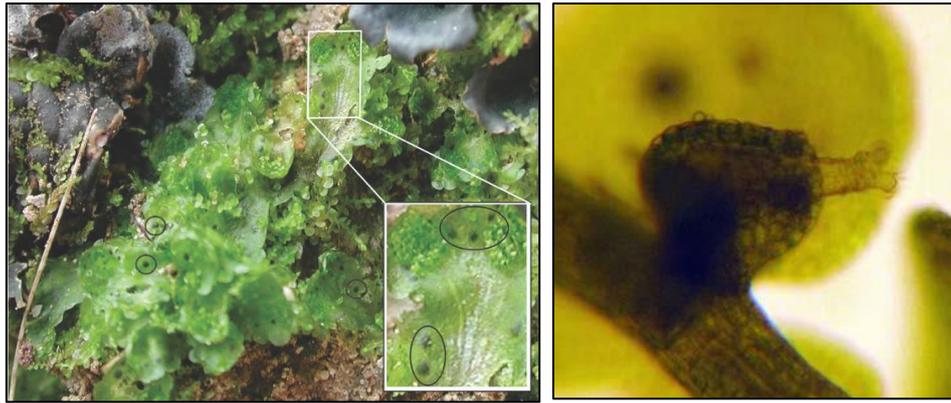


Figura 1. A la izquierda un ejemplar de *B. pusilla* con las colonias de cianobacterias marcadas por círculos (Liaimer *et al.*, 2016). A la derecha, un rotífero bdelloideo en el interior de un anfigastro de *Frullania* (Glime, 2017).

De la misma forma, los briófitos influyen en la germinación de las semillas modulando las condiciones del suelo: por un lado, aumentan la temperatura del suelo y retienen la humedad lo que facilita la germinación (Ohlson *et al.*, 2001; Soudzilovskaia *et al.*, 2011; Gavini *et al.*, 2019); pero también pueden formar una barrera con el sustrato de manera que exponen las semillas a la depredación (Michel *et al.*, 2011; Soudzilovskaia *et al.*, 2011; Bu *et al.*, 2017; Drake *et al.*, 2018). En contrapartida, se han descrito casos donde las plantas vasculares también pueden favorecer (Ohlson *et al.*, 2001; Ingerpuu *et al.*, 2005) o inhibir (Natalia *et al.*, 2008; Basile *et al.*, 2011) el desarrollo de los musgos. En cualquier caso, las interacciones son complejas y se necesitan de estudios más profundos que incluyan más especies.

En algunos casos se sabe que las interacciones de los briófitos con otros organismos están relacionadas con la liberación de metabolitos secundarios que tienen la capacidad de regular el desarrollo y producir tanto efectos positivos como negativos (sustancias alelopáticas en sentido amplio, *sensu* Rice 1984). En este sentido, se han descrito casos en los que estas sustancias inhiben o favorecen la germinación y el desarrollo de semillas (Equihua & Usher, 1993; Basile *et al.*, 2003; Tsubota *et al.*, 2006; Kato-Noguchi *et al.*, 2009, 2010; Michel *et al.*, 2011; Bu *et al.*, 2017; Unal *et al.*, 2017). Este tipo de interacción puede llegar a condicionar la composición florística de las comunidades. Por ejemplo, en bosques boreales se han observado cambios en la vegetación asociados a los efectos de los briófitos sobre la germinación de plantas vasculares (Bechberger *et al.*, 2013), mientras que en Australia se ha observado que los briófitos inhiben la germinación de semillas de plantas alóctonas y contribuyen a controlar las invasiones, lo que puede ser clave para la supervivencia de especies de plantas autóctonas (Morgan, 2006).

Generalmente la presencia de otros musgos supone una pérdida de luz y espacio para el individuo; sin embargo, favorece la retención del agua, y por tanto aumenta el tiempo que son fotosintéticamente activos (Proctor, 2000). Esto genera que las interacciones en briófitos adultos varíen en función de estos dos condicionantes. Así, condiciones de alta humedad y poca luz favorecen las interacciones negativas, y a la inversa (Scandrett & Gimingham, 1989; Pedersen *et al.*, 2001; Fenton & Bergeron, 2006). De hecho, se ha comprobado que estos equilibrios pueden modular la sucesión en comunidades de briófitos: en bosques de abetos de América del Norte, los briófitos más resistentes a la desecación dominan en bosques jóvenes, mientras que en abetales más densos dominan los *Sphagnum* que son menos resistentes (Fenton & Bergeron, 2006; Turetsky *et al.*, 2010).

El ciclo biológico de los briófitos.

Al igual que el resto de las plantas, los briófitos cuentan con dos fases (Figura 2), la gametofítica (haploide) y la esporofítica (diploide). Sin embargo, el ciclo de los briófitos tiene varias particularidades. Por un lado, los briófitos son las únicas plantas en las que la fase dominante es la gametofítica. Además, en estos organismos el gametofito sustenta y nutre al esporofito, que consiste en un único esporangio sobre un eje sin ramificar (Shaw *et al.*, 2011; Ligrone *et al.*, 2012b).

Una característica importante del ciclo de los briófitos es que, tras la germinación de las esporas y antes de que se forme el gametofito adulto (gametóforo), aparece generalmente una fase intermedia de desarrollo, el protonema. En los musgos, a excepción de los grupos basales, el protonema es filiforme y pasa por dos fases en su desarrollo: primero la etapa de cloronema, con células rellenas de cloroplastos y tabiques transversales; y después una segunda fase de caulonema, con menos cloroplastos, paredes más parduzcas y tabiques oblicuos. A partir del caulonema se desarrollan los primeros ápices foliosos que dan lugar al nuevo gametóforo, la fase dominante (Nehira, 1983; Fuertes, 2009; Estébanez *et al.*, 2011; Sabovljevic *et al.*, 2014).

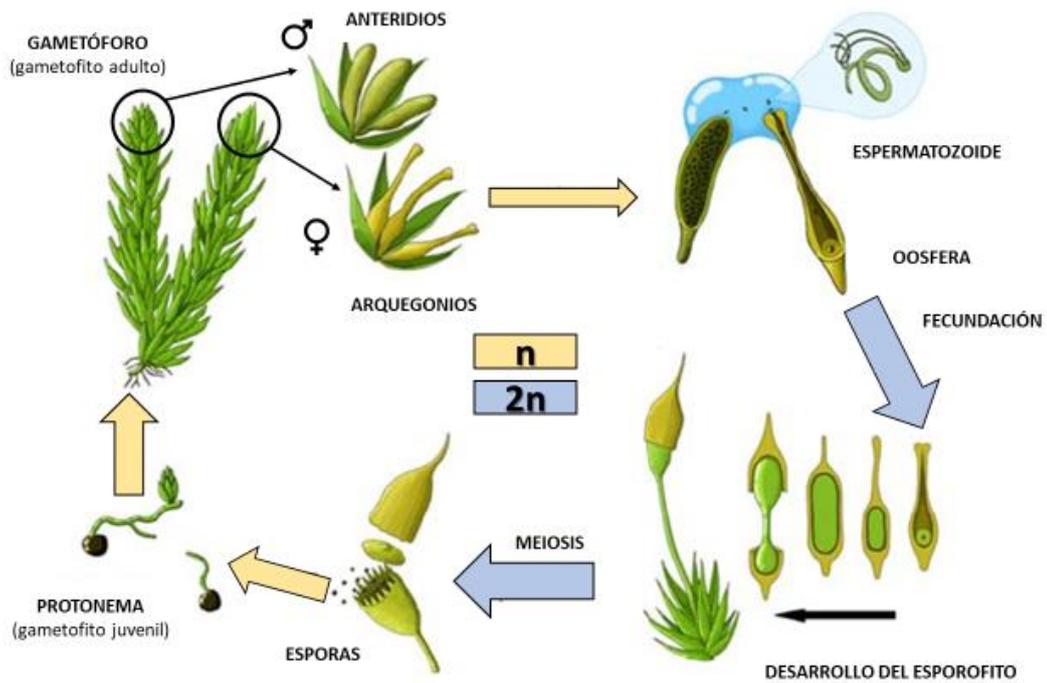


Figura 2. Esquema del ciclo de un briófito con un musgo como modelo. Ilustración de José María Romero León modificada (Estébanez *et al.*, 2011).

El desarrollo de las esporas y los protonemas es una fase crucial en el establecimiento de los briófitos, ya que las esporas son las responsables de las colonizaciones tras perturbaciones catastróficas del medio, como incendios y temporales (Grime *et al.*, 1990; Esposito *et al.*, 1999; Kürschner, 2004) así como de la dispersión a grandes distancias (Muñoz, 2004; Wiklund & Rydin, 2004; Medina *et al.*, 2011; Medina & Estébanez, 2014; Estébanez *et al.*, 2018).

Interacciones bióticas en esporas y protonemas de musgos.

Dado que en el ciclo el gametóforo es la fase dominante en biomasa y longevidad, es la mejor estudiada en cuanto a interacciones bióticas (Scandrett & Gimingham, 1989; Rydin & Rydin, 1993; Økland, 1994; Kooijman & Bakker, 1995; Wilson *et al.*, 1995; Fenton & Bergeron, 2006; Bu *et al.*, 2017), y de hecho, es esta fase la implicada en los estudios que se han comentado hasta el momento.

Con respecto a las esporas la mayor parte de los estudios se han centrado en el análisis de sus requerimientos abióticos. Por ejemplo, se conocen relativamente bien las respuestas de la germinación de a la luz el pH y los nutrientes (Ward, 1960; Wiklund & Rydin,

2004; Bagdatli & Erdağ, 2017). Notablemente, se considera que el sustrato es el principal condicionante del desarrollo de las esporas y que las interacciones bióticas no tienen tanto peso como en las plantas vasculares (Watson, 1980; Wiklund & Rydin, 2004; Michel *et al.*, 2011).

Tal vez por ese motivo, se sabe mucho menos sobre las interacciones bióticas de las esporas y los protonemas que sobre los gametofitos adultos. Sin embargo, los estudios que han analizado las interacciones bióticas han encontrado resultados interesantes que destacan la importancia de las mismas en la germinación y el desarrollo protonemático (Bopp, 1963; Watson, 1981; Mishler & Newton, 1988).

Algunas aproximaciones en el siglo pasado con *Funaria hygrometrica* documentan la existencia de efectos tanto autoinhibitorios como facilitatorios entre los protonemas (Bopp, 1963; Watson, 1981). En su trabajo, Bopp (1963) observó que estas interacciones son complejas y dependen del grado de desarrollo del protonema. Así, la presencia de cloronemas favorece el desarrollo de caulonemas e inhibe el de los ápices foliosos a través de una sustancia hidrosoluble a la que se refiere como factor F; mientras que los caulonemas favorecen el desarrollo de los ápices foliosos e inhiben a otros caulonemas, probablemente por medio de una segunda sustancia que denominó factor H. Además, siembras de esporas de *F. hygrometrica* a distintas distancias muestran que las muestras alejadas unas de otras por 10 mm inhiben la expansión de sus protonemas y mantienen su identidad de forma que no llegan a contactar con los protonemas de otras áreas. Sin embargo, las esporas que se encuentran a menor distancia entran en contacto y forman una red protonemática conjunta (Bopp, 1963; Watson, 1981). Esto sugeriría la existencia de una sustancia autoinhibidora en *F. hygrometrica* que aumenta su efecto con el grado de desarrollo del protonema. Otro estudio informa de que los gametofitos de *Tortula ruralis* (actualmente *Syntrichia ruralis*) y de *Dicranum scoparium* son capaces de inhibir la germinación y el desarrollo de las esporas de la misma *T. ruralis* y de otras tres especies del mismo género (Mishler & Newton, 1988). Nuevamente, las condiciones de trabajo de estos tres experimentos indican que se trata de una interacción modulada por una molécula soluble.

En los últimos años, nuestro laboratorio (Laboratorio de Briología Experimental y de Comunidades de la Universidad Autónoma de Madrid) ha realizado algunos experimentos mediante cultivo *in vitro* aportando nueva información con respecto al desarrollo de los protonemas. Por una parte, un trabajo con distintas densidades de esporas

de *Tortula muralis* demostró la existencia de un efecto autoinhibitorio que retrasa la germinación de las esporas e inhibe el desarrollo protonemático siguiendo una curva de dosis-respuesta (Figura 3). Este efecto inhibitorio no está relacionado con el agotamiento de nutrientes, dado que se comprobó que su concentración en el medio en cultivos de baja densidad de esporas, con mayor grado de desarrollo, era similar a la de los cultivos con desarrollo inhibido, con alta densidad de esporas. Por lo tanto, probablemente la inhibición esté provocada por la acción de alguna molécula liberada en el medio (Núñez *et al.*, 2011). Otros autores han encontrado respuestas similares con *Physcomitrella patens* (actualmente *Physcomitrium patens*), cuyas esporas y protoplastos se desarrollan menos cuando la densidad de cultivo es alta (Johri & Desai, 1973; Schween *et al.*, 2003).

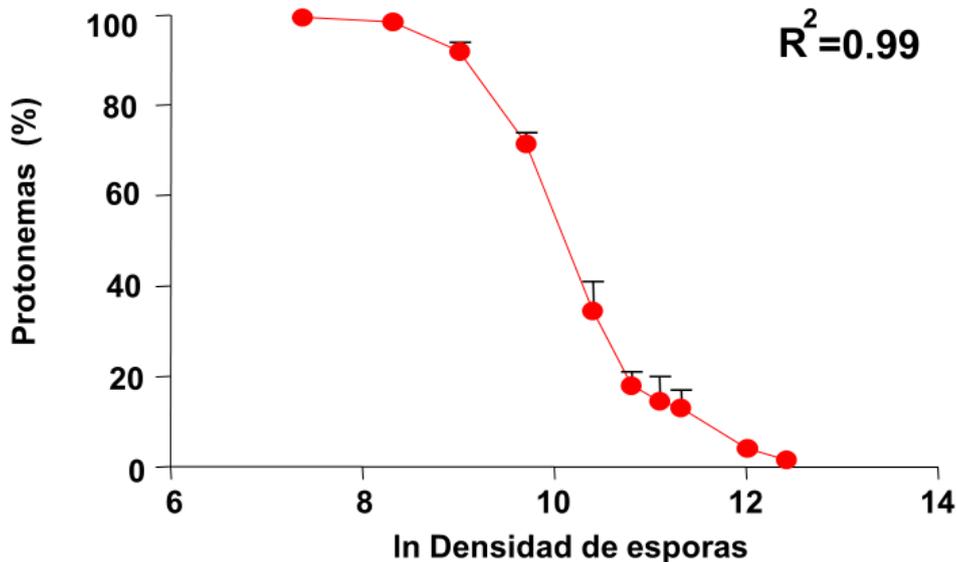


Figura 3. Porcentaje de esporas de *T. muralis* que se desarrollan hasta protonema en función de la densidad de esporas expresada en escala logarítmica (logaritmos neperianos). Modificado de Núñez *et al.* (2011). Los resultados se ajustan bien a una curva dosis-respuesta, lo que indicaría que la densidad de esporas se está comportando de manera similar a un veneno con respecto a su propio desarrollo.

Posteriormente, efectos autoinhibitorios similares, siguiendo una curva dosis-respuesta, se constataron en otras 5 especies: *Grimmia pulvinata*, *Orthotrichum striatum*, *Bryum capillare*, *Hypnum cupressiforme* y *F. hygrometrica*. Además, se encontraron efectos inhibitorios interespecíficos por parte de esporas y protonemas de *T. muralis* sobre la germinación y el desarrollo protonemático de *G. pulvinata*, *O. striatum* y *F. hygrometrica* (García-Redondo & Estébanez, 2013). Finalmente, los gametóforos de *G. decipiens* y *O. rupestre* también parecen tener una capacidad inhibitoria intra- e interespecífica sobre el desarrollo protonemático como muestra la Figura 4 (Collado *et al.*, 2017).

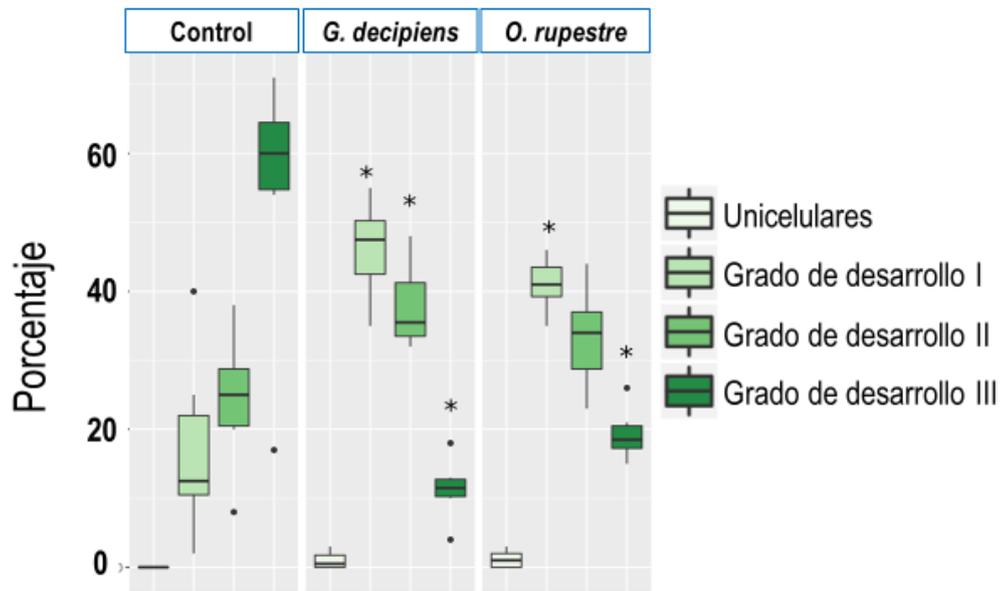


Figura 4. Porcentaje de grados de desarrollo de los protonemas de *O. rupestris* cuando se cultivan solos (control), con gametofitos maduros de *G. decipiens* y con gametofitos maduros de *O. rupestris*. Grado de desarrollo I: Cloronemas; Grado de desarrollo II: protonemas con formación de caulonema y menos de 25 células; Grado de desarrollo III; protonemas con caulonemas y más de 25 células. Modificado de Collado *et al.* (2017). Mientras que en el control la mayoría de los protonemas alcanzan el máximo desarrollo, la presencia de ápices (de su misma especie o de una especie distinta) condiciona una sustancial reducción de esta categoría.

Es probable que estos procesos jueguen un rol en el establecimiento y distribución de los briófitos; pero como se ha comentado, buena parte del conocimiento proviene de experimentos *in vitro*. La razón es que el pequeño tamaño y la baja diversidad morfológica de las esporas dificultan trabajar con ellas en el campo. En contraste, el cultivo *in vitro* de los musgos a partir de esporas y material vegetativo es relativamente fácil y lleva desarrollándose desde hace más de dos siglos en centenas de especies (Servettaz, 1913; Maheu, 1922; Basile & Basile, 1988; Sargent, 1988; Reski, 1997; Sabovljevic *et al.*, 2003; Bijelovi *et al.*, 2004; Rowntree, 2006; Vujičić *et al.*, 2009, 2011; Beike *et al.*, 2015; Bagdatli & Erdağ, 2017). Además, su simplicidad estructural y la facilidad para generar mutantes *knockout* o introducirles genes los convierten en un buen modelo de investigación (Cove *et al.*, 1997, 2006; Beike *et al.*, 2015), incluso pueden ser empleados como biorreactores de fármacos (Huether *et al.*, 2005; Reski *et al.*, 2015; Michelfelder *et al.*, 2017). Esto justifica que el cultivo *in vitro* haya sido la metodología empleada para investigar la biología de las esporas y los protonemas. Aunque la baja diversidad morfológica de las esporas (y en muchos casos los protonemas) complica enormemente el análisis de distintas especies cultivadas conjuntamente, el trabajo de García-Redondo *et al.* (2013) muestra que los resultados son interesantes.

