

Botanica Complutensis
2001, 25, 251-259

ISSN: 0214-4565

Recuperación y reintroducción de Marsilea quadrifolia L. en los arrozales del delta del Ebro (Tarragona, España)

Elena ESTRELLES*, Ana M. IBARS*, Julio IRANZO* & Fermín MORALES**

* Jardí Botànic de la Universitat de València. C/ Beat Gaspar de Bono,80,
46008 València. E-mail: elena.estrelles@uv.es y ana.ibars@uv.es

** Parc Natural del Delta de l'Ebre, Edif. de Educació Ambiental, Avda Catalunya s/n,
43580 Deltebre (Tarragona)

Resumen

ESTRELLES, E., IBARS, A. M., IRANZO, J. & MORALES, F. 2001. Recuperación y reintroducción de *Marsilea quadrifolia* en los arrozales del delta del Ebro (Tarragona, España). *Bot. Complutensis* 25: 251-259.

Marsilea quadrifolia ha llegado a ser una especie desaparecida en el Delta del Ebro. En este trabajo se describe el proceso de recuperación de la especie por localización de esporocarpos en el suelo, germinación de los mismos en el laboratorio y cultivo en maceta de las plántulas obtenidas, a partir de las cuales se procede a la reintroducción de *Marsilea quadrifolia* en antiguos arrozales dentro del terreno del Parque Natural, así como las medidas de conservación *ex situ* aplicadas sobre esta especie que tradicionalmente formaba parte de las comunidades de *Orizeteta sativae* Miyawaki 1960 en esta zona.

Palabras clave: Conservación, delta del Ebro, *Marsilea quadrifolia*, reintroducción..

Abstract

ESTRELLES, E., IBARS, A. M., IRANZO, J. & MORALES, F. 2001. Recuperation and reintroduction of *Marsilea quadrifolia* in the rice fields of the Ebro's Delta (Tarragona, Spain). *Bot. Complutensis* 25: 251-259.

Marsilea quadrifolia has got to be a extincted species in the Ebro's Delta. In this work the process of recovery of the species is described by sporocarps localization in the soil, germination of the same ones in the laboratory and cultivation in pots of the obtained sporelings, from which we proceeded to the reintroduction of *Marsilea quadrifolia* in old rice fields inside the land of the Natural Park, as well as the conservation measures *ex situ* applied on this species that traditionally took part of the communities of *Orizeteta sativae* Miyawaki 1960 in this area.

Key words: Conservation, Ebro's delta, *Marsilea quadrifolia*, reintroduction.

INTRODUCCIÓN

El trabajo se planteó ante la desaparición, en los últimos años, de las poblaciones de *Marsilea quadrifolia* L. que crecían en los cultivos de arroz del Delta del Ebro. Dicha especie está estrictamente protegida por la ley española desde 1995 y en toda la Unión Europea a través del anexo II de la Directiva de Hábitats 92/43/CEE. En el reciente listado en el que se catalogan las especies españolas según el criterio de la UICN (aprobadas en 1994) se considera esta especie dentro de la categoría CR, es decir es una especie en peligro crítico (VV.AA., 2000).

La planta en estudio es un pteridófito que habita en lugares más o menos encharcados o cursos de agua con escasa reofilia; cada vez menos frecuente se puede encontrar en campos de cultivo de arroz y acequias, hábitats sujetos directamente a diferentes actividades humanas. Estos hidrófitos forman parte de las comunidades de *Orizetea sativae* Miyawaki 1960.

El hombre ha actuado tradicionalmente sobre la flora acuática frenando su desarrollo con diversos métodos. El más antiguo, la siega manual o mecánica, proporciona sólo efectos temporales, pues muchas especies poseen rizomas u otros órganos perpetuadores y rebrotan rápidamente con mayor vigor si cabe (Bernardi & Diani, 1971).

El esquema de la agricultura intensiva actual en la que se persigue una máxima productividad, mantiene un uso excesivo de herbicidas, pesticidas y abonos en los campos. Esta es una de las causas de extinción más importantes entre las que afectan a la flora amenazada (Sainz-Ollero & Hernandez-Bermejo, 1979). En el Delta del Ebro, donde es bien conocida por los agricultores, esta considerada como mala hierba de cultivo con gran capacidad extensiva.

