



Germinación y cultivo de

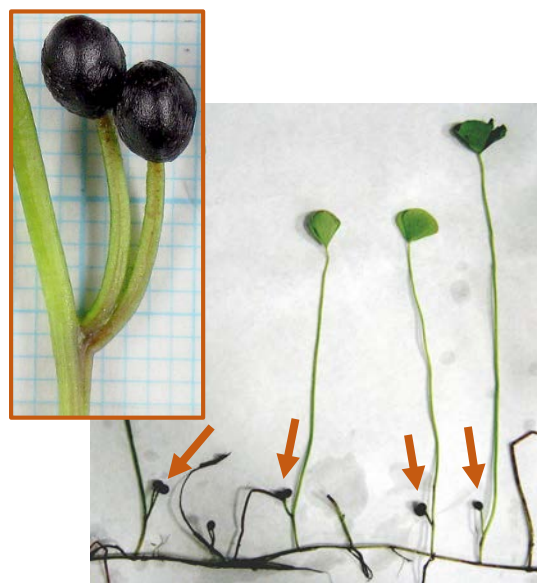
Marsilea quadrifolia L. (MARSILEACEAE):

Desarrollo de la planta a lo largo de su
ciclo vital

Algunas plantas con sistemas reproductivos evolutivamente primitivos, y especialmente aquellas que habitan en sistemas acuáticos explotados agronómicamente por el hombre, se ven en la actualidad seriamente amenazadas en el medio natural. Los productos químicos utilizados en exceso en la agricultura intensiva han degradado estos ecosistemas hasta hacer imposible la supervivencia de las especies más sensibles.

Autores: Elena Estrelles, Laura García-Mut & Ana M. Ibars

Jardí Botànic de la Universitat de València, Quart 80,
46008 Valencia, España



Formación de esporocarpos de *Marsilea quadrifolia* L. en la base de las hojas; Detalle de los esporocarpos.

Marsilea quadrifolia L.

Es una especie de gran interés para su conservación, incluida en el Convenio de Berna y la Directiva de Hábitats de la Unión Europea (92/43/CEE). En el Catálogo Español de Especies Amenazadas es una especie considerada en peligro de extinción, pero actualmente en la Comunidad Valenciana esta especie ya se encuentra extinta en estado silvestre. Diversos estudios exponen el estado de sus poblaciones (Bruni *et al.* 2013; [Estrelles *et al.* 2001a](#); [Ibars *et al.* 2004](#)).

Es una especie cuyo hábitat natural está vinculado a zonas húmedas con periodos alternados de inundación y sequía. Con frecuencia crece en campos de arroz. La principal amenaza que sufre la especie en nuestro territorio es la transformación a una actividad agrícola intensiva, con un aumento excesivo del uso de herbicidas, pesticidas y abonos, unido a la eutrofización y contaminación de las aguas, y a actuaciones directamente encaminadas a su erradicación.

El equipo de pteridología del Jardín Botánico de la Universitat de València ensayó y desarrolló técnicas de reproducción por germinación de esporas, y multiplicación vegetativa por fragmentos de rizomas (Estrelles *et al.*, 1997), a partir de material procedente del Delta del Ebro (Tarragona). Esto permitió la reintroducción y recuperación del taxon en el parque Natural del Delta ([Estrelles *et al.* 2001b](#)). Desde entonces se continúa trabajando en su conservación ([García-Mut, 2013](#)), colaborando en su propagación y cultivo para acciones de reintroducción y refuerzo que han realizado la Generalitat Valenciana y la [Generalitat de Catalunya](#) en sus poblaciones naturales.



La marsilea, o trébol de cuatro hojas acuático, es un helecho perenne con rizoma rastrero que, en condiciones óptimas, se extiende ocupando amplias áreas. Sus frondes son muy características; largamente pecioladas (15 - 25 cm), con una lámina dividida en cuatro folíolos flabeliformes de 1 a 2 cm. Su descripción completa se puede consultar en [Flora Ibérica](#) (Paiva, 1986).