Según lo anteriormente comentado, este Trabajo de Fin de Máster se planteó como una contribución a la investigación acerca de las interacciones entre distintas fases del desarrollo del gametofito de los musgos las esporas y los gametofitos adultos.

Se seleccionaron tres aspectos prioritarios en este estudio. En primer lugar, se abordó la exploración y puesta a punto de métodos eficaces que permitieran solventar las dificultades de analizar individualmente esporas y protonemas de dos especies cultivadas conjuntamente (manteniendo la posibilidad de interactuar). En segundo lugar, se han explorado los posibles efectos de gametóforos y esporas de briófitos sobre plantas vasculares, empleando para ello semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), una planta normalmente usada en bioensayos. Como especies modelo se han seleccionado musgos comunes en la Península Ibérica que son además abundantes en el Sistema Central. La selección tiene varias ventajas, se centra en especies relevantes para la estructura y composición de los ecosistemas ibéricos y facilita el desarrollo de líneas de investigación futuras orientadas a analizar interacciones de musgos en campo.

OBJETIVOS

1. Estandarizar una técnica que permita estudiar los efectos alelopáticos en briófitos de manera que puedan interactuar con moléculas liberadas al medio y podamos distinguir distintas poblaciones de esporas.
2. Explorar y comparar los posibles efectos alelopáticos sobre el desarrollo temprano de las esporas de tres especies de musgos (*Dicranum scoparium*, *Hypnum cupressiforme* y *Tortula muralis*) en coexistencia intra- e interespecífica con gametóforos y con otras esporas.
3. Investigar posibles efectos de estas tres especies de musgos sobre la germinación y desarrollo de semillas en una especie modelo en bioensayos (*Lactuca sativa*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Para la selección del mejor método experimental se emplearon dos especies de la misma familia (Pottiaceae). La mayor parte de las pruebas se realizaron con la especie *Tortula muralis* Hedw., ya que sus esporas habían mostrado un efecto autoinhibitorio previamente en nuestros resultados (Núñez *et al.*, 2011; Collado *et al.*, 2017). Además, se empleó material de la especie *Syntrichia ruralis* (Hedw.) Weber & D. Mohr para una de las pruebas metodológicas, una especie que ha demostrado un buen comportamiento en la germinación *in vitro* en otros proyectos del laboratorio (Gijón *et al.*, 2019).

Posteriormente, tras decidir y poner a punto el método más adecuado de cultivo, se optó por probar las interacciones entre tres especies de musgos comunes en la Península Ibérica y en la Comunidad de Madrid: *T. muralis*, por las razones ya comentadas, *Hypnum cupressiforme* Hedw. y *Dicranum scoparium* Hedw. Estas últimas son especies relativamente grandes, lo que facilita su manejo y además, coexisten en el medio natural (Vicente & Ron, 1989; Stebel *et al.*, 2015), por lo que potencialmente podrían tener mayor interacción.

Para las pruebas con material vegetativo se emplearon los ápices en buen estado, no fértiles, y sin signos de enfermedad, como recomiendan Basile & Basile (1988). Las cápsulas se seleccionaron maduras, operculadas y con un aspecto semejante entre las de una misma especie para asegurar la homogeneidad.

Las semillas de lechuga empleadas corresponden a una variedad de cultivo (*Iceberg*), que germina fácilmente y en altas tasas. Se recoge en la cada Tabla 1 la procedencia (lechuga) y etiquetas de recolección (musgos), así como en qué siembras se empleó cada material.

T. muralis (Fam. Pottiaceae, O. Pottiales) es un musgo acrocárpico de pocos milímetros de altura; forma desde pequeñas almohadillas hasta densos céspedes. Los filidios presentan un nervio excurrente en una punta hialina no espinosa, son retorcidos espiralmente en seco, y patentes cuando están húmedos. El esporofito se produce de primavera a verano, presenta una seta de aproximadamente 1 cm, y la cápsula es cilíndrica con un opérculo cónico y una coronas de 16 dientes profundamente divididos que se retuercen en espiral. Presenta una distribución cosmopolita en las regiones templadas y tropicales de poca altitud, muy común en zonas urbanas mediterráneas. Es saxícola de sustratos básicos, como rocas calcáreas o muros de hormigón (Cortini, 2001; Dierßen, 2001; Smith, 2004; Casas *et al.*, 2006; Guerra & Cros, 2006).

Tabla 1. Información de recolección de los musgos empleados y número de las siembras en las que se emplearon (véase la parte de cultivos en material y métodos).

Identificación	Recolección	Siembras de cápsulas	Siembras de ápices
<i>Syntrichia ruralis</i> (Hedw.) F. Weber & D. Mohr	España: Castilla la Mancha, Guadalajara, Atienza: en los alrededores del castillo, sobre tierra depositada en roca. 40.54266, -3.69180, 1220 m. <i>Leg. & det.</i> : B. Estébanez Pérez, 5-VII-2018.	1	-
<i>Tortula muralis</i> Hedw.	España: Comunidad de Madrid, Madrid: junto al Metro de Lago, en el muro del Arroyo de Meaques. 40.417020, -3.735322, 600 m. <i>Leg. & det.</i> : B. Estébanez Pérez, 10-VI-2018.	1, 2, 3, 6, 9, 10, 11, 12 y 14	10, 11, 12, y 15
<i>Hypnum cupressiforme</i> Hedw.	España: Comunidad de Madrid, Bustarviejo: junto a la carretera M-629, de Miraflores a Canencia, en los alrededores de la Fuente del Brezal, en un talud de la carretera, terrícola. 40.8302, -3.7669, 1260 m. <i>Leg. & det.</i> : B. Estébanez Pérez, 17-I-2019.	-	7 y 8
	España: Comunidad de Madrid, Canencia: junto a la carretera M-629, de Miraflores a Canencia, a unos 200 m de distancia del río, en la linde del melojar, sobre tierra acumulada en bases de árboles. 40.8880, -3.7742, 1250 m. <i>Leg. & det.</i> : Belén Estébanez Pérez, 17-V-2018.	5, 7, 8 y 11	-
	España: Castilla la Mancha, Guadalajara, Atienza: junto a la carretera CM-110, cerca del PK 60, terrícola en un pinar de repoblación. 41.217197, -2.984661, 1150 m. <i>Leg. & det.</i> : B. Estébanez Pérez, 5-VII-2018.	11 y 13	13 y 15
	España: Comunidad de Madrid, San Lorenzo del Escorial: alrededores de La Silla de Felipe II, sobre tierra acumulada en bloques de granito. 40.56806, -4.15250, 1060 m. <i>Leg. & det.</i> : B. Estébanez Pérez, 7-IV-2019.	9	9
<i>Dicranum scoparium</i> Hedw.	España: Comunidad de Madrid, Bustarviejo: junto a la carretera M-629, de Miraflores a Canencia, en los alrededores de la Fuente del Brezal, en un talud de la carretera, terrícola. 40.8302, -3.7669, 1260 m. <i>Leg. & det.</i> : B. Estébanez Pérez, 17-I-2019.	-	4 y 5
	España: Castilla y León, Ávila, Peguerinos: en el suelo de un pinar, cerca del campin. 40.653627, -4.205538, 1455 m. <i>Leg. & det.</i> : B. Estébanez Pérez, 5-XII-2018.	4, 5 y 7	-
	España: Extremadura, Cáceres, Alía: junto a la carretera EX-118, en una pista de tierra a unos 50 m del inicio. 39.480093, -5.339471, 1350 m. <i>Leg. & det.</i> : B. Estébanez Pérez, 18-VII-2018.	6, 10, 13 y 16	6 y 15
<i>Lactuca sativa</i> L.	Semillas de lechuga Iceberg nº4 distribuidas por Seekay Hort Supplies. Envasado en 2018, caducidad en 2020.	Semillas empleadas en las siembras 13, 14 y 15	

S. ruralis (Fam. Pottiaceae, O. Pottiales) también es acrocárpico, crece en céspedes densos puede alcanzar hasta 8 cm de altura cuando las condiciones son favorables. Los filidios se retuercen helicoidalmente y son adpresos en seco mientras que pasan a ser de escuarrosos a recurvados en húmedo. Los filidios tienen un nervio excurrente en punta hialina espinulosa. El esporofito es estival, tiene una seta de 1-2 cm y una cápsula cilíndrica con 16 dientes divididos que se disponen retorcidos. Es una especie cosmopolita de regiones templadas y tropicales desde el nivel de costa hasta el nival; común en la península Ibérica y Baleares. Puede colonizar diversos sustratos: rocas, suelos calcáreos, yesíferos y salinos y aparece también como sobre árboles (Cortini, 2001; Dierßen, 2001; Smith, 2004; Casas *et al.*, 2006; Guerra & Cros, 2006).

H. cupressiforme (Fam. Hypnaceae, O. Hypnales) es un musgo pleurocárpico de ramificación pinnada, de porte mediano a robusto. Puede formar grandes tapices de alta densidad. De hecho, es frecuente que se desarrolle así en la Sierra de Guadarrama. Los filidios son falcado-secundos, con forma de hoz y orientados en la misma dirección, de disposición julácea en húmedo y seco. El esporofito es otoñal con una seta de unos 2 cm aproximadamente y una cápsula cilíndrica de erecta a curvada de color pardo anaranjado, un opérculo rostrado y dos coronas de 16 dientes cada una. También es una especie cosmopolita presente desde las regiones boreales y tropicales desde el nivel de costa hasta el montañoso; es el musgo más común de su género en Europa. Es acidófilo-subneutrófilo, capaz de colonizar suelo, rocas y cortezas de árboles y arbustos (Dierßen, 2001; Casas-García & Burgaz, 2002; Smith, 2004; Cortini, 2005; Casas *et al.*, 2006; Guerra & Cros, 2018)

D. scoparium (Dicranaceae, Dicranales) es un musgo acrocárpico que forma matas de hasta 10 cm de altura. Los rizoides generan un denso tomento que recubre los caulidios. Los filidios se presentan de rectos a falcados, con un ápice acuminado y se alteran poco cuando se deshidratan. El esporofito presenta una seta de 2-3 cm, la urna es oblongo-cilíndrica, contraída por debajo de la boca y se dispone horizontalmente en la madurez; el opérculo presenta un pico que puede llegar a ser tan alto como la urna. Es una especie cosmopolita presente en las zonas montañosas de regiones boreales; la más común de su género en la Península Ibérica. Se puede encontrar en el suelo en taludes, rocas, maderas en descomposición y bases de los árboles (Cortini, 2001; Dierßen, 2001; Smith, 2004; Casas *et al.*, 2006; Guerra & Cros, 2015).

Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron en medio gelificado. Como soporte nutricional se empleó la fórmula modificada de Murashige-Skoog (MS), usual en cultivo *in vitro* de plantas (Murashige & Skoog, 1962). Se empleó el preparado de macro- y micronutrientes, sin componentes orgánicos (Sigma, *Murashige-Skoog basal medium 5519*, Tabla 2), a la mitad de concentración frente a lo originalmente propuesto (MS ½: 2,15 g/L) ya que se sabe que altas concentraciones de nutrientes tienen efecto inhibitorio en el crecimiento de los musgos (Rowntree, 2006; Bagdatli & Erdağ, 2017). Tras preparar el medio se ajustó a un pH de 6.5 con NaOH.

Tabla 2. Concentración de nutrientes del Murashige-Skoog basal medium 5519 de Sigma. La concentración final es de 4,3 g/L.

Componente	mg/L	Componente	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650,0	MgSO ₄ ·7H ₂ O	180,70
H ₃ BO ₃	6,20	MgSO ₄ ·4H ₂ O	16,90
CaCl ₂ ·2H ₂ O	332,20	Na MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	KI	0,30
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	KNO ₃	1900,00
Na ₂ ·EDTA	37,26	KH ₂ PO ₄	170,00
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,80	ZnS	8,60

Aunque el agente gelificante más extendido para el cultivo sólido de las plantas es el agar (Sargent, 1988), decidimos emplear goma *Gellan*. La goma *Gellan* es un polisacárido producido por *Sphingomonas elodea* que gelifica a temperatura ambiente si se disuelve junto a cationes (Lin & Casida, 1984; Haderler *et al.*, 1995). Uno de los motivos por los que se decidió emplear goma *Gellan* es que varios autores han apuntado un mayor efecto *in vitro* de las hormonas que cuando se emplea agar (Jansson *et al.*, 1983; Haderler *et al.*, 1995); probablemente debido a que el agar al ser más rígido y denso dificulta la movilización de las moléculas (Bornman & Vogelmann, 1984). Además, el agar ha mostrado un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de algunos musgos (Sargent, 1988).

Como los protonemas son sensibles a la deshidratación, para evitar que la goma absorbiera demasiada agua y terminara desecando las muestras según la experiencia previa en el laboratorio, se empleó a la mitad de la concentración recomendada por Rowntree y Ramsay (2005). Por tanto, se usaron 4 g/L (Sigma, GelzanTM G1910); en presencia de sulfato magnésico heptahidratado (MgSO₄ · 7 H₂O, 0,5 g/L) para que gelificara.

Para eliminar la contaminación asociada a microorganismos epífitos, los ápices vegetativos y las cápsulas de los esporofitos se trataron con un desinfectante clorado, dicloroisocianurato (DCI) al 0,1% (Sigma-Aldrich, Troclosennatrium 96%, 892-8). Los ápices vegetativos de *T. muralis* se desinfectaron con DCI al 0,25% ya que en cultivos de laboratorio previos se observó que la especie era más propensa a la contaminación. Tras la desinfección con DCI, los ápices vegetativos se limpiaron con 7 lixiviados de agua estéril y 3 de medio líquido MS ½, y las cápsulas, con 3 lixiviados en agua y 2 en MS ½.

El material de cultivo y los medios se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 110° C, para posteriormente realizar las siembras en una campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad.

Los cultivos se dejaron crecer durante 4 semanas en una cámara con condiciones controladas: 24 °C, y un fotoperiodo de 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad.

Pruebas preliminares

Se realizó una exploración de distintas técnicas que permitieran la separación espacial de las esporas de ambas especies, manteniendo la posibilidad de su interacción, algunas de las cuales ya se habían empleado en el cultivo de esporas de musgos: 1) el método de los pocillos; 2) el método de la diana; y 3) la modificación de la técnica del sándwich.

1. El método de los pocillos

Este ensayo fue desarrollado y empleado previamente en nuestro laboratorio (García-Redondo & Estébanez, 2013) para poder separar espacialmente distintas poblaciones de esporas cultivadas en medio líquido en el mismo recipiente.

El cultivo se realiza en una placa Petri con el medio (MS ½ líquido), en la cual se siembra una suspensión de baja densidad de las esporas de una especie (receptor) que se quiere verificar como sensible a la presencia de las esporas de otra especie (emisor). La baja densidad de la suspensión de las esporas de la especie receptora es necesaria para minimizar los efectos inhibitorios del desarrollo dependientes de la densidad. En la misma placa se coloca un pocillo (una cápsula microporosa de polietileno de alta densidad diseñada para su empleo en secado a punto crítico para microscopía electrónica de barrido; Electron Microscopy Sciences 70187-21), y con una suspensión de alta densidad de esporas de la especie emisora (Figura 5).



Figura 5. Diseño del método del pocillo. Autor: Carlos García Redondo.

Las sustancias hidrosolubles son capaces de atravesar las paredes del pocillo mientras que las esporas quedan retenidas. En nuestro ensayo se emplearon placas de 6 cm de diámetro con esporas de la especie *T. muralis* como emisora y receptora y de *S. ruralis* como especie emisora (siembra 1; 23-XI-2018).

Como controles en este experimento se emplearon 1) placas solamente con el medio y la suspensión de la especie receptora y 2) placas con un pocillo vacío para evaluar las posibles perturbaciones de este recipiente sobre el desarrollo de las esporas.

2. Método de las coronas concéntricas de Watson

El método de Watson se planteó para comprobar las interacciones entre protonemas de *Funaria hygrometrica* (Watson, 1981), una de las especies de musgos más estudiadas. Consiste en una placa Petri con un medio gelificado, en cuyo centro se dispone una suspensión de esporas para, a continuación, sembrar series de áreas a distintas distancias, dispuestas concéntricamente alrededor del área central, siguiendo el patrón de una diana (Figura 6). Las esporas se dejan crecer y se comprueba si el desarrollo en cada área sembrada está condicionado por la distancia al centro.

Esta prueba se ensayó en dos placas de 14 cm de diámetro con esporas y ápices de *T. muralis*: en una placa se sembró 1 mL de suspensión de esporas de alta densidad (ca. 65000-85000 esporas/mL) en el centro de la diana, y en la otra, 5 mg de ápices. En torno al centro se sembraron 24 áreas de ca. 0,5 cm de diámetro con 30 μ L de suspensión de esporas de baja densidad (ca. 1500-3000 esporas/mL) distribuidas en 3 coronas (a 18, 38 y 68 mm del centro), de forma que en cada corona se contaran 8 áreas dispuestas equidistantemente (Siembra 2; 30-XI-2018).

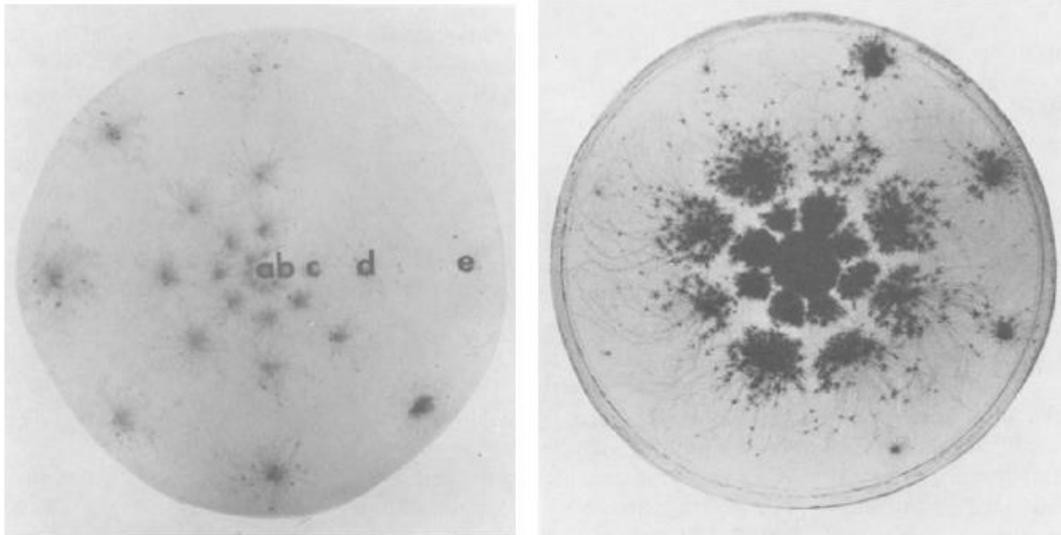


Figura 6. Experimento original de la diana de Watson (1981) con protonemas de *F. hygrometrica*. A la izquierda a los 34 días de la siembra y a la derecha a los 36.

3. Método modificado del sándwich

La técnica del sándwich es un bioensayo estandarizado para verificar la existencia de sustancias alelopáticas de plantas vasculares que afecten a la germinación y desarrollo temprano de semillas de lechuga (Fujii *et al.*, 2003, 2004). En el diseño original se preparan dos capas de agar entre las que se dispone seco el material vegetativo de la planta que puede ser alelopática (emisor), mientras que sobre la segunda capa se depositan semillas de lechuga (receptor) como refleja la Figura 7. Estas semillas se dejan crecer durante tres días en oscuridad y posteriormente se analiza el porcentaje de semillas germinadas por placa y las longitudes del hipocótilo y la radícula; y se compara con controles en los que no se coloca emisor entre las dos capas de agar.