Este factor supuso un constante castigo que acabó debilitando las poblaciones de marsilea hasta provocar su total desaparición.

En las instalaciones que dentro del parque Natural del Delta del Ebro se destinan a la recepción e información del visitante, que se conocen como «Ecomuseu» en Deltebre (Fig. 1), se conservaba estable una colección de planta viva que constituía un reservorio genético de las poblaciones de la zona. Sin embargo, por causa desconocida, estas plantas murieron después de dos años lo que llevó a actuar para evitar la total extinción de la especie.

La importancia de esta especie en el equilibrio del medio natural, especialmente en la calidad de las aguas, el interés de conservar la biodiversidad de nuestros ecosistemas, así como los resultados positivos en las pruebas de multiplicación y cultivo, tanto a partir de esporocarpos como de fragmentos de rizoma, que fueron realizadas previamente por nuestro equipo (Estrelles *et al.*, 1997; Ibars & Estrelles, 1997), han estimulado las acciones orientadas a su recuperación y reintroducción el Parque Natural del Delta del Ebro.

Las esporas de *Marsilea* son capaces de desarrollar gametófitos tan pronto como el esporocarpo está maduro, sin embargo se ha comprobado que las esporas se mantienen viables durante muchos años en los esporocarpos intactos: entre aproximadamente 30-35 años (Johansen, 1940; Gifford & Foster, 1988), unos 70



Figura 1.—Mapa de situación de la zona de reintroducción de *Marsilea quadrifolia* en el Delta del Ebro.

(Allsopp, 1952 in Tryon & Tryon, 1982) e incluso más de 100 años (comunicación personal del equipo de investigación del Conservatoire Botanique National de Porquerolles, Francia).

Cuando se abordan reintroducciones se debe dar prioridad a la utilización de material genético original del lugar, especialmente cuando existe alguna posibilidad de variabilidad interpoblacional, tal y como ocurre en otras especies de *Marsilea* (Vitalis *et al.*, 1998). Este hecho, unido a que aun no se conservan en ningún banco de germoplasma, influyó en la decisión de intentar recuperar esporocarpos del suelo que estuvo cubierto por *M. quadrifolia* durante años, dado que la especie había sido erradicada totalmente de todas las poblaciones conocidas en la zona, incluso en el propio Ecomuseu.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tras detectar la desaparición de *Marsilea quadrifolia*, antaño frecuente en los arrozales de esta zona, se realizaron sucesivas prospecciones para confirmar que ésta era total.

Al no ser posible la obtención de planta viva autóctona para proceder a su propagación vegetativa y posterior cultivo, se intentó con éxito la obtención de esporocarpos mediante el tamizado de muestras de suelo tomadas en las zonas en las que se había visto por última vez la marsilea. La zona mejor controlada y donde más probabilidad de éxito había era el terreno donde estuvo cultivada esta especie en las instalaciones del Ecomuseu dentro del propio parque natural.

De acuerdo a las observaciones de Gopal (1969) y Húsak & Otahelova (1986), las muestras de suelo se recogieron en la zona de desarrollo óptimo de la planta, que a su vez es donde se produce el mayor número de esporocarpos y por tanto donde más posibilidades de encontrarlos existen. Aproximadamente, ésta corresponde a 0,24 m por debajo del nivel máximo al que llega el agua.

Los esporocarpos son estructuras elipsoideas, ligeramente comprimidas, glabrescentes, de color prácticamente negro en su madurez, que pueden tener 2-5 × 2,5-4 mm. Los tamices utilizados para separar el material fueron siempre de luz de malla menor al tamaño de los esporocarpos, máximo de 1 ó 1,5 mm de luz.

Los esporocarpos recolectados se han conservado en el Banco de Germoplasma del Jardín Botánico de Valencia. Las condiciones de conservación de dichos esporocarpos en el banco son fundamentalmente dos, una en atmósfera seca (humedad alrededor de 5%) y temperatura ambiente y otra, también en atmósfera seca, pero a baja temperatura ($T = -20^{\circ}\text{C}$).

