



Propagación de

## *Asplenium celtibericum*

**Rivas Mart. (ASPLENIACEAE)**

a partir de sus esporas.

El estudio de la respuesta germinativa de especies raras o amenazadas permite establecer protocolos de germinación que aportan la información necesaria para su propagación, y por tanto colaboran a su conservación. Las especies de pequeño tamaño que buscan refugio entre las rocas muestran un carácter poco competitivo frente a otras especies, y suelen desarrollar estrategias diferentes que les permiten sobrevivir en lugares donde otras plantas no pueden.

**Autores: María Tarín, Elena Estrelles & Ana M. Ibars**

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



Desarrollo del prótalo un mes después de la siembra, tras la germinación de las esporas a 20°C.

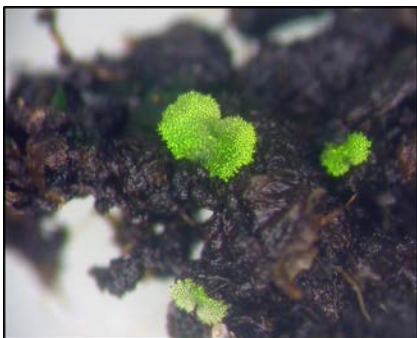
## *Asplenium celtibericum*

Con distribución fundamentalmente ibero-norteafricana, alcanzando el SE de Francia, esta especie de pteridofito forma poblaciones de pocos individuos sobre grietas de sustrato calizo.

Su presencia en la Comunidad Valenciana es muy escasa, existiendo una única población, el "Portell de l'Infern", situada en el Parque Natural de la Tinença de Benifassà, (Pobla de Benifassà, Castellón), situada a partir de los 1000 m de altitud. Su escasez sumada a la amenaza del cambio climático, generan el gran interés de la conservación de esta especie.



Pared de roca caliza, hábitat de *A. celtibericum*.



Primeras prótalos con forma acorazonada.

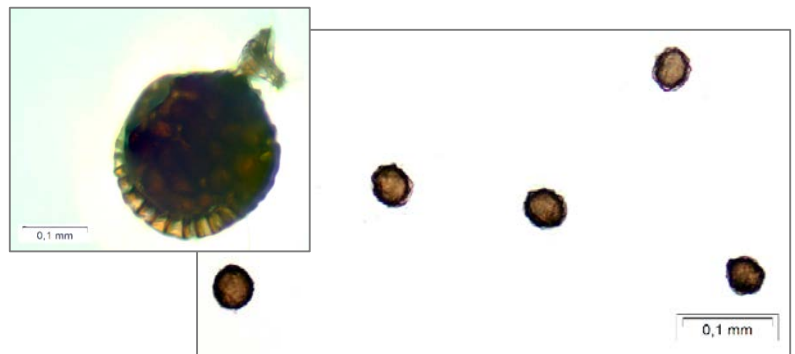
Este pequeño pteridofito, con un porte máximo de unos 10 cm, es capaz de colonizar pequeñas fisuras húmedas que aparecen a lo largo de paredes de caliza expuestas a un clima muy seco y soleado, como es el mediterráneo (Delgado & Plaza, 2006). Es una planta de aspecto inconfundible. Sus frondes, dispuestas en haces laxos, son pecioladas y terminan en un segmento romboidal con borde inciso-dentado. Los soros se distribuyen a lo largo del envés en la madurez, con indusio univalvo, característico del género *Asplenium*, que protege a los esporangios hasta su madurez, momento de la liberación de las esporas. Ésta se produce entre marzo y septiembre (Aguilella *et al.*, 2010).



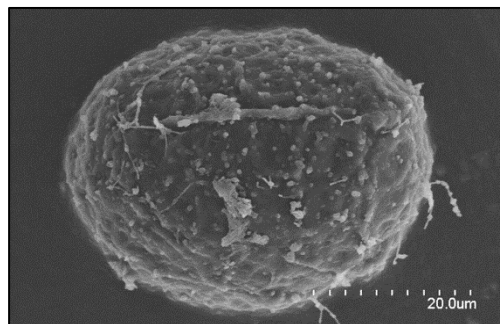
Envés de una fronde con esporangios maduros, abiertos, que ya han dispersado las esporas.

En un hábitat tan seco la reproducción de este helecho depende de los aportes de agua de cualquier tipo. *A. celtibericum* se refugia en zonas donde las criptoprecipitaciones aportan el agua que necesita para completar su ciclo vital; es por ello que su principal amenaza es el cambio climático.

Las esporas, de 44 x 34  $\mu\text{m}$  aproximadamente, presentan forma de esférica a elíptica, y su coloración es marrón con tonos dorados.



Detalle del esporangio (izq.) y de las esporas al microscopio óptico (der.).