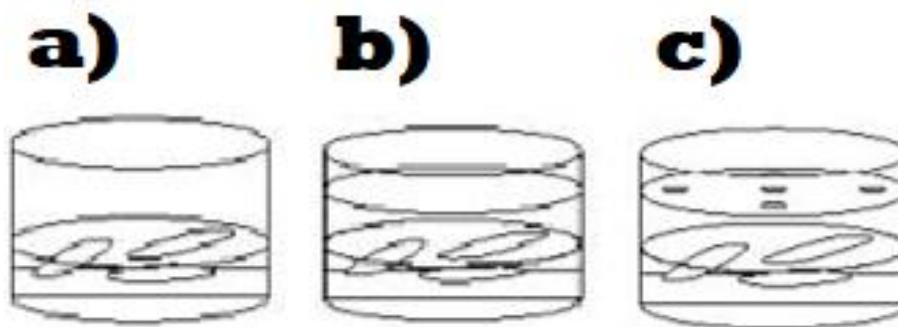


Figura 7. Diseño del método del sándwich. a) primera capa de agar con el emisor b) segunda capa de agar y c) siembra de las semillas de lechuga sobre la segunda capa. Modificado de Fujii *et al.* (2003).

Aunque el diseño original se realiza en placas multipocillo, nuestro cultivo se realizó en tarrinas Nalgene® de 60 mL con tapa a rosca de polipropileno transparente (Thermo Scientific™ 11-815-10B) ya que consideramos las siguientes ventajas: presentan un mayor tamaño (con 55 mm de diámetro y 45 mm de altura); aseguran un mejor cierre, y se pueden reutilizar y esterilizar en autoclave.

Cada capa del sándwich en nuestros cultivos estaba compuesta por 8 mL de medio con Gelzan, lo que suponen 0,5 cm de altura en la tarrina. Entre las dos capas, se empleó material vivo como emisor, ya sean ápices vegetativos (5 mg), o bien 1 ml de una densidad alta de esporas (ca. 33000-43000 esporas/mL, es decir, una lámina que contiene ca. 38000 esporas). Sobre la segunda capa, se empleó siempre una suspensión de baja densidad de esporas de la especie receptora (ca. 1500-3000 esporas/mL). De esta forma, se aseguraba la separación espacial del emisor y el receptor, permitiendo el cultivo de ambos y el transporte de posibles compuestos efectores de la interacción. Tanto en la prueba preliminar para probar la viabilidad del método (Siembra 3; 30-XI-2018) como en el resto de las siembras tras comprobar que funciona (siembras 4-15, tablas 3 y 4) para cada experimento se prepararon 6 réplicas.

Además, se prepararon dos controles, disponiendo entre las capas: 1) solamente 1 mL de Gelzan en MS ½ (es decir, sin material vegetal emisor); y 2) en el caso de usar ápices vegetativos, 1 mL del último lixiviado proveniente del último paso de la desinfección con MS ½ del material vegetativo, para tener en cuenta posibles efectos causados por restos de DCI, organismos epífitos, etc.

Interacciones entre musgos y con lechuga por medio del método del sándwich

Dado que los resultados de las pruebas preliminares (véase resultados y discusión de las pruebas preliminares) señalaron la técnica del sándwich como la adecuada, se realizaron distintos cruces entre las tres especies de musgos (*T. muralis*, *D. scoparium* e *H. cupressiforme*) en combinaciones intra- e interespecíficas, empleando como emisores tanto esporas como ápices vegetativos. Además, se realizó una prueba con semillas de lechuga, como contempla el bioensayo de Fujii *et al.*, (2003 y 2004) para evaluar los posibles efectos de estos musgos sobre el desarrollo temprano de plantas vasculares.

Cruces intra- e interespecíficos de musgos

Se realizaron todos los cruces intra- e interespecíficos posibles con las tres especies de musgos con 6 réplicas para cada experimento y control; lo que dio lugar a un total de 9 siembras con 24 tarrinas repartidas a lo largo del año 2019 (Tabla 3).

Las esporas de *H. cupressiforme* y *D. scoparium* se dejaron crecer durante 23 días en la cámara; mientras que el periodo de cultivo para las esporas de *T. muralis* se redujo a 12 días, debido a que su germinación y desarrollo protonemático son más rápidos.

Tabla 3. Siembras: fecha y tipo de cruce entre musgos.

Receptora (siempre esporas en baja densidad)	Emisor		
	<i>D. scoparium</i> (ápices / esporas en alta densidad)	<i>H. cupressiforme</i> (ápices / esporas en alta densidad)	<i>T. muralis</i> (ápices / esporas en alta densidad)
<i>D. scoparium</i>	Siembra 4; 18-I-2019	Siembra 7; 8-II-2019	Siembra 10; 1-III-2019
<i>H. cupressiforme</i>	Siembra 5; 8-II-2019	Siembra 8; 18-I-2019	Siembra 11; 5-IV-2019
<i>T. muralis</i>	Siembra 6; 16-IV-19	Siembra 9; 16-IV-19	Siembra 12; 12-VI-19

Siembras con semillas de lechuga

En los experimentos con semillas de lechuga se emplearon los mismos emisores que con los cruces entre musgos, sustituyendo sobre la segunda capa de Gelzan la suspensión receptora por 4 semillas colocadas equidistantes entre sí y alejadas las paredes de la tarrina. Las semillas se incubaron durante 4 días en oscuridad en la cámara de cultivo con la tapa puesta sin llegar a cerrar. Se prepararon 10 réplicas por experimento y control.

Como el efecto de las esporas en desarrollo puede necesitar un nivel mínimo de madurez, el experimento de esporas de *T. muralis* se dejó crecer durante 10 días antes de sembrar las semillas, y las esporas de *H. cupressiforme* y *D. scoparium* durante 21 días. Los controles de estos experimentos se cultivaron de igual manera, aunque sin ningún material vegetal emisor. Esto supone un total de 9 siembras de experimentos.

Tabla 4. Número de siembra y fecha de los experimentos con semillas de lechuga.

Receptor: Semillas de lechuga	Emisor		
	<i>D. scoparium</i>	<i>H. cupressiforme</i>	<i>T. muralis</i>
	Siembra 13 (esporas); 5-IV-2019	Siembra 14 (esporas); 16-IV-2019	
	Siembra 15 (ápices); 21-VI-2019		

Pruebas para evaluar efectos de hormonas, nutrientes y densidad de esporas sobre *D. scoparium*

Teniendo en cuenta las interacciones positivas observadas sobre el desarrollo de esporas *D. scoparium* en presencia de material vegetal vivo, se decidió realizar una serie de cultivos adicionales para una exploración preliminar de la posible naturaleza de la sustancia mediadora. Para ello se realizó un cultivo con suspensiones de esporas en distintas densidades, como en trabajos previos del laboratorio, y una prueba con nutrientes (sacarosa y vitaminas) y con una mezcla de hormonas en concentraciones empleadas normalmente en los cultivos vegetales (comunicación personal, S. Sanz). (Siembra 16; 15-III-2019).

Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron en tarrinas cada una con 4 mL de medio MS $\frac{1}{2}$ líquido, ya que facilita el análisis posterior de los protonemas. En el caso del análisis de densidad se realizaron siembras con suspensiones de 5 densidades distintas (400-600 esporas/mL; 1000-1100 esporas/mL; 8000-9500 esporas/mL; 12500-13000 esporas/mL; 31000-33000 esporas/mL).

Adicionalmente se realizaron pruebas con hormonas, vitaminas y sacarosa. Estas pruebas se realizaron en las suspensiones de menor densidad (400-600 esporas/mL). Los experimentos consistían en 1) auxinas: 35 μ L de ácido naftanalacético (NAA), 3 g/L; 2) vitaminas: una mezcla de 35 μ L de ácido nicotínico, 5 mg/L + 35 μ L de hidrocloreuro de tiamina, 5 mg/L + 35 μ L de hidrocloreuro de piridoxina, 3) experimento combinado de auxinas y vitaminas (en las concentraciones previamente indicadas) y 4) sacarosa (1%).

Cuantificación del desarrollo del material vegetal receptor

Para cuantificar la cobertura de los cultivos sembrados con el método del sándwich, para cada réplica se cortó la capa superior (con la suspensión receptora) y se realizaron dos fotografías de la superficie a 80 aumentos. Para cada fotografía se calculó el área de verde de 10 recuadros de 2 mm² con el programa de análisis de imagen Fiji 1.52 (Schindelin *et al.*, 2012). Esto implica un total de 20 recuadros por muestra (10 recuadros x 2 fotos). Los pasos para medir el área de verde de los recuadros fueron los siguientes (Figura 8): primero se eliminó el ruido del fondo de la placa; para ello, con el programa de tratamiento de imágenes Fiji se separaron los canales de color RGB (*red, blue, green*),

y se seleccionó el canal azul (el que presenta un mayor contraste con el fondo). Con la imagen del canal azul se ejecutó una operación que calcula de forma automática los umbrales de color que representan la muestra y que binariza la imagen en blanco y negro. Sobre la imagen contrastada con la herramienta ROI (*Regions of interest*) se seleccionaron los cuadrados de manera que resultasen representativos y fuesen regiones con suficiente calidad de imagen (sin sombras, grietas, etc.). Finalmente, en cada uno de los cuadrados se calculó área ocupada por protonemas y el porcentaje que representaba con respecto área del cuadrado.

Además, se midió el grado de desarrollo protonemático. Para todos los cultivos con esporas se seleccionaron 50 protonemas o esporas por réplica y se clasificaron en función de su grado de desarrollo en 5 categorías: esporas germinadas (no divididas), protonemas de 2-20 células, de 21-40 células, de 41-100 células y de más de 100 células (Figura 8).

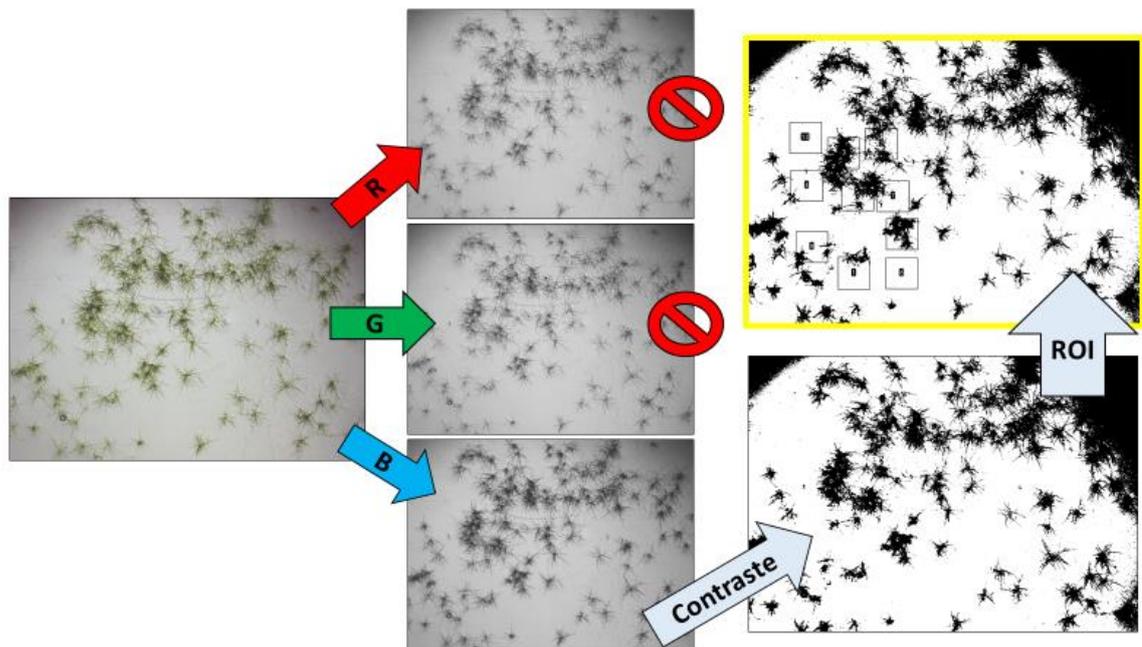


Figura 8. Esquema del procesado de la imagen para medir el área de verde (explicación detallada en el texto). La imagen corresponde a protonemas de *H. cupressiforme*.

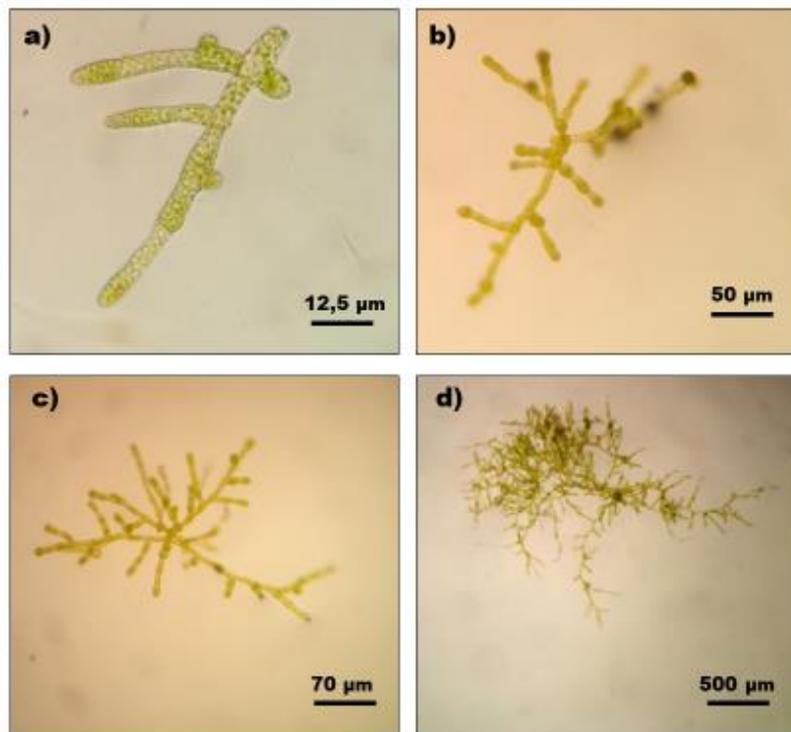


Figura 9. Protonemas de *D. scoparium* representando las distintas categorías de desarrollo consideradas: a) 2-20 células; b) de 21-40 células; c) de 41-100 células y d) más de 100 células.

En los cultivos con lechuga se valoró el porcentaje de germinación. Además, para cada réplica se seleccionaron las dos plántulas de mayor desarrollo y se escanearon para medir la longitud del hipocótilo y la radícula empleando el programa de análisis de imagen Fiji 1.52.

Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se empleó el software R 3.6.0 (R Core Team, 2018)

Para comparar el grado de desarrollo de los protonemas por categoría se calculó un modelo de regresión logística ordinal. Este tipo de modelos se emplea para analizar variables categóricas ordinales en las que se cumple que 1) existe un orden natural entre categorías, y 2) hay más de dos categorías. Estos modelos son una extensión de la regresión logística y, en ese sentido, la variable que se modeliza es el logaritmo neperiano de la razón de probabilidades, es decir, el logaritmo neperiano del cociente de la probabilidad de que un evento suceda dividido por la probabilidad de que dicho evento no suceda (eq 1):

$$(eq1) \ln\left(\frac{p}{1-p}\right), \text{ donde } p \text{ es la probabilidad de ocurrir que presenta un evento.}$$

Para incluir el efecto de las categorías ordinales, el modelo logístico ordinal considera la probabilidad acumulada para cada una de nuestras categorías. Es decir, considera que la probabilidad de alcanzar el grado de desarrollo de 21-40 células exige además haber pasado antes por el estado de 2-20 células y por el de germinación. De esta manera, podemos modelizar la relación entre la variable categórica (grado de desarrollo) y los distintos experimentos. En este caso los coeficientes del modelo se interpretan como una mayor probabilidad de que suceda un aumento de categoría en respuesta al material vegetal emisor. El modelo nos devuelve las diferencias entre el control y los otros niveles del tratamiento (esporas, ápices y lixiviado). Esta diferencia es la diferencia del logaritmo neperiano de la razón de probabilidades de desarrollo de los experimentos con respecto al control, y un p-valor para esta estima de la diferencia ($Pr > |Z|$).

Para facilitar la interpretación de los resultados se transformaron los coeficientes aplicando una función exponencial, de modo que los valores mostrados en las tablas indican la diferencia en la razón de probabilidades de un aumento en categoría. Un aumento en dicho valor implica un aumento en la probabilidad de ese grado de desarrollo.

Para analizar el efecto del material emisor sobre la cobertura, se empleó un modelo lineal mixto con la cobertura como variable dependiente, el tipo de material emisor como variable independiente, y un error aleatorio asociado a al factor tarrina (recuérdese que se contaba con 20 áreas de 2 mm² por tarrina analizada, 2 fotos en las que se midieron 10 áreas por foto). De esta manera, se tiene en cuenta que los cuadrados en cada tarrina no son muestras independientes entre sí y corrigen las diferencias que puede haber debido a factores particulares de cada tarrina. En los casos en los que se detectaron diferencias significativas del tratamiento se realizaron comparaciones múltiples entre los niveles de cada tratamiento con una ANOVA.

Para las longitudes del hipocótilo y la radícula, y el índice de germinación de las lechugas se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y una comparación múltiple con un contraste de Tukey con el objeto de comprobar posibles diferencias entre los experimentos.

En todos los análisis estadísticos se consideró ($\alpha=0.05$) como umbral de significación.

Además, para una mejor interpretación de los resultados se presentan gráficas de barras aplicadas con la frecuencia de cada categoría de desarrollo protonemático por experimento, así como tablas de datos descriptivos.

RESULTADOS

Resultados de los diseños experimentales:

1. Método de los pocillos

Aunque el ensayo de los pocillos ha funcionado anteriormente (García-Redondo & Estébanez, 2013), y el número de catálogo de nuestros pocillos es el mismo que se empleó entonces, en esta ocasión el lote recibido tenía un recubrimiento sobre el plástico de los pocillos que mostraba una actividad detergente letal para las esporas. Además, los pocillos son inestables, se deslizan por la placa y se caen con facilidad. Consecuentemente, descartamos este diseño para nuestro proyecto.

2. Método de las coronas concéntricas de Watson

Con esta técnica el crecimiento de los protonemas fue favorable (Figura 10). Sin embargo, observamos que es una metodología con varias desventajas. Por una parte, se obtienen muchas áreas por placa que constituyen pseudorréplicas. El análisis de cada una de las placas conlleva el estudio de cada una de las áreas sembradas individualmente lo que aumenta mucho el tiempo de análisis y cuantificación del crecimiento de las muestras. Además, las placas acumulan variaciones características en la cantidad de luz, humedad etc. que afectan por igual a todas las pseudorréplicas, lo que resta robustez al análisis estadístico de los resultados. Para solucionar este problema, se podría incrementar la cantidad de placas por experimento. Sin embargo, esto supondría una cantidad inabordable de áreas sembradas para analizar. Por otro lado, el patrón de interacciones generado es complejo y difícil de cuantificar ya que las áreas sembradas están también sujetas al efecto de todas las colindantes y no solo a la del centro, Figura 10. Este método, por tanto, también fue descartado.

3. Método del sándwich

Este método permite una buena separación espacial entre el emisor y el receptor, y además permite que las interacciones dependan de una distancia controlada entre dichos materiales. El mayor problema que podía presentar esta técnica es que el material vegetal (ápices vegetativos y esporas) no pudiese sobrevivir embebido entre las dos capas gelificadas. Sin embargo, tanto los ápices como las esporas sobrevivieron durante todo el periodo de cultivo, que se prolongó a veces hasta más de 3 semanas. Esto, unido a las ventajas ya comentadas (las tarrinas son autoclavables, con mejor cierre que las placas Petri, y reutilizables), decantó la decisión hacia esta técnica para desarrollar este proyecto.

Con respecto a los lixiviados, aunque se plantearon como un control, en última instancia supusieron un cultivo de aquellos hongos capaces de resistir el experimento con DCI. De todas maneras, el grado de contaminación es asumible y decidimos mantenerlo ya que consideramos que podía seguir sirviendo como un control ante un mal lavado de los brotes.