Es una especie acuática de amplia distribución, euroasiática, que ocupa un área discontinua. En la Península Ibérica aparece en algunos humedales del norte de Portugal y áreas ibero-levantinas. Se pueden consultar más detalles sobre su distribución en plataformas on-line como el [Banco de datos de Biodiversidad de la Generalitat Valenciana](#) o [GBIF](#).



Detalle de la lámina cuadrifoliada y de los nudos del rizoma en plena brotación.

Es importante tener en cuenta que, tanto en el medio natural como en cultivo, la planta tiene un ciclo de desarrollo vegetativo en primavera-verano y una fase de reposo en otoño-invierno. Esto coincide con las estaciones de cultivo del arroz, por lo cual, diversas especies de *Marsilea* se han adaptado perfectamente a las condiciones de este entorno, considerándose malas hierbas. En cuanto a su propagación, *Marsilea quadrifolia* se puede multiplicar vegetativamente o por germinación de esporas.

La multiplicación vegetativa se realiza por esqueje de rizoma durante la época activa de la planta. Los rizomas arraigan con facilidad, en aproximadamente una semana. Para una zona de clima mediterráneo, el mes de mayo es un mes adecuado para la obtención y plantación de los esquejes, dado que la planta ya suele estar suficientemente crecida, tiene abundantes brotes y las temperaturas son adecuadas.

Los fragmentos de rizoma, con un mínimo de tres nudos, se depositan sobre un sustrato de tierra vegetal, preferiblemente arcilloso y se cubren con una fina lámina de agua de algunos milímetros. Se pueden utilizar pequeñas piedras para evitar que floten, dejando siempre libre la zona de los nudos por donde se desarrollarán las nuevas raíces al contacto con la tierra, así como nuevos rizomas y hojas. El desarrollo de los brotes suele ser rápido. El nivel del agua se debe subir paulatinamente hasta que tenga unos 10 cm. Normalmente en un par de semanas, dependiendo de la luz y la temperatura, las plantas estarán lo suficientemente crecidas como para trasplantarlas a macetas de cultivo, o directamente al suelo, en el terreno definitivo.

También se pueden utilizar técnicas de cultivo *in vitro* ([Banciu *et al.* 2009](#)), más complejas, cuando existen problemas de propagación específicos.



Planta adulta cultivada a partir de esquejes de rizoma.

Si la planta se va a mantener en maceta, se recomienda un tamaño mínimo de 30 cm de diámetro porque el rizoma de *Marsilea* crece rápidamente, teniendo en cuenta que debe mantenerse inundada por unos 10 cm de agua. La planta en condiciones adecuadas, exposición soleada, sustrato arcilloso y agua sin salinidad, crecerá bastante y superará con facilidad el borde de la maceta, extendiéndose y cubriendo áreas bastante grandes, de unos 3 m de diámetro, e incluso podrá colonizar macetas o terrenos aledaños.

Para la reproducción a partir de esporas se deben recolectar los esporocarpos totalmente maduros. Estas estructuras se forman durante el verano, mientras la planta está inundada, y acaban de madurar durante el otoño, cuando la planta entra en reposo. El esporocarpo es una estructura elíptica de aproximadamente 5 x 4 mm, algo comprimida, que se desarrolla en la base de las hojas, bien solitaria o en grupos de 2 a 4, sobre pedículos erectos de 1 a 2 cm. En su interior encontramos dos tipos de esporas de tamaño muy diferente, megasporas y microsporas.