Vista polar de una spora de *A. celtibericum* en el microscopio electrónico de barrido, mostrando la apertura lineal típica de las esporas

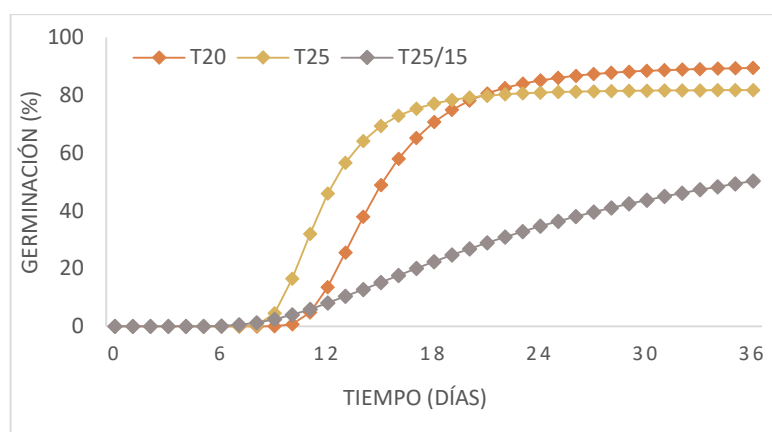
En esta ficha se pretenden caracterizar los primeros pasos de la germinación en función de las condiciones térmicas hasta la obtención de planta con el fin de establecer el protocolo más adecuado, y así facilitar futuras acciones de conservación, como son refuerzos en sus poblaciones naturales. El estudio se ha realizado sobre la única población conocida en la Comunidad Valenciana, el “Portell de l’Infern” en la localidad de la Pobla de Benifassà.

La germinación de las esporas se ha llevado a cabo en placas de agar al 1% con un medio nutritivo mineral (Dyer, 1979). El seguimiento de ésta se ha realizado mediante recuentos sobre 100 esporas durante un periodo de 36 días. Después de la siembra las esporas se mantuvieron en cámaras de incubación a temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30 y 25/15 °C y un fotoperiodo de 12/12 h con intensidad de luz de 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Para observar el desarrollo del gametofito se sembraron esporas en botes de polipropileno herméticos transparentes de 5 cm de diámetro sobre un sustrato a base de turba negra y arena en proporción 5:1, y se incubaron a 25 °C e idéntico fotoperiodo. Semanalmente se deben revisar, por si necesitan riegos adicionales con spray. El sustrato debe mantenerse húmedo, pero nunca encharcado. En todas las condiciones testadas se sembraron cuatro repeticiones o replicas para que los resultados sean más fiables y poder aplicar métodos de análisis estadístico.

Los resultados muestran que la germinación de las esporas de esta especie tiene una gran dependencia de la temperatura. A 10 °C y 15 °C no hemos observado germinación. Los mejores resultados se han obtenido a 20 y 25 °C, ya que no se ha observado germinación a temperaturas más bajas. Los tiempos medios de germinación para ambas temperaturas son 16 y 14 días respectivamente. A 30 °C la respuesta germinativa de las esporas es irregular y mucho más baja. A temperatura alterna, 25/15 °C, la germinación se produce a un ritmo muy lento (véase el gráfico), y no alcanza porcentajes muy altos ya que se ve limitada por la temperatura más fría. Se puede observar un aumento de la desviación esperable respecto a los valores medios obtenidos al alejarnos de las condiciones óptimas de germinación de la especie.

| Condición       | Inicio germinación (días) | Germinación (%) | TMG (días) |
|-----------------|---------------------------|-----------------|------------|
| 20°C, 12/12h    | 9                         | 89,8 ± 3,8      | 16,2 ± 2,7 |
| 25°C, 12/12h    | 4                         | 81,3 ± 18,2     | 14,2 ± 3,9 |
| 25/15°C, 12/12h | 14                        | 71,2 ± 21,4     | 27,3 ± 5,7 |
| 30°C, 12/12h    | 11                        | 25,5*           | -          |

Tabla. Resultados de germinación de las esporas de *A. celtibericum*, mostrando el inicio, el porcentaje y el tiempo medio de germinación (TMG) a diferentes condiciones de temperatura (valores medios ± desviación estándar). \*Solo dos de las cuatro réplicas germinaron. Las réplicas germinadas no llegaron a desarrollarse bien tras la germinación.



Tras aproximadamente 9 días se observan las primeras esporas germinadas y en menos de un mes el proceso de germinación se completa si la temperatura es la adecuada.

Gráfico de representación de la evolución de la germinación en el tiempo en las condiciones de temperatura 20, 25 y 25/15°C.