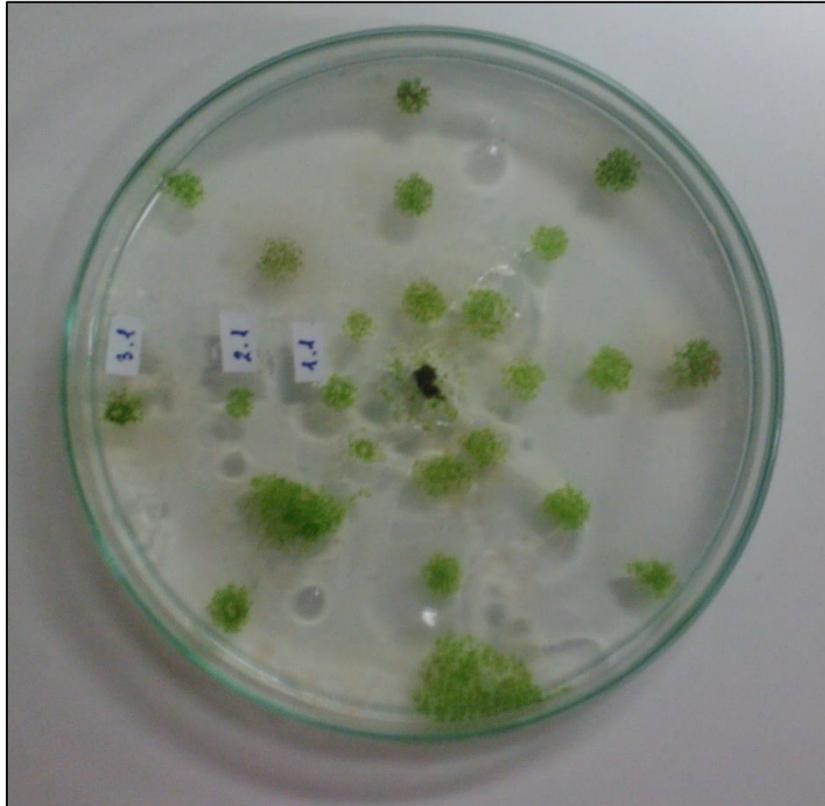


Figura 10. Siembra con el método de Watson con ápices de *T. muralis* en el centro y alrededor protonemas en desarrollo de la misma especie. Los radios se encuentran a 18, 38 y 68 mm del centro (1.1, 2.1 y 3.1, respectivamente).

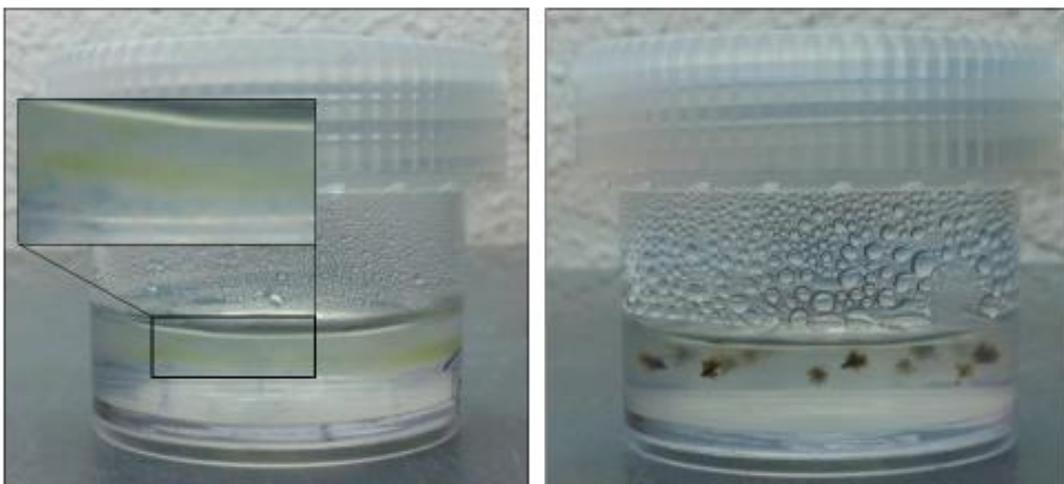


Figura 11. Dos tarrinas a las tres semanas de sembrar *T. muralis* como agente emisor con el método modificado del sándwich. A la izquierda esporas germinadas y a la derecha ápices aún vivos.

Experimentos del sándwich con cruces entre musgos: desarrollo protonemático

A continuación, exponemos los resultados organizados por la especie receptora. Cada especie cuenta con los resultados del modelo logarítmico ordinal para el desarrollo protonemático y la ANOVA de los valores de cobertura. Además, el modelo del desarrollo protonemático se acompaña de los estadísticos descriptivos (media y desviación estándar) del índice de desarrollo (tablas 8-11). Las figuras 13, 16 y 18 se añaden para facilitar la interpretación de los resultados; cada gráfico recoge en barras la frecuencia en promedio de cada categoría protonemática para los distintos experimentos.

El desarrollo de *D. scoparium* no mostró efectos apreciables cuando los emisores fueron esporas y ápices del propio *D. scoparium*, o el lixiviado de ápices de *H. cupressiforme* (Tabla 6). Sin embargo, el resto de los experimentos cruzados tuvieron un efecto de facilitación del desarrollo protonemático de *D. scoparium*; especialmente con los ápices de *H. cupressiforme*, que potenciaron 1500 veces el desarrollo (Tabla 6 y Figura 12c). Llamativamente, la cobertura conseguida por la germinación de *D. scoparium* no muestra diferencias significativas comparando con los controles; es decir, la superficie ocupada por los protonemas desarrollados por la suspensión es siempre la misma (Tabla 7). Cabe comentar que, comparando el desarrollo de los controles, el alcanzado en el experimento con *T. muralis* como especie emisora es notablemente menor (Tabla 8).

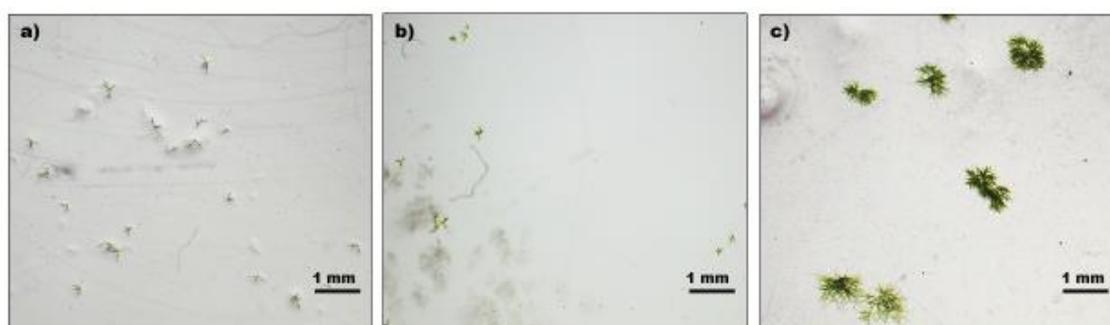


Figura 12. Protonemas en desarrollo de *D. scoparium* en distintos experimentos: a) control; b) lixiviado de *H. cupressiforme*; c) Ápices de *H. cupressiforme*. Se aprecia que el desarrollo con el experimento del lixiviado de *H. cupressiforme* es similar al del control; y un mayor desarrollo protonemático en el experimento de los ápices.

Tabla 5. Experimentos de sándwich con *D. scoparium* como especie receptora: media y desviación estándar (DS) del índice de desarrollo.

Especie emisora	<i>D. scoparium</i>		<i>H. cupressiforme</i>		<i>T. muralis</i>	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Control	15,3	9,17	14,7	10,9	4,42	5,47
Esporas	23,0	18,7	68,4	97,6	19,85	26,7
Ápices	20,9	13,5	266,0	83,3	41,45	51,8
Lixiviado	34,4	33,9	62,7	101,	65,45	75,0

Tabla 6. Experimentos de sándwich con *D. scoparium* como especie receptora: Exponencial de la estima (Exp. E) de la regresión logística ordinal y significatividad (Pr (>|Z|)). Se resaltan con asteriscos y en color aquellos experimentos que mostraron una significatividad: *<0,05; **<0,01; ***<0,001.

Especie emisora	<i>D. scoparium</i>		<i>H. cupressiforme</i>		<i>T. muralis</i>	
	Exp. E.	Pr > z	Exp. E.	Pr > z	Exp. E.	Pr > z
Control-esporas	2,8	0,109464	57,9	0,009**	49,2	0,000***
Control-ápices	2,5	0,1504	14987,9	0,000***	517,4	0,000***
Control-lixiviado	9,9	0,000***	9,7	0,134	2232,8	0,000***

Tabla 7. Experimentos de sándwich con *D. scoparium* como especie receptora: media la cobertura (mm²) obtenida por análisis de imagen, junto con el valor de la significatividad de la comparación del modelo lineal de los experimentos con respecto al control (Pr (>|t|)). Se resaltan con asteriscos y en color aquellos experimentos que mostraron una significatividad: *<0,05; **<0,01; ***<0,001.

Especie emisora	<i>D. scoparium</i>		<i>H. cupressiforme</i>		<i>T. muralis</i>	
	Media	Pr> t	Media	Pr> t	Media	Pr> t
Control	0,06	-	0,11	-	0,11	-
Esporas	0,11	0,054	0,13	0,763	0,12	0,826
Ápices	0,09	0,214	0,14	0,508	0,18	0,216
Lixiviado	0,10	0,091	0,15	0,400	0,10	0,854

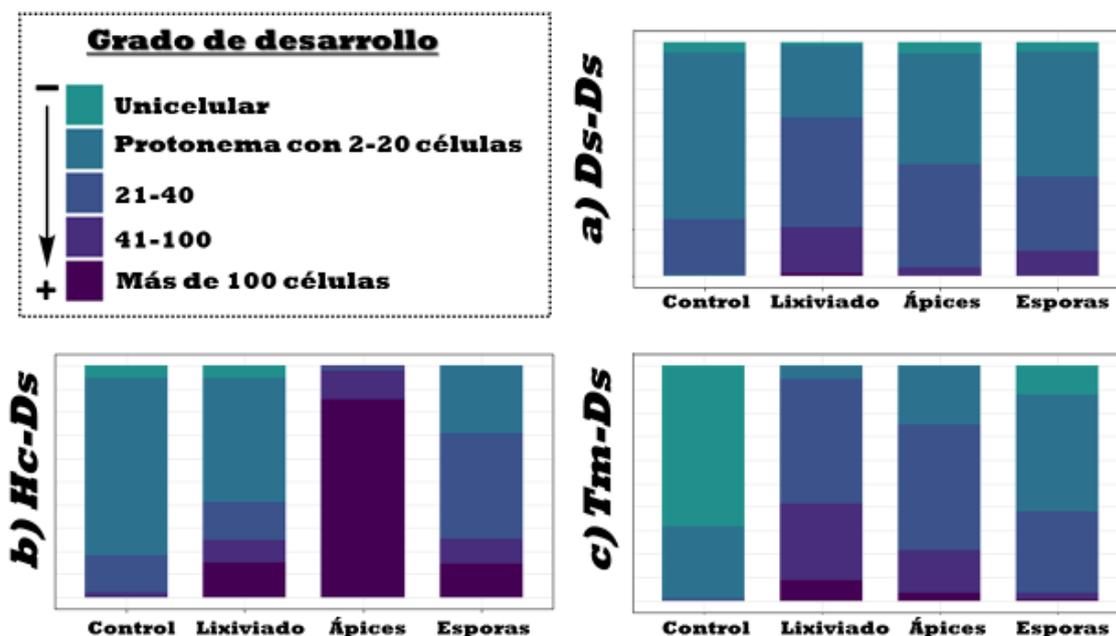


Figura 13. Experimentos de sándwich con *D. scoparium* como especie receptora: gráficos de barras apiladas que representan el grado de desarrollo protonemático. Las barras representan la frecuencia de cada categoría de desarrollo protonemático. Ds: *D. scoparium*, Hc: *H. cupressiforme*; Tm: *T. muralis*. Nótese como la representación de los protonemas de más de 100 células aumenta notablemente en el experimento con ápices de *H. cupressiforme*. Además, destaca el menor desarrollo del control de los experimentos con *T. muralis*.

Los experimentos con *H. cupressiforme* como especie receptora revelaron tanto efectos positivos como negativos. Los experimentos con esporas de *H. cupressiforme* como emisor mostraron un efecto autoinhibitorio con un desarrollo 24 veces menor que en el control, y 13,5 veces menor con los ápices de *D. scoparium* (Tabla 9 y Figura 14). Por otra parte, los experimentos con ápices de *T. muralis* y el lixiviado de los mismos facilitaron el desarrollo, y, entre ellos, es más potente el efecto de los ápices que del lixiviado (Tabla 5). Además, los experimentos con ápices de *T. muralis* fueron los únicos en los que se observó una gran cantidad de brotes foliosos (Figura 15) lo que implica un paso cualitativo en el desarrollo: de protonema a gametóforo. Por último, la cobertura prácticamente se duplicó con las de esporas de *D. scoparium* y los ápices de *H. scoparium*; también se favoreció con los ápices de *T. muralis* (Tabla 10). El resto de los experimentos no mostraron un efecto significativo sobre el desarrollo de *H. cupressiforme*.

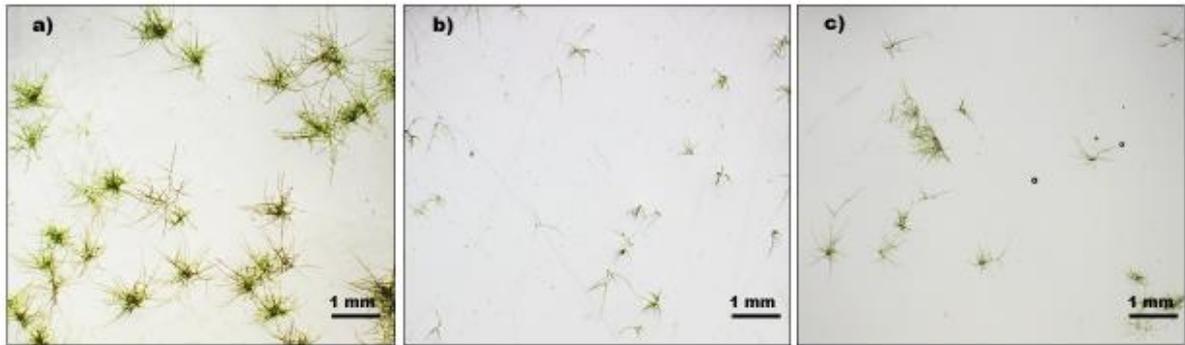


Figura 14. Protonemas en desarrollo de *H. cupressiforme* según el siguiente material emisor: a) ninguno (control); b) lixiviado de *H. cupressiforme*; c) ápices de *D. scoparium*. Se aprecia que ambos tipos de material emisor desfavorecen el desarrollo de los protonemas.

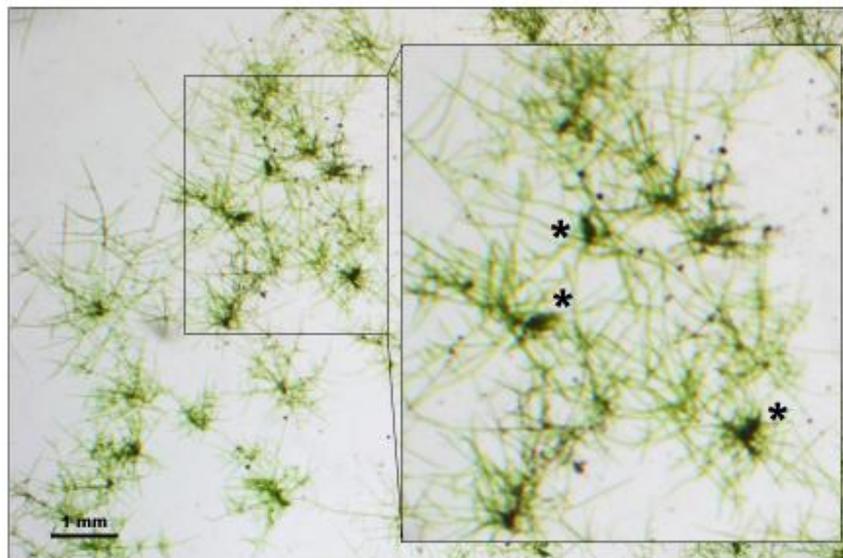


Figura 15. Protonemas en desarrollo de *H. cupressiforme* en el experimento con ápices de *T. muralis* como material emisor. Se señala con asteriscos la presencia de brotes foliosos.

Tabla 8. Experimentos de sándwich con *H. cupressiforme* como especie receptora: media y desviación estándar (DS) del índice de desarrollo.

Especie emisora	<i>D. scoparium</i>		<i>H. cupressiforme</i>		<i>T. muralis</i>	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Control	243	99,9	210,1	117,	228	107,
Esporas	254	92,5	70,7	102,	225	113,
Ápices	160	124,	192,5	124,	273	75,6
Lixiviado	267	81,1	210,1	28,2	259	88,5

Tabla 9. Experimentos de sándwich con *H. cupressiforme* como especie receptora: exponencial de la estima (Exp. E) de la regresión logística ordinal y significatividad (Pr (>|Z|)). Se resaltan con asteriscos y en color aquellos experimentos que mostraron una significatividad: *<0,05; **<0,01; ***<0,001.

Especie emisora	<i>D. scoparium</i>		<i>H. cupressiforme</i>		<i>T. muralis</i>	
	Exp. E.	Pr > z	Exp. E.	Pr > z	Exp. E.	Pr > z
Control-esporas	1,3	0,8005	-24,0	0,000***	-1,1	0,8140
Control-ápices	-13,5	0,011*	-2,8	0,2932	3,4	0,0041**
Control-lixiviado	2,0	0,5076	1,0	0,8977	2,4	0,0388*

Tabla 10. Experimentos de sándwich con *H. cupressiforme* como especie receptora: media de la cobertura (mm²) obtenida por análisis de imagen, junto con el valor de la significatividad de la comparación del modelo lineal de los experimentos con respecto al control (Pr (>|t|)). Se resaltan con asteriscos y en color aquellos experimentos que mostraron una significatividad: *<0,05; **<0,01; ***<0,001.

Especie emisora	<i>D. scoparium</i>		<i>H. cupressiforme</i>		<i>T. muralis</i>	
	Media	Pr> t	Media	Pr> t	Media	Pr> t
Control	0,18	-	0,15	-	0,36	-
Esporas	0,40	0,001**	0,18	0,661	0,48	0,346
Ápices	0,20	0,688	0,27	0,030*	0,62	0,036*
Lixiviado	0,18	0,985	0,18	0,564	0,42	0,595

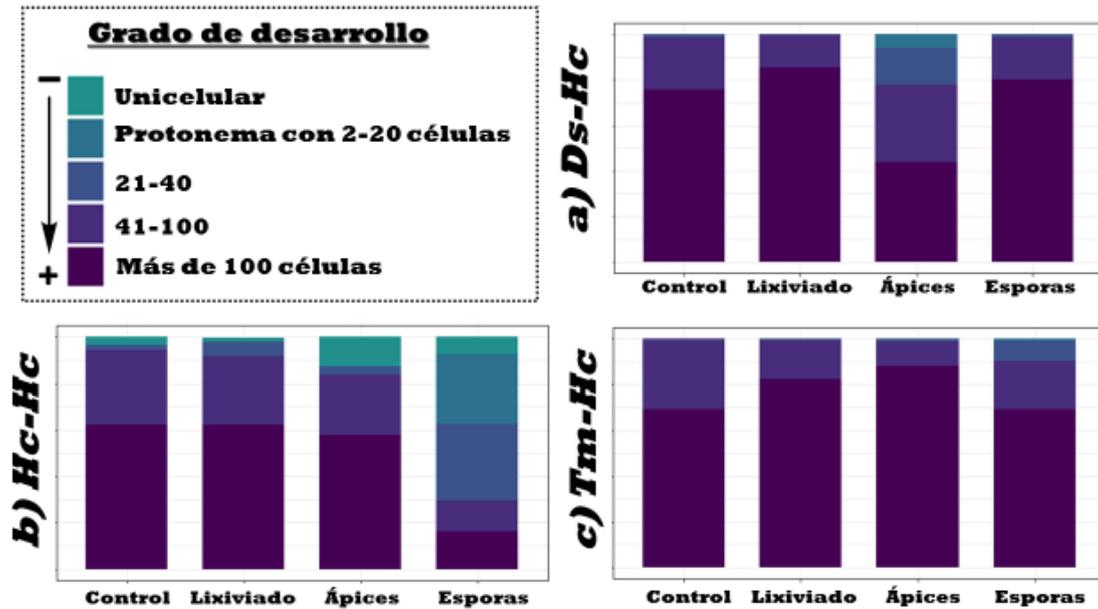


Figura 16. Experimentos de sándwich con *H. cupressiforme* como especie receptora: gráficos de barras apiladas que representan el grado de desarrollo protonemático. Las barras representan la frecuencia de cada categoría de desarrollo protonemático. Ds: *D. scoparium*, Hc: *H. cupressiforme*; Tm: *T. muralis*.