Una vez obtenido el material a reproducir se procedió a la multiplicación del mismo utilizando las mismas técnicas desarrolladas anteriormente con plantas valencianas (Estrelles *et al.*, 1997; Ibars & Estrelles, 1997). La técnica es sencilla, rápida y suele dar buenos resultados. De forma abreviada se describe a continuación.

Los esporocarpos maduros se abren mediante un golpe suave con el fin de provocar grietas en su cubierta; se introducen en una placa petri con agua desionizada y en unos minutos observaremos como se expande su contenido, empujando los paquetes de microsporas y megasporas al exterior. Se debe mantener una ligera agitación para evitar que las megasporas se adhieran al fondo de la placa utilizada.

A partir de aquí se inicia ya el proceso de reproducción y cultivo para la obtención de planta adulta que será reintroducida en el medio natural.

Rápidamente tras la fecundación se obtienen pequeños esporofitos que desarrollan una fronde filiforme verde y numerosas radículas (Fig. 2 a). Las plántulas obtenidas se transplantan a macetas con un sustrato totalmente encharcado.

La composición del sustrato que mejor ha funcionado para el cultivo de estas plantas en maceta fue turba rubia y arcilla (1:2). El pH medido con tiras colorimétricas en el medio de cultivo es 7. Las condiciones de iluminación y temperatura durante el proceso de germinación fueron las ambientales del laboratorio (22°C).

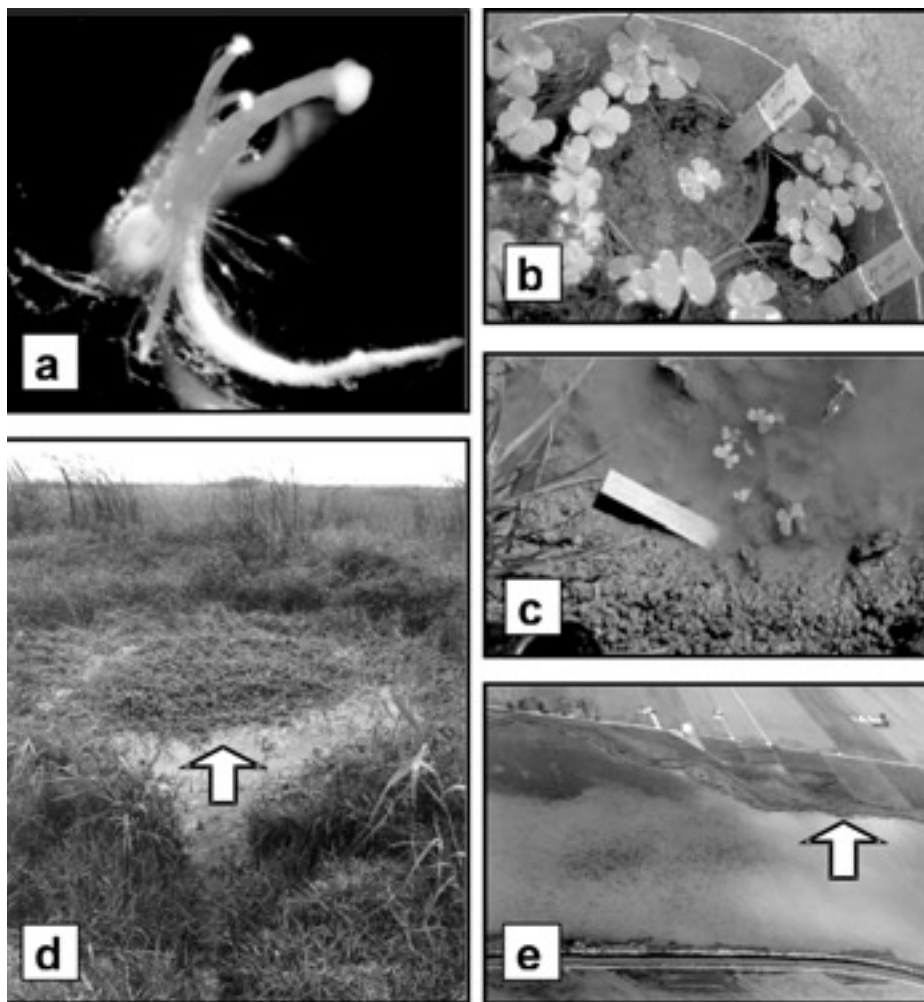


Figura 2.—Distintas fases del proceso de reintroducción de *Marsilea quadrifolia* en el Delta del Ebro. **a.** Aspecto del esporófito joven. **b.** Desarrollo del esporófito en maceta. **c.** Reintroducción de la planta adulta cultivada en el Ecomuseu del Parc Natural del Delta de l'Ebre. **d.** Detalle del desarrollo de *M. quadrifolia* a los tres meses de haber sido introducida en los arrozales restaurados al borde de la laguna de La Tancada. **e.** Situación de la zona elegida para la introducción.