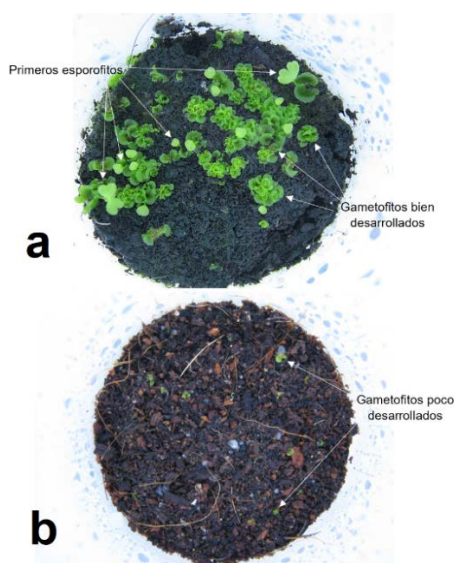


Con estos datos podemos afirmar que *Asplenium celtibericum* tiene un rango de temperaturas óptimas bastante estrecho en el que la germinación es efectiva. Parece que evita las bajas temperaturas del otoño e invierno. Este hecho podría deberse a una adaptación de la especie al medio en el que habita, puesto que en las paredes verticales donde crece, extremadamente expuestas y a una altitud elevada, la formación de hielo durante la época más fría puede dañar el gametofito en sus primeras fases de desarrollo.

Por tanto, en el medio natural, se podría considerar que la planta establece su periodo de germinación y desarrollo de los gametofitos óptimo en la primavera temprana, cuando la temperatura media no desciende por debajo de los 20 °C, y antes de que llegue la temporada seca característica del verano en el mediterráneo. (Datos de temperatura extraídos de [www.globalbioclimatics.org](http://www.globalbioclimatics.org)).

En cuanto al crecimiento del gametofito, en las pruebas de siembra directa en tierra a 25 °C se observa un buen desarrollo de los prótalos, que son bien visibles sobre el sustrato. Tras la fase inicial de germinación, los gametofitos comienzan a desarrollarse y a aumentar en tamaño, por lo que se recomienda repicarlos periódicamente a botes con sustrato nuevo para disminuir su densidad, ya que ésta puede ralentizar el desarrollo normal de las jóvenes plantas. Bajo estas condiciones, la aparición de los primeros esporofitos puede darse tras 2-4 meses desde la siembra en tierra.

Los gametofitos obtenidos por la germinación de las esporas en las placas de agar fueron repicados a tierra al finalizar el mes de germinación para que pudieran continuar su desarrollo, pero su crecimiento fue mucho más lento, siendo los que germinaron a 20 °C los únicos que prosperaron.



Desarrollo de los gametofitos de *A. celtibericum* y aparición del esporofito a los dos meses de la siembra directa en tierra a 25°C (foto superior) y de la siembra en agar y posterior repicado (al mes) a tierra (foto inferior) a 20°C.

- En especies con elevado nivel de amenaza hay que revisar y cumplir la normativa legal vigente, y disponer de los permisos necesarios para poder trabajar con ellas.

- Recolección cuidadosa de pequeñas frondes sin dañar la planta. Se recomienda disponer de unas pequeñas tijeras para separar la parte distal donde se sitúan los esporangios, sin tener que tirar de las hojas. Estas porciones se deben recoger en un sobre de papel satinado y dejar secar varios días con un prensado ligero.

- Después de un secado mínimo de una semana, se debe comprobar si se ha producido la apertura de los esporangios, liberando las esporas sobre el papel. Se observará como un polvo marrón en el fondo.

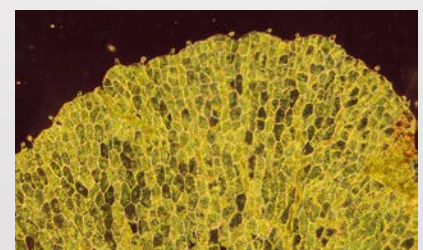
- La siembra de las esporas se puede hacer directamente sacudiendo las esporas sobre un sustrato de tierra humedecido previamente.

- Después de la siembra, y siempre que se detecte falta de humedad, se debe rociar el sustrato ligeramente con un spray de agua.

- El material sembrado se deja en un ambiente con temperatura entre 20 y 25 °C, con luz, pero no directamente expuesto al sol, para evitar el posible sobrecalentamiento.

-Aproximadamente al mes, se observarán pequeños gametofitos verdes, y a los dos meses, si la temperatura es la adecuada, tendremos ya los primeros esporofitos.

- Las plantas, según vayan creciendo, deberán trasplantarse a recipientes o macetas del tamaño creciente para que puedan continuar su crecimiento de manera adecuada.



Detalle de la estructura celular del gametofito.  
Observense los tricomas presentes en el borde.