Detalle de las megasporas (M) y microsporas (m)

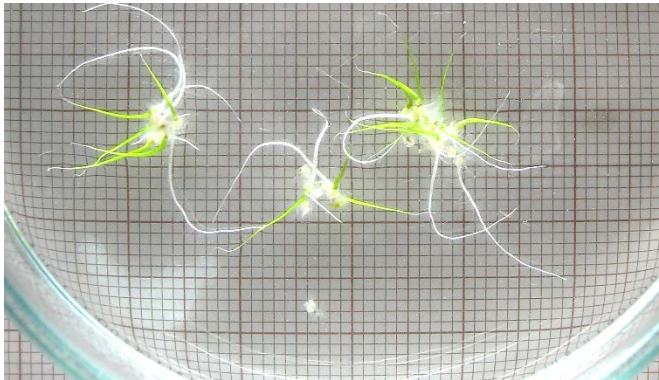
Cuando los esporocarpos están maduros y sus esporas completamente desarrolladas, estas pueden mantenerse viables en su interior durante periodos muy largos (Estrelles et al., 2001b). El esporocarpo constituye una estructura de resistencia, con función protectora, cuyas paredes muestran especial dureza. Son estructuras longevas que constituyen un banco de esporas en el suelo de tipo persistente.

Para liberar las megasporas y microsporas, que tenga lugar la fecundación e iniciar el proceso germinativo, se requiere una técnica precisa que consiste en fracturar el esporocarpo con un golpe seco con un pequeño martillo. En este proceso se debe procurar quebrar la pared sin aplastar las esporas. Después de la apertura de esta estructura protectora, se introduce en medio líquido, que puede ser simplemente agua, un medio mineral enriquecido (Dyer, 1979) o un sustrato arcilloso ligeramente inundado, de manera que quede cubierto por una fina capa de agua; unos milímetros serán suficiente. En pocos minutos (aprox. 20 min.) absorbe agua y se desarrolla una estructura hialina o gelatinosa, llamada soróforo, de un tamaño superior a tres veces el del esporocarpo. Esta estructura empuja los soros que contienen los megasporangios, con una única megaspóra, y los microsporangios, que desprenderán numerosas microsporas.



Desarrollo del soróforo. El soróforo al hidratarse tras la ruptura de la pared del esporocarpo empuja los soros, paquetes de macro y microsporas, liberando las esporas en el medio acuoso. Fotografía: ©Laura García).

En este género el gametofito es endospórico, por ello tras la fecundación que se produce en 1 ó 2 días, observaremos directamente la aparición de las primeras hojas filiformes del esporofito.



Desarrollo incipiente de los esporofitos tras la fecundación

Para nuestras experiencias la siembra de las esporas se realizó en medio nutritivo líquido (Dyer, 1979). Se utilizaron un total de 3 esporocarpos y un mínimo de 100 megasporas por recipiente. La germinación se realizó a 15°, 20° y 25 °C con un fotoperiodo de 12/12 h y una intensidad de luz de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

T (°C)	Inicio germinación (días)	Porcentaje	T50 (días)
15	-	0,0	-
20	2	72,6	2,5
25	2	64,8	2,7

El proceso de germinación y fecundación es bastante rápido, se completa 3 a 4 días después de la siembra. Durante este proceso es recomendable agitar suavemente el medio acuoso, donde tenemos las mega y microsporas, dos o tres veces al día, para favorecer la fecundación y evitar adherencias al fondo del envase.

A partir de los resultados obtenidos se observa cierta preferencia por las temperaturas altas. Los mejores resultados se obtuvieron a 20 °C, aunque no hay diferencias significativas en cuanto al porcentaje ni a la velocidad de germinación alcanzados a 25 °C: El tercer día de incubación después de la siembra, ambas muestras han superado el punto medio de germinación (T_{50}).

Si utilizamos agua para realizar la germinación, en cuatro o cinco días deberemos trasvasar las pequeñas plántulas obtenidas a un medio con nutrientes para permitir su adecuado crecimiento.