Sin embargo, el crecimiento y cultivo de las plántulas en maceta ha dado mejor resultado en balsas al exterior en un lugar no totalmente expuesto al sol (Fig. 2 b).

Las plantas obtenidas por reproducción sexual fueron, a su vez, multiplicadas por reproducción vegetativa. La reproducción vegetativa en helechos no se utiliza salvo en algunas especies ornamentales, sin embargo los estudios de White (1971;

1979) son positivos respecto a la regeneración a partir de raíces o rizomas. En algunos casos se fragmentaron las plantas obtenidas y los fragmentos de rizoma se plantaron en macetas que se mantuvieron sumergidas en cubetas. En este paso se debe prestar atención a la fijación de los fragmentos del rizoma al sustrato, pues si no es así flotan y el proceso no se desarrolla correctamente.

RESULTADOS

La búsqueda de esporocarpos fue exitosa; se rastreó una zona de aproximadamente 6×4 m, en la que se tomaron 10 muestras de suelo distribuidas aleatoriamente en la parcela. Cada una de ellas de aproximadamente 1 Kg de tierra, de los 15 cm más superficiales.

Los esporocarpos son fácilmente distinguibles entre los restos tamizados. En algunos casos se pueden observar restos del pedículo. Tras el tamizado de las muestras se recolectaron un total de 125 esporocarpos.

La germinación y cultivo de estas plantas para la producción de individuos suficientes, con el fin de proceder a la reintroducción de las mismas, consta de cuatro fases.

La primera fase corresponde a la germinación de esporas, maduración de los gametófitos, posterior fecundación y desarrollo de pequeños esporófitos con 1-2 hojas verdes filiformes y numerosas radículas. Esta fase es rápida (máximo 5 días) En aproximadamente media hora, el soróforo, de textura gelatinosa, ha salido totalmente fuera del esporocarpo. Todo el desarrollo de los gametófitos (mega y micro) tiene lugar en menos de un día a temperatura ambiente. La fecundación se efectúa una vez que los gametófitos femenino y masculino alcanzan su total desarrollo, generalmente durante el segundo día después de introducir el esporocarpo en agua. El esporófito comienza su desarrollo y en tres días aparecen ya los primeros órganos fotosintéticos, de aproximadamente 1 mm y una pequeña raíz blanca que puede alcanzar enseguida los 2 mm. En el quinto día se han desarrollado ya numerosos esporófitos. En esta fase se logró un 94% de germinación y un 100% de supervivencia de las pequeñas plántulas.

En una segunda fase se procedió al paso de los esporófitos a tierra; se realizó una semana después, obteniéndose un 50% de supervivencia. Se desarrollaron correctamente y en un mes comenzaron a aparecer frondes con los típicos folíolos (Fig. 2 b).

En todos los casos se pudo observar la emisión de raíces uno o dos días después de la plantación y entre tres días a una semana la emisión de nuevas hojas, lo que supone un elevado potencial de regeneración.

Cuando las plantas alcanzaron un desarrollo adecuado se procedió a la fragmentación de las mismas para su multiplicación vegetativa. Los resultados obtenidos fueron positivos en las pruebas realizadas: 100% de supervivencia.

En la tercera fase se trasplantaron los esporófitos adultos obtenidos, para su aclimatación al medio natural (Fig. 2 c). En esta fase se produjo el mayor número

de bajas de todo el proceso, ya que sólo un 34% del material trasplantado arraigó y se desarrolló adecuadamente. En cifras reales 2 plantas de 8 sobrevivieron en una primera prueba y 10 de 25 en una segunda.

La multiplicación vegetativa por fragmentación de rizoma del material ya adaptado, en el Ecomuseu, al igual que las pruebas hechas en el Jardí Botànic de Valencia, fue un éxito.