Todos los experimentos con *D. scoparium* como especie emisora y *T. muralis* como receptora mostraron una inhibición del desarrollo protonemático; con más efecto en los experimentos donde el emisor eran esporas o ápices (Tabla 12 y Figura 17). Por otra parte, el desarrollo aumentó con su propio lixiviado 26 veces (Tabla 12). Sin embargo, dado que el control de los experimentos de cruce de *T. muralis* con *T. muralis* se desarrolló menos que el resto de los controles. De hecho, todos los experimentos del cruce intraespecífico de *T. muralis* muestran una cobertura significativamente mayor. Ninguno de los experimentos con *H. cupressiforme* como especie emisora mostró efectos sobre el desarrollo de *T. muralis*.

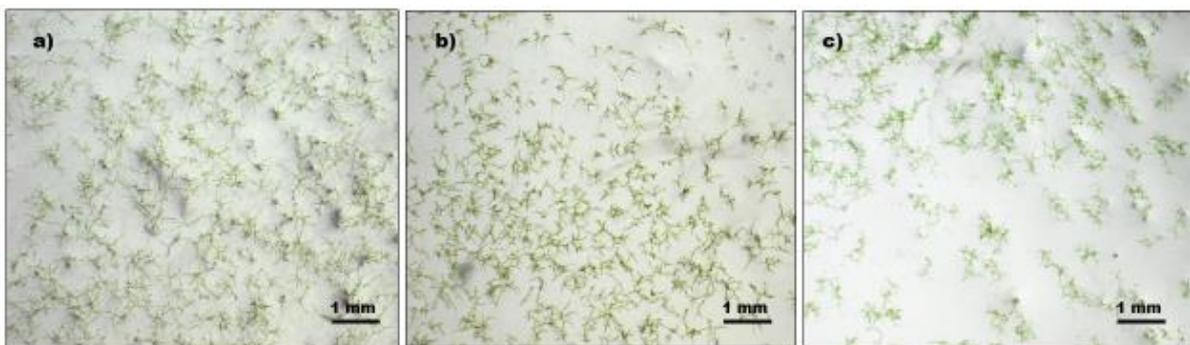


Figura 17. Protonemas en desarrollo de *T. muralis* en experimentos con distinto material emisor: a) control; b) esporas de *D. scoparium*; c) ápices de *D. scoparium*.

Tabla 11. Experimentos de sándwich con *T. muralis* como especie receptora: media y desviación estándar (DS) del índice de desarrollo.

Especie emisora	<i>D. scoparium</i>		<i>H. cupressiforme</i>		<i>T. muralis</i>	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Control	32.1	39,8	32.1	439,8	8.91	10,7
Esporas	18.7	10,1	17.3	11,3	10.53	7,85
Ápices	18.8	11,3	25.7	36,4	8.61	7,95
Lixiviado	20.0	12,1	18.5	13,1	18.65	13,8

Tabla 12. Experimentos de sándwich con *T. muralis* como especie receptora: exponencial de la estima (Exp. E) de la regresión logística ordinal y significatividad (Pr (>|Z|)). Se resaltan con asteriscos y en color aquellos experimentos que mostraron una significatividad: *<0,05; **<0,01; ***<0,001.

Especie emisora	<i>D. scoparium</i>		<i>H. cupressiforme</i>		<i>T. muralis</i>	
	Exp. E.	Pr > z	Exp. E.	Pr > z	Exp. E.	Pr > z
Control-esporas	-3,07	0,0099**	-6,81	0,0573	2,6	0,2858
Control-ápices	-3,36	0,0055**	-2,76	0,3182	1,1	0,8912
Control-lixiviado	-2,52	0,0333*	-6,10	0,0770	26,2	0,0003***

Tabla 13. Experimentos de sándwich con *T. muralis* como especie receptora: media la cobertura (mm²) obtenida por análisis de imagen, junto con el valor de la significatividad de la comparación del modelo lineal de los experimentos con respecto al control (Pr (>|t|)). Se resaltan con asteriscos y en color aquellos experimentos que mostraron una significatividad: *<0,05; **<0,01; ***<0,001

Especie emisora	<i>D. scoparium</i>		<i>H. cupressiforme</i>		<i>T. muralis</i>	
	Media	Pr> t	Media	Pr> t	Media	Pr> t
Control	0,28	-	0,28	-	0,130	-
Esporas	0,26	0,792	0,20	0,183	0,245	0,025*
Ápices	0,23	0,395	0,20	0,156	0,473	0,000***
Lixiviado	0,28	0,965	0,22	0,314	0,318	0,000***

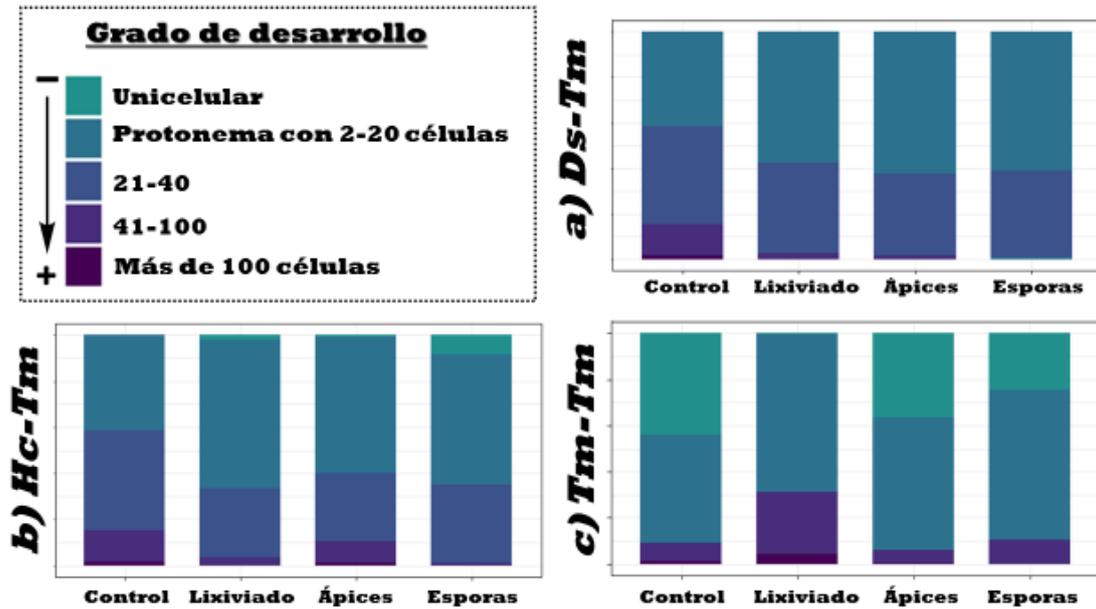


Figura 18. Experimentos de sándwich con *T. muralis* como especie receptora: gráficos de barras apiladas que representan el grado de desarrollo protonemático. Las barras representan la frecuencia de cada categoría de desarrollo protonemático. Ds: *D. scoparium*, Hc: *H. cupressiforme*; Tm: *T. muralis*.

Germinación de las semillas de lechuga

La germinación y la longitud de la radícula no se vieron alteradas en ninguno de los experimentos (Tabla 14). Asimismo, la longitud del hipocótilo resultó muy escasamente afectada. Solamente *H. cupressiforme* (esporas, ápices y lixiviado de los mismos) fue capaz de modular el desarrollo del hipocótilo, potenciándolo ligeramente (ápices y su lixiviado) o inhibiéndolo en unos 7 mm (esporas), Figura 19.

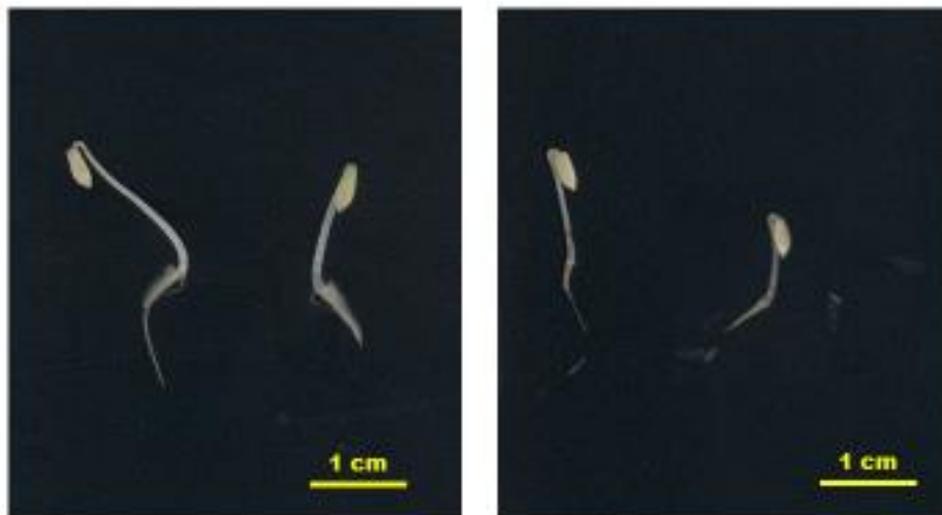


Figura 19. Semillas de lechuga en desarrollo. A la izquierda: control; a la derecha, experimento con esporas de *H. cupressiforme* como material emisor.

Tabla 14. Experimentos con semillas de lechuga: longitud en mm de los hipocótilos (H) y radículas (R), y porcentajes de germinación (%G). Entre paréntesis se indican las categorías de las comparaciones por pares de Tukey con una significatividad de $\alpha=0.5$. Se resaltan en color aquellos experimentos que mostraron una significatividad $<0,05$.

		<i>D. scoparium</i>			<i>H. cupressiforme</i>			<i>T. muralis</i>		
		H	R	% G	H	R	%G	H	R	%G
Ápices y lixiviado	Control	9,18 $\pm 1,52$ (a)	19,24 $\pm 4,25$ (a)	92,5 $\pm 12,07$ (a)	9,18 $\pm 1,51$ (a)	19,24 $\pm 4,25$ (a)	92,5 $\pm 12,07$ (a)	9,18 $\pm 1,52$ (a)	19,24 $\pm 4,25$ (a)	92,5 $\pm 12,07$ (a)
	Ápices	9,84 $\pm 1,53$ (a)	18,28 $\pm 4,04$ (a)	97,5 $\pm 7,90$ (a)	10,57 $\pm 0,93$ (b)	20,26 $\pm 4,68$ (a)	90,0 $\pm 12,90$ (a)	9,80 $\pm 1,76$ (a)	18,58 $\pm 3,84$ (a)	87,5 $\pm 21,25$ (a)
	lixiviado	9,11 $\pm 1,08$ (a)	16,88 $\pm 2,20$ (a)	95,0 $\pm 10,54$ (a)	10,28 $\pm 1,03$ (b)	18,59 $\pm 1,86$ (a)	93,3 $\pm 10,97$ (a)	9,66 $\pm 1,11$ (a)	19,0 $8 \pm 4,10$ (a)	90 $\pm 17,48$ (a)
Esporas	Control	40,22 $\pm 5,70$ (a)	68,10 $\pm 17,68$ (a)	95,5 $\pm 10,54$ (a)	40,59 $\pm 0,58$ (a)	68,18 $\pm 18,163$ (a)	95,5 $\pm 10,54$ (a)	15,33 $\pm 1,16$ (a)	33,30 $\pm 24,10$ (a)	63,5 $\pm 20,82$ (a)
	Esporas	42,11 $\pm 6,28$ (a)	69,57 $\pm 19,74$ (a)	92,5 $\pm 16,87$ (a)	33,47 $\pm 1,03$ (b)	65,05 $\pm 28,35$ (a)	97,5 $\pm 7,90$ (a)	15,43 $\pm 0,89$ (a)	28,11 \pm 12,67 (a)	80 $\pm 25,82$ (a)

Experimentos con adición de hormonas y nutrientes, y con distintas densidades de esporas (*D. scoparium*): desarrollo protonemático

El desarrollo protonemático de *D. scoparium* en los experimentos con distinta densidad, hormonas (auxinas: NAA) y nutrientes (sacarosa y vitaminas: timina, piridoxina y ácido nicotínico) se encuentran en las tablas 15 y 16. Como en los resultados anteriores, para facilitar la interpretación de los resultados, la Figura 20 recoge en gráficos de barras con la frecuencia de cada categoría protonemática para los distintos experimentos.

Los experimentos de densidad *D. scoparium* mostraron un descenso inicial del desarrollo protonemático con el incremento de la cantidad de esporas por mL, que alcanza un mínimo con la suspensión de unas 9000 esporas/mL (con un desarrollo 12 veces menor al desarrollo del experimento con 500 esporas/mL). A mayores densidades se recupera el desarrollo, pero sin llegar a superar al de la densidad de 500 esporas/mL. De hecho, el

índice de desarrollo de las suspensiones de 1300 esporas/mL (S3) y la de 32 000 esporas/mL (S0) es el mismo con respecto a la siembra 500 esporas/mL (-2.26 y -2.25 respectivamente).

Paralelamente, los experimentos de nutrientes, tanto de hormonas (auxinas: NAA) como de sacarosa y de vitaminas (timina, piridoxina y ácido nicotínico) mostraron un efecto inhibitorio sobre el desarrollo protonemático de *D. scoparium* (Tabla 16). En particular, la adición de auxinas redujo el desarrollo 2,24 veces, seguido del experimento combinado de auxinas y vitaminas con un desarrollo 1,86 veces menor y el experimento de vitaminas que se desarrolló 1,48 veces menos.

Tabla 15. Experimentos de densidad de esporas, hormonas y nutrientes en MS 1/2 líquido con esporas de *D. scoparium*: media y desviación estándar (DS) del índice de desarrollo protonemático.

	Densidades		Nutrientes	
	Me- dia	DS	Me- dia	DS
S0 = ca. 32000 esporas/mL	10,04	4,65	Control	25.65 54,3
S1 = ca. 10000 esporas/mL	7,96	20,5	Auxinas: NAA	6.90 10,6
S2 = ca. 9000 esporas/mL	5,68	6,00	Vitaminas (timina, piridoxina y ácido nicotínico)	8.35 7,98
S3 = ca. 1300 esporas/mL	13,16	6,72	Auxinas+ Vitaminas	6,75 5,96
S4 = ca. 500 esporas/mL	25,65	4,65		

Tabla 16. Experimentos de densidad de esporas, hormonas y nutrientes en MS 1/2 líquido con esporas de *D. scoparium*: exponencial de la estima (Exp. E) de la regresión logística ordinal y significatividad (Pr (>|Z|)). Se resaltan con asteriscos y en color aquellos experimentos que mostraron una significatividad: *<0,05; **<0,01; *<0,001.**

	Densidades		Nutrientes	
	Exp. E.	Pr(> z)	Exp. E.	Pr(> z)
S4 – S3	-2,26	0,259	Control - Auxinas	-9,39 0,002**
S4 – S2	-12,32	0,000***	Control - Vitaminas	-4,39 0,041*
S4 – S1	-5,59	0,017*	Control - Vitaminas + Auxinas	-6,42 0,010*
S4 – S0	-2,25	0,2643		

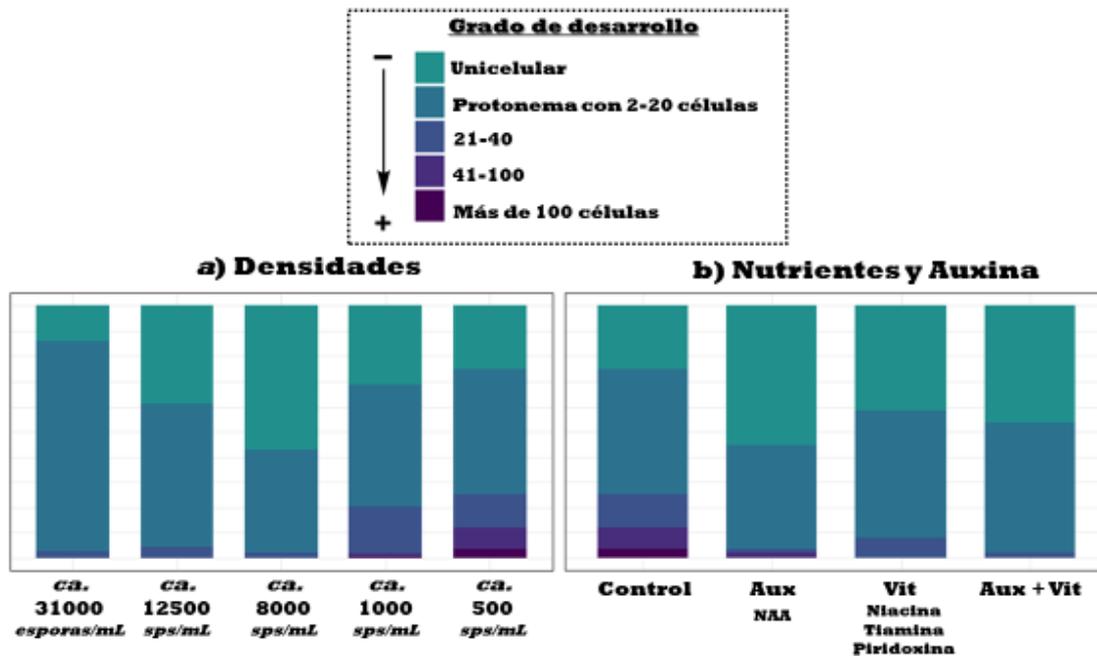


Figura 20. Experimentos de sándwich con *D. scoparium* para los cultivos de densidades y nutrientes: gráficos de barras apiladas que representan el grado de desarrollo protonemático. Las barras representan la frecuencia de cada categoría de desarrollo protonemático.

DISCUSIÓN

Diseños experimentales:

De los tres diseños, la modificación del método del sándwich es el que mostró mejores resultados. El método de los pocillos exige retirar previamente la película detergente; además, la inestabilidad del pocillo en la placa pone en riesgo el montaje cuando se transporta. Sin embargo, el método de las coronas concéntricas de Watson muestra un buen crecimiento de las poblaciones, pero plantea problemas con la interpretación de los resultados.

El método del sándwich nos proporciona la seguridad de que existe una barrera física homogénea entre el emisor y el receptor que permite la difusión de sustancias hidrosolubles. Además, nos permite analizar la cobertura alcanzada por los protonemas junto con su grado de desarrollo protonemático. Consecuentemente, el proyecto se siguió empleando y refinando las modificaciones del método original (Fujii *et al.*, 2003); de manera que se pudiese proporcionar una técnica estandarizada con la que estudiar y ampliar el conocimiento sobre las interacciones entre esporas de musgo.