Podemos considerar, pues, que la germinación óptima de este helecho requiere condiciones de temperatura entre 20 y 25°C y, en principio, ningún requerimiento hídrico especial, más allá de mantenerlo con un mínimo de humedad y riego regular. Sin embargo, el cultivo de los pequeños esporofitos, así como su aclimatación, ya en la fase adulta, a las condiciones exteriores, es difícil, siendo este momento en el que hay más bajas. El crecimiento ha resultado ser muy lento, se ha necesitado un periodo mínimo de dos años para obtener planta de un tamaño adecuado para llevarlos de la cámara de incubación al vivero. Es necesario implementar nuevas experiencias para mejorar el protocolo de cultivo de la planta adulta, complementándolas con experiencias desarrolladas en el medio natural.



Detalle del desarrollo de los esporofitos juvenes.

Sería interesante en el futuro estudiar la tolerancia de los gametofitos de esta especie a las temperaturas extremas y al estrés hídrico, para completar la información disponible sobre la propagación y crecimiento de esta planta en su medio natural. Aunque siempre hay que considerar que, en el micro-hábitat del interior de las grietas, en las que germinan las esporas y crecen los pequeños gametófitos, la humedad será mayor que la ambiente y las temperaturas más suaves.

Las poblaciones de pteridofitos como las de esta especie se mantienen gracias al banco de esporas que permanecen viables en el poco suelo disponible en las grietas de los cortados calizos donde viven. Este helecho se puede decir que es un especialista que, en su restringido nicho térmico, lo apuesta todo y aprovecha al máximo el limitado espacio del que dispone para poder desarrollarse, frente a otras especies generalistas capaces de germinar durante todo el año, pero no de forma tan eficaz u óptima.





**Anteridio:** Órgano reproductor masculino.

**Arquegonio:** Órgano reproductor femenino.

**Cambio climático:** Alteración de los patrones del clima global de la tierra.

**Especialista:** Especies que requieren condiciones muy concretas para poder completar su ciclo vital.

**Espora:** Unidad de dispersión, unicelular, haploide.

**Esporangio:** Órgano en el que se forman las esporas y se almacenan hasta que alcanzan su total madurez y llega el momento de su dispersión.

**Esporofito:** En el ciclo de vida de los helechos es la fase diploide, en la que se producen las esporas.

**Esporulación:** Periodo de liberación de esporas.

**Fronde:** Parte fotosintética del esporofito en la que tiene lugar la producción de esporas (hojas de los helechos).

**Gametofito:** Fase haploide del pteridofito en la que aparecen los órganos sexuales.

**Hábitat:** Lugar en el que se dan las condiciones necesarias para completar el ciclo vital de un organismo.

**Inciso-dentado:** Con entrantes y salientes agudos e irregulares.

**Indusio:** Estructura de origen epidérmico protectora de los esporangios.

**Nicho térmico:** Rango de temperaturas en el que un organismo puede desarrollarse y reproducirse.

**Peciolado:** Que presenta peciolo (segmento cilíndrico que va desde la lámina foliar al tallo).

**Prótalo:** Es el gametofito de los pteridofitos, sobre el que se desarrollan los órganos sexuales.

**Soro:** Conjunto de esporangios que se desarrollan en grupos, protegidos o no por un indusio.



Distintos aspectos del entorno natural del Parque Natural de la "Tinença de Benifassà", donde se encuentra el hábitat propio de esta planta.

### Agradecimientos

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

Aguilella A, Fos S, Laguna E. 2010. Catálogo Valenciano de Especies de Flora Amenazadas. *Colección Biodiversidad* 18. Conselleria de Medi Ambient, Aigua, Urbanisme i Habitatge, Generalitat Valenciana. Valencia.

Delgado AJ, Plaza L. 2006. *Helechos Amenazados de Andalucía*. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía. Sevilla.

Dyer AF. 1979. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. *The experimental biology of ferns*. London: Academic Press. Pp 253-305.

Ibars AM, Herrero-Borgoñón JJ, Estrelles E, Martínez Solís I. 1999. *Helechos de la Comunidad Valenciana*. Colección Biodiversidad nº 6. Conselleria de Medio Ambiente. Generalitat Valenciana. Valencia

Rivas-Martinez S, Rivas-Saenz S. 2017. *Worldwide Bioclimatic Classification System*. [online] Global Bioclimatics. Available at: <http://www.globalbioclimatics.org> [Accessed 18 Jan. 2017].

### A efectos bibliográficos, se sugiere citar este documento como:

Tarín M, Estrelles E & Ibars AM. 2018. Propagación de *Asplenium celtibericum* Rivas Mart. (ASPLENIACEAE) a partir de sus esporas. *Botanic asPPECTS* 4.1: 1 - 6.