Las primeras hojas de marsilea son filamentosas, Los folíolos característicos no aparecen hasta que la planta tiene al menos un mes de vida. Inicialmente, solo presentan 1 ó 2 folíolos. La forma cuadrifoliada típica aparece tras varios meses de cultivo. En estas fases iniciales se debe ir aumentando el nivel de agua progresivamente hasta alcanzar una profundidad aproximada de 10 a 20 cm.



- Recolectar esporocarpos maduros, totalmente secos, que suele corresponder al otoño o principio del invierno. **Es muy importante para este tipo de especies revisar la legislación vigente, y pedir los permisos necesarios.**

- Mantener los esporocarpos secos hasta el momento de su uso. Es preferible no utilizarlos recién recolectados; dejar pasar como mínimo 3 o 4 meses.

- Previamente a la siembra hay que liberar las esporas que contiene el esporocarpo (micro y megasporas) con un golpe seco que quiebre la cubierta, pero sin aplastar el contenido.

- El esporocarpo roto se hidrata en agua y las esporas se liberan.

- La temperatura de siembra debe ser de aproximadamente 20 °C. Si se realiza al exterior la mejor época es la primavera.

- El recipiente conteniendo el agua y las esporas debe agitarse suavemente, al menos un par de veces diarias.

- A partir de los tres días, si las esporas son fértiles, se puede observar en la lupa la primera hoja verde que comienza a desarrollarse en uno de los extremos de la megaspora.

- En este momento se transfieren a un sustrato arcilloso ligeramente inundado (1-2 mm de agua es suficiente). No utilizar turba como sustrato porque contiene muchas partículas que flotan en el agua.

- En 1,5 - 2 meses aparecen las primeras hojas verdaderas con 2 a 4 folíolos.

- En 3-4 meses se pueden trasplantar a macetas que se mantendrán inundadas en contenedores, hasta su ubicación definitiva.

- Las plantas adultas se pueden propagar vegetativamente con facilidad, mediante fragmentos de rizoma.

En el siguiente esquema se resume el ciclo vital de esta especie:



Detalle del ciclo vital de *Marsilea quadrifolia* @Laura García

Tras el cultivo de las plantas obtenidas, bien por esqueje o bien por germinación, las macetas cultivadas generaron multitud de esporocarpos durante el siguiente mes de julio. Sin embargo, no se recomienda su recolección hasta el otoño, pues estos esporocarpos no están maduros todavía, y las esporas todavía no son viables.



Esporocarpos de *Marsilea quadrifolia* formados en las plantas cultivadas en el Jardí Botànic de la Universitat de València



139-13 MARSILEA
Marsilea quadrifolia L.
Trèvol de quatre fulles
Trébol de cuatro hojas
-13B/balsa

Proceso de trasplante de plantas de *Marsilea quadrifolia*

Extensión de los rizomas de la planta cultivada en la Balsa del Jardí Botànic de la Universitat de València

Diploide- Individuo formado por células con dos juegos de cromosomas homólogos en su núcleo.

Endospórico- Dispuesto en el interior de la espóra.

Esporangio- Estructura donde se forman y permanecen las esporas hasta el momento de su dispersión.

Esporocarpo- Estructura de gran resistencia, característica de la familia botánica Marsileaceae, que alberga en su interior los soros con megasporangios y microsporangios, donde se forman las esporas (mega y microsporas).

Esporofito- Fase diploide de las plantas que tienen alternancia de generaciones en su ciclo vital. El esporofito produce por meiosis esporas haploides.

Filiforme- Que tiene aspecto de hilo.

Flabelformes -Con forma de flabelo o abanico.

Foliolo- Cada una de las piezas que forman la lámina foliar de una hoja compuesta.

Gametofito- Fase haploide de las plantas que tienen alternancia de generaciones en su ciclo vital. El gametofito produce gametos sexuales que tras la fecundación dan lugar al esporofito diploide.

Haploide- Individuo formado por células con un único juego de cromosomas.

Heterospóreo- Que tiene distintos tipos de esporas. Las megasporas generan gametofitos femeninos y las microsporas los gametofitos masculinos.