Efectos sobre el desarrollo protonemático

Como hemos visto, el desarrollo de *D. scoparium* está favorecido por varios tipos de material emisor. El lixiviado de sus propios ápices favorecen el desarrollo protonemático, pero los ápices en sí parecen no tener efecto. Estos resultados indican que alguna sustancia que no está presente en los ápices de esta especie, pero que sí aparece en los lixiviados está favoreciendo su desarrollo. Es posible que la sustancia que favorece el desarrollo sea un producto del metabolismo de organismos asociados a los musgos, como hongos o bacterias. Este tipo de interacción está bien descrita en plantas vasculares (Yedidia *et al.*, 2001; Hossain *et al.*, 2017) y los pocos estudios que lo han analizado también han documentado un efecto positivo de los hongos sobre el desarrollo de los protonemas (Servetaz, 1913; Von Maltzahn & MacQuarrie, 1958).

Además, los ápices y esporas de *H. cupressiforme* también favorecen el desarrollo de *D. scoparium*, pero no así sus lixiviados. Este resultado es destacable porque es la primera vez que se describen interacciones positivas interespecíficas para protonemas de musgos. Además, el hecho de que los lixiviados no tengan efecto implica que debe existir una síntesis activa de metabolitos por parte de *H. cupressiforme*.

Sin embargo, cuando *D. scoparium* participa de la interacción como emisor observamos efectos negativos en el desarrollo de *H. cupressiforme*. El conjunto de los resultados puede dar una idea del comportamiento de *D. scoparium* en relación con las interacciones competitivas. Se asume que existen dos grandes categorías de competición entre las plantas (Werner, 1976). Por un lado, están aquellas plantas que llegan antes, se establecen y se apropian del terreno (primocolonizadores); y por otro las que aparecen más tarde, pero son capaces de interferir en el éxito de las primeras y desplazarlas (competidores interactivos). *D. scoparium* podría tratarse de un competidor interactivo. Por un lado, el desarrollo temprano de *D. scoparium* se ve favorecido por la presencia de ápices de otras especies, especialmente por *H. cupressiforme*, una especie con la que, en general, convive con frecuencia tanto en Centroeuropa como en el Sistema Central (Vicente & Ron, 1989; Muñoz *et al.*, 1995; Stebel *et al.*, 2015). Por otro, inhibe el desarrollo de las otras especies (Tabla 9 y 12). Además, varios trabajos documentan la ausencia de *D. scoparium* hasta etapas intermedias de la sucesión forestal (McCullough, 1948; Heinselman, 1981; Fanta, 1986; Shirokikh *et al.*, 2013). Estos resultados se han achacado a la necesidad de un dosel arbóreo y de una capa más o menos gruesa de materia orgánica para el establecimiento de *D. scoparium* (Heinselman, 1981; Fanta, 1986). Sin embargo, las floras briofíticas

documentan la presencia de *D. scoparium* en zonas soleadas y rocosas (Cortini, 2001; Smith, 2004; Guerra & Cros, 2015). Nuestros resultados apuntan a que esta presencia tardía puede deberse a algún compuesto promotor. En plantas vasculares se conoce que la materia orgánica, por ejemplo la hojarasca, puede condicionar la germinación de las semillas (Facelli & Facelli, 1993; Bosy & Reader, 1995). Considerando el comportamiento de *D. scoparium* en estos experimentos, es posible que su presencia en fases intermedias se deba a una promoción por interacciones específicas mediadas por sustancias hidrosolubles, para lo que sería necesaria a presencia previa de otras especies.

Posiblemente, la sustancia promotora sea una sustancia hidrosoluble común, como un azúcar. También podría tratarse de una fitohormona: algunos protonemas no solo responden a las hormonas disueltas del medio externo; sino que reaccionan de forma distinta que cuando es endógena (Reutter *et al.*, 1998; Sabovljevic *et al.*, 2014).

Contrastando con los resultados del grado de desarrollo, la cobertura de *D. scoparium* es similar en los distintos experimentos. Podría tratarse de un efecto producido por el agotamiento de nutrientes en el medio, pero el trabajo de Núñez *et al.* (2011) apunta a que los requerimientos nutricionales de los protonemas son muy bajos y no llegan a consumirlos en los cortos periodos de cultivo aquí considerados. Igualmente, el desarrollo protonemático de *D. scoparium* con sus propios ápices es similar al del control, es decir, no se favorece el desarrollo (Tabla 9); mientras que la coexistencia con ápices de las otras especies lo favorecen. Parece que *D. scoparium* se autoinhibe, de forma que bloquea el desarrollo de nuevos individuos equilibrando la cobertura conseguida por los protonemas.

De hecho, los resultados del comportamiento de esporas de *D. scoparium* en función de la densidad, empleando medio líquido, sigue las curvas dosis respuesta ya documentadas en otras especies (Núñez *et al.*, 2011; García-Redondo & Estébanez, 2013) siempre que las densidades sean bajas e intermedias; sin embargo, tras alcanzar un valor crítico favorecen su propio desarrollo. Este comportamiento intraespecífico de las esporas de *D. scoparium* es otro efecto que no se había descrito previamente para otras especies. Es posible que *D. scoparium* inhiba la recepción de la sustancia promotora en individuos de su misma especie; pero si se trata de una sustancia común, este posible que este siendo liberada también por las esporas y tras alcanzar un valor crítico de densidad de esporas la concentración de la sustancia promotora supere la capacidad inhibitoria.

Las exploraciones de sustancias promotoras han mostrado que las auxinas (NAA), las únicas hormonas empleadas, y las vitaminas (timina, piridoxina y ácido nicotínico) inhiben los protonemas de *D. scoparium* (Tabla 16). Otros autores también documentan un efecto inhibitorio de las auxinas sobre los cloronemas, aunque observan un favorecimiento de la formación de rizoides y la ramificación y diferenciación de los caulonemas (Cove *et al.*, 2006; Sabovljevic *et al.*, 2014).

Las esporas de *H. cupressiforme* se autoinhiben, tal como documentaba García-Reondo (2013). Por el contrario, la presencia de las esporas de las otras dos especies investigadas no parece afectar el desarrollo de *H. cupressiforme*. Esto apunta a una mayor relevancia de la competencia intraespecífica que la interespecífica en las primeras fases del desarrollo. Sin embargo, las esporas de *H. cupressiforme* son sensibles a la presencia de los ápices vegetativos *D. scoparium*, con un notable efecto inhibitorio, y *T. muralis*, que promueve ligeramente su desarrollo. Estos resultados, junto a los de *D. scoparium*, y la capacidad de coexistencia de estas dos especies ya indicada, señalan hacia una posible carrera armamentística mediada por sustancias hidrosolubles: las esporas de *D. scoparium* se favorecen de la presencia de los gametóforos de *H. cupressiforme*; mientras que los gametóforos de *D. scoparium* inhiben a las esporas de *H. cupressiforme*.

Sin embargo, en contra de los resultados Núñez *et al.* (2011) y Collado *et al.* (2017), los experimentos de *T. muralis* no muestran un efecto autoinhibitorio de las esporas ni los ápices. El bajo desarrollo del control del cruce intraespecífico en comparación con los controles de los interespecíficos hace sospechar que hubo un fallo en el control que puede justificar que no hayamos encontrado esta autoinhibición y que todas las coberturas del experimento intraespecífico de *T. muralis* sean significativamente mayores. Sin embargo, al igual que ocurría con las esporas de *D. scoparium*, el desarrollo de las esporas de *T. muralis* se ve favorecido por la presencia de los hongos que aparecen sobre sus propios ápices.

Todos los experimentos con material emisor de *D. scoparium* (esporas, ápices y lixiviados) han inhibido el desarrollo de *T. muralis*, con lo que se comporta paralelamente a la agresividad que ha presentado esta especie en nuestros resultados contra *H. cupressiforme*. Además, estos resultados corroboran los trabajos de Mishler y Newton (1988), que, al cultivar 4 especies del género *Tortula* junto a ápices de *D. scoparium*, observaron una inhibición en el desarrollo de las esporas; así como el de Basile *et al.* (2003), que registraron que los flavonoides extraídos de *D. scoparium* disminuyen el porcentaje de germinación de las esporas de *T. muralis*.

En general, los resultados indican que los protonemas de los musgos pueden interactuar con los organismos con los que conviven. Estas interacciones pueden condicionar la distribución de las especies, hasta el momento solamente justificada por las necesidades del gametóforo. Por ejemplo, según los resultados aquí obtenidos, una espora de *H. cupressiforme* sería incapaz de establecerse junto a un césped de *D. scoparium*. Conviene señalar que las interacciones observadas responden a experimentos *in vitro* y que las consideraciones ecológicas extrapoladas a la coexistencia en campo deben ser tomadas con cautela. Además, aunque pueden ser útiles para orientar futuros proyectos en el campo con estas tres especies, la realidad es que el rango de las condiciones del cultivo *in vitro* es muy limitado en comparación con la complejidad de los ecosistemas. Por ejemplo, un estudio en el que se recogió material de 9 especies de briófitos en el campo durante un año demostró que la producción de moléculas del metabolismo secundario varía estacionalmente (Peters *et al.*, 2018), lo que es prácticamente imposible de comprobar *in vitro*. Además, parece que un gran estrés ambiental favorece una mayor cantidad de interacciones positivas, ya que una precolonización suaviza las condiciones abióticas de ecosistema (Bertness & Callaway, 1994; Bertness & Hacker, 1994; Callaway *et al.*, 2002; Gavini *et al.*, 2019). Por el contrario, en nuestros resultados la mayoría de las interacciones son negativas, aunque nuestro método de cultivo implica una alta iluminación y humedad al mismo tiempo, una realidad a la que no se enfrentan nuestras especies en su ambiente y que puede estar alterando su comportamiento.

Posibles moléculas implicadas en nuestras interacciones

Aunque las limitaciones de este trabajo no permitieron realizar análisis químicos de la naturaleza molecular de nuestras interacciones sabemos que muy probablemente se trate de sustancias hidrosolubles, o por lo menos, capaces de traspasar 1 cm de medio gelificado acuoso. Además, la bibliografía documenta una serie de sustancias en nuestras especies que podrían tener un efecto alelopático.

Como posibles sustancias inhibitorias en *D. scoparium* señalamos una alta cantidad de flavonoides y biflavonoides (Geiger *et al.*, 1993; Asakawa, 1995; Basile *et al.*, 2003; Asakawa *et al.*, 2013). Los flavonoides son moléculas versátiles con varias funciones, entre ellas la alelopática (Rice, 1984; Mierziak *et al.*, 2014); de hecho, arriba ya se había comentado como los flavonoides de *D. scoparium* inhiben a *T. muralis* (Basile *et al.*,

2003). En *D. scoparium* también se ha descrito la presencia de dicraninas A y B, que son ácidos grasos con un efecto antimicrobiano (Borel *et al.*, 1993); y de oxilipinas (Rempt & Pohnert, 2010), también ácidos grasos pero con un efecto disuasorio sobre los herbívoros y que se han documentado en alelopatías de plantas acuáticas (Bacellar & Vermelho, 2013). De estas sustancias creemos que es más probable que los flavonoides sean los responsables del comportamiento de *D. scoparium*; no solamente porque son hidrosolubles y los que se presentan en mayor abundancia en esta especie, además se han documentado como alelopáticos activos en el sustrato (Weston & Mathesius, 2013; Mierziak *et al.*, 2014).

En *H. cupressiforme* también se ha documentado la presencia de flavonoides, entre ellas los hypnogenoles (Asakawa, 1995; Asakawa *et al.*, 2013; Altuner *et al.*, 2014).

No hemos encontrado documentada ninguna sustancia posiblemente alelopática para *T. muralis*. Sin embargo, además de este estudio, el trabajo de Núñez *et al.* (2011) y Collado *et al.* (2017) han demostrado una actividad inhibitoria de *T. muralis*. Además, al igual que las otras dos especies, su cultivo con microorganismos ha demostrado una capacidad antimicrobiana (Asakawa, 1995; Veljic *et al.*, 2009; Asakawa *et al.*, 2013; Altuner *et al.*, 2014). El medio de los experimentos de Núñez con *T. muralis* perdía en gran medida su efecto inhibitorio tras pasarlo por un filtro de 0.22 μm para retirar las esporas (comunicación personal). Esto podría indicar que la sustancia de carácter volátil, o una molécula de gran tamaño. Confiamos en que estudios posteriores puedan esclarecer su naturaleza.

Efectos sobre la germinación de las lechugas

Solamente las esporas de *H. cupressiforme* y el lixiviado de sus ápices vegetativos han mostrado un efecto sobre el desarrollo de las semillas de lechuga; inhibiendo el crecimiento del hipocótilo en el primer caso, y favoreciéndolo en el segundo. Sin embargo, como se comentaba en la Introducción, está bien establecida la existencia de efectos alelopáticos de los briófitos sobre la germinación y el desarrollo de las semillas (Schlatterer & Tisdale, 1969, 1969; Basile *et al.*, 2003; Tsubota *et al.*, 2006; Kato-Noguchi *et al.*, 2009, 2010; Soudzilovskaia *et al.*, 2011; Bhadauriya *et al.*, 2016; Bu *et al.*, 2017; Unal *et al.*, 2017). De hecho, el único trabajo publicado en el que se analizan briófitos como posibles agentes alelopáticos empleando el método del sándwich muestra que 3 especies de

musgos son capaces de inhibir el desarrollo de la lechuga, mientras que una cuarta, *Racomitrium japonicum*, lo facilita (Tsubota *et al.*, 2006). A diferencia de este proyecto, en el que se ha empleado material emisor vivo, estos autores siguieron el diseño original de Fujii *et al.* (2004) y los musgos fueron desecados y pulverizados; además, emplearon toda la planta, incluyendo la parte basal senescente, y no solo los ápices vegetativos como en nuestro caso.

Adicionalmente, existen evidencias de que algunas de nuestras especies son capaces de afectar al desarrollo de las plantas vasculares: Bhadauriya *et al.* (2016) refieren que los extractos en metanol de *D. scoparium* (10% de peso seco frente a volumen) son capaces de inhibir la germinación *in vitro* del mungo (*Vigna radiata*) y del garbanzo (*Cicer arietinum*); igualmente, sus flavonoides son capaces de inhibir la germinación y elongación de *Raphanus sativus* (Basile *et al.*, 2003); e incluso se ha mostrado capaz de inhibir la germinación de semillas de distintas especies en el campo (Soudzilovskaia *et al.*, 2011). En cuanto a *T. muralis*, aunque no está documentada en profundidad su capacidad alelopática frente a plantas vasculares, un trabajo relata la inhibición de la germinación de semillas de *Stipa thurberiana* y *Agropyron spicatum* cuando se colocan sobre almohadillas de 20 g de *T. ruralis* (Schlatterer & Tisdale, 1969).

El escaso efecto de las esporas, ápices y lixiviados de las especies de musgos aquí consideradas sobre la germinación de las semillas de lechuga podría deberse a la escasez de masa del material emisor. En el caso de mayor biomasa empleada (ápices), se empleaba *ca.* 5 mg de material vegetativo, que, aunque similar a lo que emplea Fujii *et al.* (2003) en el diseño original del método del sándwich, o Tsubota *et al.* (2006) en su aplicación sobre musgos, podría no ser suficiente. Otra posibilidad es que se necesiten tejidos más maduros para mostrar un efecto sobre el desarrollo de las semillas. Además, hay que tener en cuenta que, aunque la lechuga es una especie comúnmente empleada para verificar la propiedad alelopática de otras plantas (Fujii *et al.*, 2003; Cândido *et al.*, 2010) es probable que no sea una buena especie con la que contrastar las propiedades de nuestros musgos, de manera que sería preciso extender el estudio a efectos alelopáticos sobre semillas de otras especies.

La puesta a punto de la técnica modificada del sándwich nos ha permitido evaluar en condiciones controladas las interacciones entre esporas y con gametóforos; con la ventaja añadida de que el material vegetal permanece vivo. De esta manera, hemos podido constatar la existencia de interacciones mediadas por sustancias hidrosolubles entre las tres especies de musgos. De hecho, ante la poca cantidad de este tipo de trabajos, documentamos por primera vez entre los musgos interacciones interespecíficas positivas en el desarrollo temprano. Si se tiene en cuenta que las esporas y los protonemas son la fase colonizante de los briófitos, estas interacciones pueden influir en la distribución y autoecología de nuestras especies. Sin embargo, como hemos subrayado, las complicaciones metodológicas limitan su estudio. Por ello confiamos en que estos resultados y la modificación de la técnica del sándwich suponen un valioso punto de partida para nuevas preguntas e hipótesis que corroborar con trabajos de campo.

Futuras perspectivas

Como se ha comentado, los resultados que aquí se presentan dan pie a nuevos interrogantes sobre la biología de nuestras especies que pueden ser abordados:

- 1) Por una parte, se recomienda repetir los experimentos de hormonas y nutrientes con *D. scoparium* modificando algunos aspectos:
 - a. Emplear un cultivo gelificado, que aunque dificulta más que trabajar con suspensiones de protonemas, muestra un mejor desarrollo de los protonemas (Valanne *et al.*, 1976).
 - b. Repetir el experimento con sacarosa. Aunque nuestro experimento se contaminó excesivamente con hongos que mataron a las esporas, se sabe que los azúcares pueden suplir las carencias fotosintéticas de las esporas y protonemas cuando se cultivan en oscuridad (Bopp, 1968). Además, para *D. scoparium* se ha referido que una concentración de un 1.5% de sacarosa favorece su desarrollo *in vitro* de (Vujičić *et al.*, 2009). Sin embargo, el equipo de Vujičić trabaja repicando protonemas hasta conseguir un cultivo axénico (Vujičić *et al.*, 2009, 2011), a diferencia de nuestro diseño experimental que asume una contaminación del interior de las cápsulas y que no podemos eliminar sin dañar las esporas. Además, creemos que es posible que un medio gelificado reduzca las desventajas competitivas de los protonemas con los hongos manifestadas en el medio líquido usado en este trabajo.

- c. Añadir un experimento con citoquininas, una fitohormona que ha demostrado jugar un papel clave en el desarrollo temprano de los musgos favoreciendo el desarrollo de los cloronemas y la diferenciación de caulonema a brote folioso (Bopp, 1968; Bopp *et al.*, 1978; Nehlsen, 1979; Bopp & Jacob, 1986; Reski, 1997; Cove *et al.*, 2006; Sabovljevic *et al.*, 2014).
- 2) Se pone de manifiesto la necesidad de corroborar con trabajos de campo el comportamiento sugerido por las interacciones mostradas en estos experimentos. Por ejemplo, sería de interés contrastar la coexistencia en condiciones naturales de *H. cupressiforme* y de *D. scoparium* analizando la cantidad de contactos y entremezclamiento entre céspedes y tapices naturales de ambas especies; estudiar la dinámica de estos contactos y observar cómo evolucionan en el tiempo; e investigar las variables ambientales que rijan la predominancia de cada especie.
- 3) Sería interesante extender la investigación a otras especies y a los otros dos grupos de briófitos, hepáticas y antocerotas. Por ejemplo, *Hypnum plumaeforme* presenta gotas lipídicas con momilactonas A y B, dos moléculas con propiedades alelopáticas, e involucradas en la tolerancia estrés por distintos agentes, como la radiación ultravioleta, los metales pesados o las temperaturas extremas (Nozaki *et al.*, 2007; Kato-Noguchi *et al.*, 2009; Kato-Noguchi & Kobayashi, 2009; Kato-Noguchi, 2011; Kato-Noguchi & Peters, 2013). De hecho, es común que las hepáticas acumulen sustancias del metabolismo secundario en unos orgánulos lipídicos particulares (Toyota *et al.*, 1981; Neves *et al.*, 1998; Nozaki *et al.*, 2007; He *et al.*, 2013), por lo que este grupo es un buen candidato a estudios como los aquí emprendidos.
- 4) Igualmente, sería necesario extender la investigación al efecto alelopático de briófitos sobre otras especies de semillas, en especial las de aquellas plantas que convivan con los musgos con los que se trabaja.
- 5) Se propone prolongar los tiempos de cultivo y refinar las interacciones entre protonemas. Por ejemplo, el trabajo de Bopp (1963) o los trabajos realizados con hormonas (Reski, 1997; Bijelovi *et al.*, 2004; Schwartzenberg, 2006) muestran

distintas estrategias fisiológicas para los cloronemas y caulonemas. En consecuencia, cada grado de desarrollo podría responder de forma particular ante una misma sustancia o liberar distintas sustancias al medio. Además, incluir experimentos más largos abre la posibilidad de trabajar en invernadero o con experimentos de campo que se controlen esporádicamente.

- 6) Se hace necesario identificar las moléculas implicadas en estas interacciones. De hecho, las moléculas alelopáticas pueden estar implicadas en otros procesos como la defensa contra la herbivoría o en las interacciones contra microorganismos; por ejemplo, los flavonoides también son capaces de atraer o repeler especies de hongos micorrizógenos (Mierziak *et al.*, 2014). Por lo tanto, la modificación del diseño del sándwich puesta a punto en este trabajo puede revelar la existencia de moléculas con posibles aplicaciones prácticas, como pueden ser herbicidas o plaguicidas menos agresivos con el medio ambiente (Xie & Lou, 2009; da Silva *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2019), nuevos antibióticos (Borel *et al.*, 1993, 1993; Bodade *et al.*, 2008; Krzaczkowski *et al.*, 2009; Altuner & Canli, 2012) o fármacos (Spjut *et al.*, 1986; Seo *et al.*, 2008).
- 7) Por último, muchos proyectos de conservación *ex situ* de briófitos cuentan con una fase de multiplicación *in vitro* (Rowntree & Ramsay, 2005; Rowntree, 2006; Sarasan *et al.*, 2006; Rowntree *et al.*, 2011). Sin embargo, las interacciones con otras especies u otros organismos rara vez se tienen en cuenta. Dado que es posible que las interacciones aquí observadas sean de importancia en las primeras fases del desarrollo de los musgos, el conocimiento de estos procesos podría mejorar el rendimiento los planes de conservación de flora amenazada.

CONCLUSIONES

- La técnica modificada del sándwich ha demostrado ser efectiva para la verificación de interacciones en el desarrollo temprano de los musgos moduladas por sustancias hidrosolubles, y permite emplear material vivo como potencial emisor alelopático.
- Se registran por primera vez interacciones intra- e interespecíficas en estas tres especies, comunes en la Península Ibérica. Destaca que la mayor parte de estas interacciones sean neutras o negativas.
- Notablemente, el desarrollo temprano de *Dicranum scoparium* se ve favorecido por la presencia del material vegetativo de otras especies, especialmente por los ápices de *Hypnum cupressiforme*, lo que apunta a una sustancia hidrosoluble mediadora de la interacción. Es la primera vez que se demuestran este tipo de interacciones positivas interespecíficas en estados tempranos del desarrollo gametofítico en musgos, y puede ser congruente con el comportamiento de esta especie en su medio natural.
- Los experimentos con auxinas y nutrientes no mostraron efectos positivos sobre el desarrollo temprano de *D. scoparium*. En cuanto a los efectos de la densidad, el comportamiento de las esporas de *D. scoparium* se diferencia del observado hasta ahora en otras especies de musgos, ya que presenta una inhibición siguiendo una curva dosis-respuesta a densidades bajas y medias, que sin embargo se reduce en densidades altas.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutoras el haberme acogido en el corral, regurgitarme conocimiento y responder pacientemente cada vez me equivocaba o aparecía piando entre aleteos. Sin vosotras aún no habría echado el plumón.

También he de agradecer al proyecto UNITED (*Unificando nichos, interacciones y distribuciones: Un entorno teórico común para dinámica de rangos geográficos y coexistencia local*) la financiación que ha hecho posible el proyecto y a la unidad de fisiología vegetal por prestarnos sus instalaciones y materiales en general; y a Soledad Sanz y Pilar Martínez, en particular, por las hormonas y nutrientes del experimento con *D. scoparium*.

Por último, agradezco a los comités organizadores del XXII Simpósio de Botânica Criptogâmica y la Conferencia Internacional de IAB, IMOSS y SEB que aceptaran nuestras comunicaciones, brindándonos la oportunidad de difundirlos; y al Departamento de Biología de la UAM por financiar la asistencia al primero.

BIBLIOGRAFÍA

- Altuner, E.M. & Canli, K. (2012) In vitro antimicrobial screening of *Hypnum andoi* A.J.E. Sm. *J. For. Fac.*, 97–101.
- Altuner, E.M., Canli, K., & Akata, I. (2014) Antimicrobial screening of *Calliergonella cuspidata*, *Dicranum polysetum* and *Hypnum cupressiforme*. *J. Pure Appl. Microbiol.*, **8**(1), 539–545.
- Asakawa, Y. (1995) *Progress in the chemistry of organic natural products*. Springer Vienna, Vienna.
- Asakawa, Y., Ludwiczuk, A., & Nagashima, F. (2013) *Chemical constituents of bryophytes: Biochemical diversity, biological activity, and chemosystematics*, Progress in the chemistry of organic natural products. Springer Verlag, Wien ; New York.
- Bacellar, L. & Vermelho, A. (2013) Allelopathy as a potential strategy to improve microalgae cultivation. *Biotechnol. Biofuels*, **6**, 152.
- Bagdatli, M.N. & Erdağ, B.B. (2017) Spore germination and protonemal features of some mosses under in vitro conditions. *Eur. J. Biotechnol. Biosci.*, **5**, 53–58.
- Barthlott, W., Fischer, E., Frahm, J. P., & Seine, R. (2000) First experimental evidence for zoophagy in the hepatic *Colura*. *Plant Biol.*, **2**, 93–97.
- Basile, A., Cobianchi, R.C., Rigano, D., Senatore, F., Bruno, M., Rosselli, S., Conte, B., & Sorbo, S. (2011) Potential allelopathic activity of *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oil. *Plant Biosyst. Int. J. Deal. Asp. Plant Biol.*, **145**, 241–247.
- Basile, A., Sorbo, S., López-Sáez, J.A., & Castaldo Cobianchi, R. (2003) Effects of seven pure flavonoids from mosses on germination and growth of *Tortula muralis* Hedw. (Bryophyta) and *Raphanus sativus* L. (Magnoliophyta). *Phytochemistry*, **62**, 1145–1151.
- Basile, D.V. & Basile, M.R. (1988) Procedures used for the axenic culture and experimental treatment of bryophytes. En: *Methods in Bryology. Proceedings of the Bryological Methods Workshop*. Nichinan, pp. 1–16.
- Bechberger, O., Thórhallsdóttir, T.E., & Svavarsdóttir, K. (2013) The role of mosses in primary succession on Skeiðarársandur, SE-Iceland. Presentado en 25th International Congress on Polar Research, Hamburg.
- Beike, A.K., Spagnuolo, V., Lüth, V., Steinhart, F., Ramos-Gómez, J., Krebs, M., Adamo, P., Rey-Asensio, A.I., Angel Fernández, J., Giordano, S., Decker, E.L., & Reski, R. (2015) Clonal in vitro propagation of peat mosses (*Sphagnum* L.) as novel green resources for basic and applied research. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC*, **120**, 1037–1049.
- Bertness, M.D. & Callaway, R. (1994) Positive interactions in communities. *Trends Ecol. Evol.*, **9**, 191–193.
- Bertness, M.D. & Hacker, S.D. (1994) Physical stress and positive associations among marsh plants. *Am. Nat.*, **144**, 363–372.
- Bhadauriya, G., Singh, S., & Srivastava, K. (2016) Promoting and inhibiting effects of bryophyte extracts on the seed germination and seedling growth of *Vigna radiata* and *Cicer arietinum*. *Biol. Forum*, 410–416.
- Bidartondo, M.I., Bruns, T.D., Weiß, M., Sérgio, C., & Read, D.J. (2003) Specialized cheating of the ectomycorrhizal symbiosis by an epiparasitic liverwort. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **270**, 835–842.
- Bijelovi, A., Sabovljevi, M., Grubisic, D., & Konjevi, R. (2004) Phytohormone influence on the morphogenesis of two mosses (*Bryum argenteum* Hedw. and *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv.). *Isr. J. Plant Sci.*, **52**, 31–36.
- Bodade, R.G., Borkar, P.S., Saiful-Arfeen, M.D., & Khobragade, C.N. (2008) In vitro screening of bryophytes for antimicrobial activity. *J. Med. Plants*, **7**, 23–28.
- Bopp, M. (1963) Development of the protonema and bud formation in mosses. *J. Linn. Soc. Lond. Bot.*, **58**, 305–309.
- Bopp, M. (1968) Control of differentiation in fern-allies and bryophytes. *Annu Rev Plant Physiol*, **19**, 361–380.

- Bopp, M., Erichsen, U., Nessel, M., & Knoop, B. (1978) Connection between the synthesis of differentiation specific proteins and the capacity of cells to respond to cytokinin in the moss *Funaria*. *Physiol. Plant.*, **42**, 73–78.
- Bopp, M. & Jacob, H.J. (1986) Cytokinin effect on branching and bud formation in *Funaria*. *Planta*, **169**, 462–464.
- Borel, C., Welti, D.H., Fernandez, I., & Colmenares, M. (1993) Dicranin, an antimicrobial 15-lipoxygenase inhibitor from the moss *Dicranum scoparium*. *J. Nat. Prod.*, 1071–1077.
- Bornman, C.H. & Vogelmann, T.C. (1984) Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification in vitro in *Picea abies*. *Physiol. Plant.*, **61**, 505–512.
- Bosy, J.L. & Reader, R.J. (1995) Mechanisms underlying the suppression of forb seedling emergence by grass (*Poa pratensis*) Litter. *Funct. Ecol.*, **9**, 635.
- Božanić, B., Hradílek, Z., Machač, O., Pižl, V., Šťáhlavský, F., Tuřová, J., & Vele, A. (2013) Factors affecting invertebrate assemblages in bryophytes of the Litovelské Luh National Nature Reserve, Czech Republic. *Acta Zool. Bulg.*, **2**, 197–206.
- Bu, Z. J., Li, Z., Liu, L. J., Sundberg, S., Feng, Y. M., Yang, Y. H., Liu, S., Song, X., & Zhang, X. L. (2017) Bryophyte spore germinability is inhibited by peatland substrates. *Acta Oecologica*, **78**, 34–40.
- Callaway, R.M., Brooker, R.W., Choler, P., Kikvidze, Z., Lortie, C.J., Michalet, R., Paolini, L., Pugnaire, F.I., Newingham, B., Aschehoug, E.T., Armas, C., Kikodze, D., & Cook, B.J. (2002) Positive interactions among alpine plants increase with stress. *Nature*, **417**, 844–848.
- Cândido, A.C.S., Dias, A.C.R., Serra, A.P., & Christoffoleti, P.J. (2010) Potencial alelopático de lixiviados das folhas de plantas invasoras pelo método sanduiche. *Rev. Bras. Biociências*, **8**, 268–272.
- Casas, C., Brugués, M., Cros, R.M., Sérgio, C., & Infante, M. (2006) *Handbook of mosses of the Iberian Peninsula and the Balearic Islands: Illustrated keys to genera and species*. Inst. d'Estudis Catalans, Barcelona.
- Casas-García, S. & Burgaz, A.R. (2002) Contribución al catálogo de la flora terrícola acidófila (líquenes y briófitos) de la provincia de Madrid (España). *Bot. Complut.*, **26**, 9–15.
- Ceballos, G., Ehrlich, P.R., Barnosky, A.D., García, A., Pringle, R.M., & Palmer, T.M. (2015) Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Sci. Adv.*, **1**, e1400253.
- Ceballos, G., Ehrlich, P.R., & Dirzo, R. (2017) Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **114**, E6089–E6096.
- Cole, T.C.H., Hilger, H., & Goffinet, B. (2019) Bryophyte phylogeny poster. *PeerJ Preprints*, **May**, 1.
- Collado, A., Medina, N.G., & Estébanez, B. (2017) Eliminando competidores desde pequeños: inhibición del desarrollo protonemático en musgos por ápices vegetativos. Presentado en XXI Simposio de botánica criptogámica, Aranjuez.
- Cortini, C.P. (2001) *Flora dei muschi d'Italia: Sphagnopsida, Andreaopsida, Bryopsida (I Parte)*. Antonio Delfino Editore, Roma.
- Cortini, C.P. (2005) *Flora dei muschi d'Italia. Bryopsida (II Parte)*. Antonio Delfino Editore, Roma.
- Cove, D., Bezanilla, M., Harries, P., & Quatrano, R. (2006) Mosses as model systems for the study of metabolism and development. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 497–520.
- Cove, D.J., Knight, C.D., & Lamparte, T. (1997) Mosses as model system. *Trends Plant Sci.*, 99–105.
- da Silva, E.R., Overbeck, G.E., & Soares, G.L.G. (2017) Something old, something new in allelopathy review: what grassland ecosystems tell us. *Chemoecology*, **27**, 217–231.
- DeLuca, T.H., Zackrisson, O., Nilsson, M. C., & Sellstedt, A. (2002) Quantifying nitrogen-fixation in feather moss carpets of boreal forests. *Nature*, **419**, 917–920.
- Dierßen, K. (2001) *Distribution, ecological amplitude and phytosociological characterization of European bryophytes*, Bryophytorum bibliotheca. Borntraeger Gebrueder, Berlín.

- Drake, P., Grimshaw-Surette, H., Heim, A., & Lundholm, J. (2018) Mosses inhibit germination of vascular plants on an extensive green roof. *Ecol. Eng.*, **117**, 111–114.
- Elbert, W., Weber, B., Burrows, S., Steinkamp, J., Büdel, B., Andreae, M.O., & Pöschl, U. (2012) Contribution of cryptogamic covers to the global cycles of carbon and nitrogen. *Nat. Geosci.*, **5**, 459–462.
- Equihua, M. & Usher, M.B. (1993) Impact of carpets of the invasive moss *Campylopus Introflexus* on *Calluna Vulgaris* Regeneration. *J. Ecol.*, **81**, 359–365.
- Esposito, A., Mazzoleni, S., & Strumia, S. (1999) Post-fire bryophyte dynamics in Mediterranean vegetation. *J. Veg. Sci.*, **10**, 261–268.
- Estébanez, B., Draper, I., & Medina, R. (2011) Briófitos: una aproximación a las plantas terrestres más sencillas. *Bol. Real Soc. Esp. Hist. Nat.*, **9**, 19–73.
- Estébanez, B., Medina, N.G., Caparrós, R., Monforte, L., Castillo-Alonso, M. Á., Martínez-Abaigar, J., & Núñez-Olivera, E. (2018) Spores potentially dispersed to longer distances are more tolerant to ultraviolet radiation: A case study in the moss genus *Orthotrichum*. *Am. J. Bot.*, **105**, 996–1008.
- Facelli, J.M. & Facelli, E. (1993) Interactions after death: plant litters control priority effect in a successional plant community. *Oecologia*, **95**, 277–282.
- Fanta, J. (1986) Primary forest succession on blown-out area in the Dutch drift sands. In *Forest Dynamics Research in Western and Central Europe*. Wageningen, pp. 164–169.
- Fenton, N.J. & Bergeron, Y. (2006) Facilitative succession in a boreal bryophyte community driven by changes in available moisture and light. *J. Veg. Sci.*, **17**, 65–76.
- Fuertes, E. (2009) Estudio sobre la morfología y germinación de las esporas de tres especies de *Sphagnum* (Musci, Sphagnaceae). *Bot. Complut.*, **33**, 29–35.
- Fujii, Y., Parvez, S.S., Parvez, M.M., Ohmae, Y., & Iida, O. (2003) Screening of 239 medicinal plant species for allelopathic activity using the sandwich method. *Weed Biol. Manag.*, **3**, 233–241.
- Fujii, Y., Shibuya, T., Nakatani, K., Itani, T., Hiradate, S., & Parvez, M.M. (2004) Assessment method for allelopathic effect from leaf litter leachates. *Weed Biol. Manag.*, **4**, 19–23.
- García-Redondo, C. & Estébanez, B. (2013) Efectos de la densidad de esporas en el cultivo in vitro de musgos: estudio sobre seis especies y optimización de técnicas de estima. Presentado en XIX Simposio Botánica Criptogámica, Gran Canaria.
- Gavini, S.S., Suárez, G.M., Ezcurra, C., & Aizen, M.A. (2019) Facilitation of vascular plants by cushion mosses in high-Andean communities. *Alp. Bot.*, **12**.
- Geiger, H., Voigt, A., Zinsmeister, H. D., López-Sáez, J.A., Pérez-Alonso, M.J., & Velasco-Negueruela, A. (1993) The biflavones of *Dicranum scoparium* (Dicranaceae). *Z. Für Naturforschung*, **48**, 952–955.
- Gijón, A.R., Medina, N.G., & Estébanez, B. (2019) Assessing the resistance to lead and accumulation capacity of shoots, spores and adult plants to lead in four common moss species. Presentado en IAB IMOSS SEB Conference, Madrid.
- Glime, J.M. (2017) Rotifers. En: *Bryological Interaction, Bryophyte Ecology*. Michigan Technological University & International Association of Bryologists, Houghton.
- Grime, J.P., Rincon, E.R., & Wickerson, B.E. (1990) Bryophytes and plant strategy theory. *Bot. J. Linn. Soc.*, **104**, 175–186.
- Guerra, J. & Cros (2006) *Flora briofítica ibérica: Pottiales, Encalyptales*. Universidad de Murcia, Murcia.
- Guerra, J. & Cros, R.M. (2015) *Flora briofítica ibérica: Archidiales, Dicranales, Fissidentales, Seligerales, Grimmiales*. Universidad de Murcia, Murcia.
- Guerra, J. & Cros, R.M. (2018) *Flora briofítica ibérica: Hypnales*. Universidad de Murcia, Murcia.
- Hadeler, B., Scholz, S., & Reski, R. (1995) Gelrite and agar differently influence cytokinin-sensitivity of a moss. *J. Plant Physiol.*, **146**, 369–371.
- Halfpeter, G. (1994) ¿Qué es la biodiversidad? *Bull. Inst. Català Hist. Nat.*, **62**, 5–14.
- He, X., Sun, Y., & Zhu, R. L. (2013) The oil bodies of liverworts: Unique and important organelles in land plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **32**, 293–302.