Pteridología-Sección de la ciencia botánica que se ocupa del estudio de las plantas de la división Pteridophyta, a la que pertenecen los helechos. Es el grupo de plantas vasculares sin flores ni semillas.

Rizoma- Tallo más o menos subterráneo sobre el que se desarrollan las yemas de crecimiento. En el caso de *Marsilea*, de él brotan numerosas raíces y hojas.

Soro- Estructura en la que se disponen, de manera más o menos agrupada, los esporangios.

Soróforo- Estructura, normalmente de carácter mucilaginoso, que porta los soros o agrupaciones de esporangios.

T₅₀- Parámetro para analizar la velocidad de germinación. Es el tiempo que tarda una muestra de esporas o semillas en superar el 50% de su germinación total.



Agradecimientos

Tenemos que agradecer la colaboración de Juan Manuel Calatayud Sanz, Oficial jardinería del Jardí Botànic de la Universitat de València, por su inestimable ayuda, que ha hecho posible la realización de este trabajo. Este trabajo se ha cofinanciado por la Generalitat Valenciana (Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural, Servicio de Biodiversidad) y la Universitat de València.

Referencias bibliográficas

- Banciu C, Carasan ME & Brezeanu A. 2009. In vitro propagation of the endangered species *Marsilea quadrifolia* L.-morphological and biochemical analysis of the regenerates. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(1), 4139-4145.
- Bruni I, Gentili R, De Mattia F, Cortis P, Rossi G & Labra M. 2013. A multi-level analysis to evaluate the extinction risk of and conservation strategy for the aquatic fern *Marsilea quadrifolia* L. in Europe. *Aquatic botany*, 111, 35-42.
- Dyer AF. 1979. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In: Dyer AF (Ed.) *The experimental biology of ferns*. Academic Press. London, pp. 253-305.
- Estrelles E, Ibars AM, Iranzo J & Laguna E. 1997. Desarrollo de técnicas de multiplicación en *Marsilea* L. (Marsileaceae, Pteridophyta). XII Simposio de Botánica Criptogámica, Valencia, pp. 325-326.
- Estrelles E, Ibars AM & Herrero-Borgoñón JJ. 2001a. Situación de las poblaciones valencianas del género *Marsilea*: medidas para su conservación. *Bot. Complutensis* 25: 241-249. (Accesible en: <http://revistas.ucm.es/index.php/BOCM/article/viewFile/BOCM0101110241A/6391>).
- Estrelles E, Ibars AM, Iranzo J & Morales F. 2001b. Recuperación y reintroducción de *Marsilea quadrifolia* L. en los arrozales del delta del Ebro (Tarragona, España). *Bot. Complutensis* 25: 251-259. (Accesible en: <http://revistas.ucm.es/index.php/BOCM/article/viewFile/BOCM0101110251A/6392>).
- García-Mut L. 2013. Buscando tréboles de cuatro hojas. Espores, la veu del Botànic. (Accesible en: <http://espores.org/es/investigacion/marsilea.html>).
- Ibars AM, Estrelles E & Güemes J. 2004. *Marsilea quadrifolia* L. In: Bañares Á, Blanca G, Güemes J, Moreno JC & Ortiz S. (eds.). *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculosa Amenazada de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Madrid, p. 79. (Accesible en: http://www.mapama.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/903_tcm7-149550.pdf).
- Paiva J. 1986. *Marsilea* L. In: Castroviejo & al. (Eds.) *Flora Ibérica* vol. 1. CSIC. Madrid, pp. 66-69.



A efectos bibliográficos, se sugiere citar este documento como:

García-Mut L, Estrelles E & Ibars AM. 2016. Germinación y cultivo de *Marsilea quadrifolia* L. (MARSILEACEAE): Desarrollo de la planta a lo largo de su ciclo vital. *Botanic asPPECTS* 2.1: 1-7.