- Heinselman, M.L. (1981) Fire and succession in the conifer forests of Northern North America. En: West, D.C., Shugart, H.H., & Botkin, D.B. (eds), *Forest Succession*. Springer New York.
- Hess, S., Frahm, J. P., & Theisen, I. (2005) Evidence of zoophagy in a second liverwort species, *Pleurozia purpurea*. *The Bryologist*, **108**, 212–218.
- Huether, C.M., Lienhart, O., Baur, A., Stemmer, C., Gorr, G., Reski, R., & Decker, E.L. (2005) Glyco-engineering of moss lacking plant-specific sugar residues. *Plant Biol.*, **7**, 292–299.
- Ingerpuu, N., Liira, J., & Pärtel, M. (2005) Vascular plants facilitated bryophytes in a grassland experiment. *Plant Ecol.*, **180**, 69–75.
- Jansson, P. E., Lindberg, B., & Sandford, P.A. (1983) Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. *Carbohydr. Res.*, **124**, 135–139.
- Johri, M.M. & Desai, S. (1973) Auxin regulation of caulonema formation in moss protonemata. *Nature*, **245**, 223–224.
- Jones, C.G., Lawton, J.H., & Shachak, M. (1994) Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*, **69**, 373–386.
- Kato-Noguchi, H. (2011) Convergent or parallel molecular evolution of momilactone A and B: Potent allelochemicals, momilactones have been found only in rice and the moss *Hypnum plumaeforme*. *J. Plant Physiol.*, **168**, 1511–1516.
- Kato-Noguchi, H. & Kobayashi, K. (2009) Jasmonic acid, protein phosphatase inhibitor, metals and UV-irradiation increased momilactone A and B concentrations in the moss *Hypnum plumaeforme*. *J. Plant Physiol.*, **166**, 1118–1122.
- Kato-Noguchi, H., Kobayashi, K., & Shigemori, H. (2009) Allelopathy of the moss *Hypnum plumaeforme* by the production of momilactone A and B. *Weed Res.*, **49**, 621–627.
- Kato-Noguchi, H. & Peters, R.J. (2013) The role of momilactones in rice allelopathy. *J. Chem. Ecol.*, **39**, 175–185.
- Kato-Noguchi, H., Seki, T., & Shigemori, H. (2010) Allelopathy and allelopathic substance in the moss *Rhynchostegium pallidifolium*. *J. Plant Physiol.*, **167**, 468–471.
- Kooijman, A.M. & Bakker, C. (1995) Species replacement in the bryophyte layer in mires: the role of water type, nutrient supply and interspecific interactions. *J. Ecol.*, **83**, 1–8.
- Kreutz, M. & Foissner, W. (2006) *The Sphagnum ponds of Simmelried in Germany: A biodiversity hot-spot for microscopic organisms*, Protozoological Monographs. Aachen.
- Krzaczkowski, L., Wright, M., Rebérioux, D., Massiot, G., Etiévant, C., & Gairin, J.E. (2009) Pharmacological screening of bryophyte extracts that inhibit growth and induce abnormal phenotypes in human HeLa cancer cells. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **23**, 473–482.
- Kürschner, H. (2004) Life strategies and adaptations in bryophytes from the near and middle east. *Turk. Journal Bot.*, **28**, 73–84.
- Liaimer, A., Jensen, J.B., & Dittmann, E. (2016) A genetic and chemical perspective on symbiotic recruitment of cyanobacteria of the genus *Nostoc* into the host plant *Blasia pusilla* L. *Front. Microbiol.*, **7**, 1–16.
- Liepina, L. (2012) Occurrence of fungal structures in bryophytes of the boreo-nemoral zone. *Environ. Exp. Biol.*, 35–40.
- Ligrone, R., Duckett, J.G., & Renzaglia, K.S. (2012a) Major transitions in the evolution of early land plants: a bryological perspective. *Ann. Bot.*, **109**, 851–871.
- Ligrone, R., Duckett, J.G., & Renzaglia, K.S. (2012b) The origin of the sporophyte shoot in land plants: a bryological perspective. *Ann. Bot.*, **110**, 935–941.
- Lin, C.C. & Casida, L.E. (1984) GELRITE as a gelling agent in media for the growth of thermophilic microorganisms. *Appl. Environmental Microbiol.*, **47**(2), 427–429.
- Lindo, Z. & Gonzalez, A. (2010) The bryosphere: an integral and influential component of the earth's biosphere. *Ecosystems*, **13**, 612–627.
- Maheu, M.J. (1922) Régénération du *Barbula muralis*, après quatorze ans de sécheresse, par protonémas foliaires primaires propagulifères et protonémas secondaires bulbigènes. *Bull. Société Bot. Fr.*, **69**, 330–334.
- McCullough, H.A. (1948) Plant succession on fallen logs in a virgin spruce-fir forest. *Ecology*, **29**, 508–513.

- Medina, N.G., Draper, I., & Lara, F. (2011) Biogeography of mosses and allies: does size matter? En: Fontaneto, D. (ed), *Biogeography of Microscopic Organisms*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 209–233.
- Medina, N.G. & Estébanez, B. (2014) Does spore ultrastructure mirror different dispersal strategies in mosses? a study of seven iberian *Orthotrichum* Species. *PLoS ONE*, **9**, e112867.
- Michel, P., Burritt, D.J., & Lee, W.G. (2011) Bryophytes display allelopathic interactions with tree species in native forest ecosystems. *Oikos*, **120**, 1272–1280.
- Michelfelder, S., Parsons, J., Bohlender, L.L., Hoernstein, S.N.W., Niederkrüger, H., Busch, A., Krieghoff, N., Koch, J., Fode, B., Schaaf, A., Frischmuth, T., Pohl, M., Zipfel, P.F., Reski, R., Decker, E.L., & Häffner, K. (2017) Moss-produced, glycosylation-optimized human factor H for therapeutic application in complement disorders. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **28**, 1462–1474.
- Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014) Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, **19**, 16240–16265.
- Mishler, B.D. & Newton, A.E. (1988) Influences of mature plants and desiccation on germination of spores and gametophytic fragments of *Tortula*. *J. Bryol.*, **15**, 327–342.
- Morgan, J.W. (2006) Bryophyte mats inhibit germination of non-native species in burnt temperate native grassland remnants. *Biol. Invasions*, **8**, 159–168.
- Muñoz, J. (2004) Wind as a long-distance dispersal vehicle in the southern hemisphere. *Science*, **304**, 1144–1147.
- Muñoz, J., Brugués, M., Casas, C., Cros, R.M., Ederra, A., Fuertes, E., Infante, M., & Sérgio, C. (1995) Aportaciones al conocimiento de la flora briológica española: notula XI: Hepáticas y musgos de la Liébana (Cantabria N-España). *Bol. Soc. Esp. Briología*, **7**, 1–9.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473–497.
- Natalia, S., Liefvers, V.J., & Landhäuser, S.M. (2008) Effects of leaf litter on the growth of boreal feather mosses: Implication for forest floor development. *J. Veg. Sci.*, **19**, 253–260.
- Nehira, K. (1983) Spore germination, protonema development and sporeling development. En: *New Methods in Bryology*. The Hattori Botanical Laboratory, Nichinan.
- Nehlsen, W. (1979) A new method for examining induction of buds moss by cytokinin. *Am. J. Bot.*, **66**, 601–603.
- Neves, M., Morais, R., Gafner, S., & Hostettmann, K. (1998) Three triterpenoids and one flavonoid from the liverwort *Asterella blumeana* grown in vitro. *Phytother Res*, S21–S24.
- Nozaki, H., Hayashi, K., Nishimura, N., Kawaide, H., Matsuo, A., & Takaoka, D. (2007) Momilactone A and B as allelochemicals from moss *Hypnum plumaeforme*: First occurrence in bryophytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 3127–3130.
- Núñez, C., Medina, N.G., & Estébanez, B. (2011) Intraspecific competition in initial stages of the moss *Tortula muralis*: Spore-density dependence of germination and protonemal development. Presentado en XVIII International Botanical Congress, Melbourne.
- Ohlson, M., Okland, R.H., Nordbakken, J. F., & Dahlberg, B. (2001) Fatal interactions between Scots pine and *Sphagnum* mosses in bog ecosystems. *Oikos*, **94**, 425–432.
- Økland, R.H. (1994) Patterns of bryophyte associations at different scales in a Norwegian boreal spruce forest. *J. Veg. Sci.*, **5**, 127–138.
- Pedersen, B., Hanslin, H.M., & Bakken, S. (2001) Testing for density-dependent performance in four bryophyte species. *Ecology*, **82**, 70–88.
- Peters, K., Gorzolka, K., Bruelheide, H., & Neumann, S. (2018) Seasonal variation of secondary metabolites in nine different bryophytes. *Ecol. Evol.*, **8**, 9105–9117.
- Pressel, S., Bidartondo, M.I., Ligrone, R., & Duckett, J.G. (2014) Fungal symbioses in bryophytes: New insights in the Twenty First Century. *Phytotaxa*, **9**, 238–253.
- Proctor, M.C.F. (2000) The bryophyte paradox: tolerance of desiccation, evasion of drought. *Plant Ecol.*, **151**, 41–49.
- Puterbaugh, M.N., Skinner, J.J., & Miller, J.M. (2004) A nonrandom pattern of rotifers occupying lobules of the hepatic, *Frullania eboracensis*. *The Bryologist*, **107**, 524–530.

- Puttick, M.N., Morris, J.L., Williams, T.A., Cox, C.J., Edwards, D., Kenrick, P., Pressel, S., Wellman, C.H., Schneider, H., Pisani, D., & Donoghue, P.C.J. (2018) The interrelationships of land plants and the nature of the ancestral embryophyte. *Curr. Biol.*, **28**, 1–13.
- R Core Team (2018) *R: A language and environment for statistical computing*. R foundation for statistical computing. Vienna.
- Rempt, M. & Pohnert, G. (2010) Novel acetylenic oxylipins from the moss *Dicranum scoparium* with antifeeding activity against herbivorous slugs. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 4755–4758.
- Reski, R. (1997) Development, genetics and molecular biology of mosses. *Bot Acta*, **111**, 1–15.
- Reski, R., Parsons, J., & Decker, E.L. (2015) Moss-made pharmaceuticals: from bench to bedside. *Plant Biotechnol. J.*, **13**, 1191–1198.
- Reutter, K., Atzorn, R., Hadel, B., Schmölling, T., & Reski, R. (1998) Expression of the bacterial *ipt* gene in *Physcomitrella* rescues mutations in budding and in plastid division. *Planta*, **206**, 196–203.
- Rice, E.L. (1984) *Allelopathy*, 2nd ed. edn, Physiological ecology. Academic Press, Orlando.
- Rousk, K., Jones, D.L., & DeLuca, T.H. (2013) Moss-cyanobacteria associations as biogenic sources of nitrogen in boreal forest ecosystems. *Front. Microbiol.*, **4**, 1–10.
- Rowtree, J.K. (2006) Development of novel methods for the initiation of in vitro bryophyte cultures for conservation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **87**, 191–201.
- Rowtree, J.K., Pressel, S., Ramsay, M.M., Sabovljevic, A., & Sabovljevic, M. (2011) In vitro conservation of European bryophytes. *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, **47**, 55–64.
- Rowtree, J.K. & Ramsay, M.M. (2005) Ex situ conservation of bryophytes: Progress and potential of a pilot project. *Bol. Soc. Esp. Briología*, 17–22.
- Rydin, H. & Rydin, H. (1993) Interspecific Competition between *Sphagnum* Mosses on a Raised Bog. *Oikos*, **66**, 413–423.
- Sabovljevic, M., Bijelovic, A., & Dragicevic, I. (2003) In vitro Culture of Mosses: *Aloina aloides* (K.F.Schultz) Kindb., *Brachythecium velutinum* (Hedw.) B.S. & G., *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid., *Eurhynchium praelongum* (Hedw.) B.S. & G. and *Grimmia* (Hedw.) Sm. *Turk. Journal Bot.*, 441–446.
- Sabovljevic, M., Vujičić, M., & Sabovljevic, A. (2014) Plant growth regulators in bryophytes. *Bot. Serbica*, **38(1)**, 99–107.
- Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M.M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G., & Rowtree, J.K. (2006) Conservation In vitro of threatened plants—Progress in the past decade. *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, **42**, 206–214.
- Sargent, M.L. (1988) A guide to axenic culturing to a spectrum of bryophytes. En: *Methods in Bryology*. The Hattori Botanical Laboratory, Nichinan.
- Savage, J.M. (1995) Systematics and the Biodiversity Crisis. *BioScience*, **45**, 673–679.
- Scandrett, E. & Gimingham, C.H. (1989) Experimental Investigation of bryophyte interactions on a Dry Heathland. *J. Ecol.*, **77**, 838–852.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, **9**, 676–682.
- Schlatterer, E.F. & Tisdale, E.W. (1969) Effects of litter of *Artemisia*, *Chrysothamnus*, and *Tortula* on germination and growth of three perennial grasses. *Ecology*, **50**, 869–873.
- Schwartzenberg, K. (2006) Moss Biology and phytohormones - cytokinins in *Physcomitrella*. *Plant Biol.*, **8**, 382–388.
- Schween, G., Hohe, A., Koprivova, A., & Reski, R. (2003) Effects of nutrients, cell density and culture techniques on protoplast regeneration and early protonema development in a moss, *Physcomitrella patens*. *J. Plant Physiol.*, **160**, 209–212.
- Seo, C., Choi, Y. H., Sohn, J.H., Ahn, J.S., Yim, J.H., Lee, H.K., & Oh, H. (2008) Ohioensins F and G: Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory benzonaphthoxanthenones from the Antarctic moss *Polytrichastrum alpinum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 772–775.
- Servettaz, C. (1913) Recherches experimentelles sur le développement et la nutrition des mousses en milieux stérilisées. *Ann. Sci. Nat.*, **9**, 111–232.

- Shaw, A.J., Szövényi, P., & Shaw, B. (2011) Bryophyte diversity and evolution: Windows into the early evolution of land plants. *Am. J. Bot.*, **98**, 352–369.
- Shirokikh, P.S., Martynenko, V.B., & Kunafin, A.M. (2013) Experience in syntaxonomic and ordination analysis of progressive succession in cutover areas of boreal light conifer forests in the Southern Urals. *Russ. J. Ecol.*, **44**, 185–192.
- Singh, J.S. (2002) The biodiversity crisis: A multifaceted review. *Curr. Sci.*, **82**, 638–647.
- Smith, A.J.E. (2004) *The Moss Flora of Britain and Ireland*. Cambridge University Press, Cambridge, UK; New York.
- Soudzilovskaia, N.A., Graae, B.J., Douma, J.C., Grau, O., Milbau, A., Shevtsova, A., Wolters, L., & Cornelissen, J.H.C. (2011) How do bryophytes govern generative recruitment of vascular plants? *New Phytol.*, **190**, 1019–1031.
- Sousa, F., Foster, P.G., Donoghue, P.C.J., Schneider, H., & Cox, C.J. (2019) Nuclear protein phylogenies support the monophyly of the three bryophyte groups (Bryophyta Schimp.). *New Phytol.*, **222**, 565–575.
- Spjut, R.W., Suffness, M., Cragg, G.M., & Norris, D.H. (1986) Mosses, liverworts, and hornworts screened for antitumor agents. *Econ. Bot.*, **40**, 310–338.
- Stebel, A., Rosadziński, S., Wierzcholska, S., Zubel, R., & Paciorek, T. (2015) New distributional data for the moss *Dicranum viride* in Poland. *Herzogia*, **28**, 38–43.
- Swingland, I.R. & Levin, S.A. (2001) Biodiversity, definition of. In *Encyclopedia of Biodiversity*. Elsevier, pp. 377–391.
- Tan, K., Huang, Z., Ji, R., Qiu, Y., Wang, Z., & Liu, J. (2019) A review of allelopathy on microalgae. *Microbiology*, **165**, 587–592.
- Toyota, M., Asakawa, Y., & Takemoto, T. (1981) Sesquiterpenes from Japanese liverworts. *Phytochemistry*, **20**, 2359–2366.
- Troudet, J., Grandcolas, P., Blin, A., Vignes-Lebbe, R., & Legendre, F. (2017) Taxonomic bias in biodiversity data and societal preferences. *Sci. Rep.*, **7**, 9132.
- Tsubota, H., Kuroda, A., Masuzak, Hiroak., Nakahara, M., & Deguchi, H. (2006) A preliminary study on allelopathic activity of bryophytes under laboratory conditions using the sandwich method. *J. Hattory Bot. Lab.*, 517–525.
- Turetsky, M.R., Mack, M.C., Hollingsworth, T.N., & Harden, J.W. (2010) The role of mosses in ecosystem succession and function in Alaska's boreal forest". *Can. J. For. Res.*, 1237–1264.
- Tylianakis, J.M., Didham, R.K., Bascompte, J., & Wardle, D.A. (2008) Global change and species interactions in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.*, **11**, 1351–1363.
- Unal, B.T., Islek, C., Ezer, T., & Duzelten, Z. (2017) Allelopathic effects of *Palustriella falcata* (Bryophyta) extracts on wild mustard plants. *Int. J. Agron. Agric. Res.*, **11(4)**, 37–45.
- Valanne, N., Toivonen, S., & Saarinen, R. (1976) Ultrastructural changes in germinating *Dicranum scoparium*: A moss containing protein storage material. *The Bryologist*, **79**, 188–198.
- Valdecasas, A.G. (2011) Una disciplina científica en la encrucijada: la Taxonomía. *Bol. Real Soc. Esp. Hist. Nat.*, **9**, 9–18.
- Valiente-Banuet, A., Aizen, M.A., Alcántara, J.M., Arroyo, J., Cocucci, A., Galetti, M., García, M.B., García, D., Gómez, J.M., Jordano, P., Medel, R., Navarro, L., Obeso, J.R., Oviedo, R., Ramírez, N., Rey, P.J., Traveset, A., Verdú, M., & Zamora, R. (2015) Beyond species loss: the extinction of ecological interactions in a changing world. *Funct. Ecol.*, **29**, 299–307.
- Van Breemen, N. (1995) How *Sphagnum* bogs down other plants. *Trends Ecol. Evol.*, 270–275.
- Vanderpoorten, A. & Goffinet, B. (2009) *Introduction to Bryophytes*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Veljic, M., Djuric, A., Sokovic, M., Ciric, A., Glamoclija, J., & Marin, P.D. (2009) Antimicrobial activity of methanol extracts of *Fontinalis antipyretica*, *Hypnum cupressiforme*, and *Ctenidium molluscum*. *Arch. Biol. Sci.*, **61**, 225–229.
- Vicente, J. & Ron, E. (1989) Contribución al conocimiento de la flora briológica de Canencia, Sierra de Guadarrama (Madrid). *Bot. Complut.*, **14**, 75–85.

- Villarreal, J.C., Cargill, D.C., Hagborg, A., Soderstrom, L., & Renzaglia, K.S. (2014) A synthesis of hornwort diversity: Patterns, causes and future work. *Phytotaxa*, **9**, 150–166.
- Von Maltzahn, K.E. & MacQuarrie, I.G. (1958) Effect of gibberelic acid on the growth of protonemata in *Splachnum ampullaceum* (L.) Hedw. *Nature*, **181**, 1139–1140.
- Vujičić, M., Sabovljević, A., & Sabovljević, M. (2009) Axenically culturing the bryophytes: a case study of the moss *Dicranum scoparium* Hedw. (Dicranaceae, Bryophyta). *Bot. Serbica*, **33(2)**, 137–140.
- Vujičić, M., Sabovljević, A., & Sabovljević, M. (2011) Axenically culturing the bryophytes: establishment and propagation of the moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. (Bryophyta, Hypnaceae) in in vitro conditions. *Bot. Serbica*, **35(1)**, 71–77.
- Ward, M. (1960) Some techniques in the culture of mosses. *The Bryologist*, **63**, 213–217.
- Watson, M.A. (1980) Shifts in patterns of microhabitat occupation by six closely related species of mosses along a complex altitudinal gradient. *Oecologia*, **47**, 46–55.
- Watson, M.A. (1981) Chemically mediated interactions among juvenile mosses as possible determinants of their community structure. *J. Chem. Ecol.*, **7**, 367–376.
- Werner, P.A. (1976) Ecology of plant populations in successional environments. *Syst. Bot.*, **1**, 246–268.
- Weston, L.A. & Mathesius, U. (2013) Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *J. Chem. Ecol.*, **39**, 283–297.
- Wiklund, K. & Rydin, H. (2004) Ecophysiological constraints on spore establishment in bryophytes. *Funct. Ecol.*, **18**, 907–913.
- Wilson, E.O. (1985) The biological diversity crisis: A challenge to science. *Issues Sci. Technol.*, **2**, 20–29.
- Wilson, J.B., Steel, J.B., Newman, J.E., & Tangney, R.S. (1995) Are bryophyte communities different? *J. Bryol.*, **18**, 689–705.
- Xie, C. F. & Lou, H. X. (2009) Secondary metabolites in bryophytes: An ecological aspect. *Chem. Biodivers.*, **6**, 303–312.
- Zhang, Y. & Guo, L. D. (2007) Arbuscular mycorrhizal structure and fungi associated with mosses. *Mycorrhiza*, **17**, 319–325.