En una última fase se realizaron varias pruebas de introducción en antiguos arrozales, a partir de fragmentos de rizoma de las plantas previamente aclimatadas en el Ecomuseu del Parc Natural del Delta de l'Ebre (Deltebre). Las tres parcelas restauradas (Comín *et al.*, 1995-96) que se han utilizado están situadas en la margen SO de la laguna de la Tancada (Fig. 1 y Fig. 2 e), que actualmente están en proceso de recuperación para su incorporación como áreas naturales. Se ha conseguido prácticamente un 100% de supervivencia y posterior colonización de dichos arrozales por *Marsilea quadrifolia* (Fig. 2 d).

La planta viva obtenida a partir de estas pruebas se conserva en el Jardín Botánico de Valencia y en el Centro de Ictiología del Palmar dependiente del Servicio de Protección de Especies de la Consellería de Medio Ambiente, donde ya hemos realizado experiencias previas con éxito absoluto (Laguna *et al.*, 1997). Todas estas actuaciones nos aseguran la preservación de esta especie tan castigada.

CONCLUSIONES

La supervivencia de las plantas que habitan en medios acuáticos, así como terrestres, fuertemente antropizados está supeditada a la acción directa del hombre. Por tanto se hacen necesarias las medidas de protección adecuadas que aseguren su conservación.

Las actuaciones para la reintroducción de *Marsilea quadrifolia* en el Parque Natural del Delta del Ebro han resultado positivas, además las medidas *ex situ* se revelan como complementarias y muy efectivas, ya que podemos controlar sus condiciones de conservación.

El material preservado en bancos de germoplasma supone la conservación a largo plazo de la diversidad propia de cada población. Esto es de gran importancia pues siempre se debe actuar con mucha precaución y evitar introducir material genéticamente diferente del propio de cada territorio para no provocar una alteración de la biodiversidad de los ecosistemas naturales, y especialmente cuando se considera la recuperación de sus poblaciones, como es nuestro caso.

Por tanto destacamos el papel de los bancos de germoplasma en la conservación de la diversidad vegetal, ya que, aunque en este caso hemos podido recurrir a la búsqueda de esporocarpos en el suelo, con mayor frecuencia nos encontramos situaciones en las que, una vez desaparecida la población, sólo podemos recurrir a material previamente recolectado y conservado en condiciones adecuadas para su propagación. Coincidimos pues con Bruegmann (1996) en el interés de conservación a largo plazo de esporocarpos.

Además de todos los esfuerzos destinados a la recuperación y conservación de la marsilea, es necesario crear una conciencia social hacia la protección de esta especie amenazada. Para ello se ha procedido al mantenimiento de planta viva en las instalaciones del Ecomuseu del Parc Natural, que son frecuentemente visitadas por grupos escolares, así como a la divulgación de la problemática creada por la desaparición de la *Marsilea quadrifolia* («agret») en medios informativos locales para sensibilizar a la población de la zona.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos especialmente la colaboración de los Técnicos de mantenimiento del Ecomuseu del Parc Natural Sr. Idiarte i Cabrera y de la Laguna de la Tancada y l'Encanyssada, Sr. Sapiña i Montañés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNARDI, G. & G. DIANI (1971). *Vegetación acuática. Identificación y métodos de lucha*. Ed. Oikos-Tau S.A. Montserrat.
- BRUEGMANN, M. M. (1996). *Recovery plan for Marsilea villosa*. US. Fish and Wildlife Service. Portland. Oregon. 55 pp.
- COMÍN, F. A., ROMERO, J. A., GARCIA, C. & V. ASTORGA (1995-96). Restauración y gestión de humedales en el Delta del Ebro (NO España). *Buill. Parc Nat. Delta de l'Ebre*, 9: 23-25.
- GIFFORD, E. M. & A. S. FOSTER (1988). *Morphology and evolution of Vascular Plants*. W. H. Freeman & Co, New York.
- ESTRELLES, E., IBARS, A. M., IRANZO, J. & E. LAGUNA (1997). *Desarrollo de técnicas de multiplicación en Marsilea L. (Marsileaceae, Pteridophyta)*. Libro de resúmenes del XII Simposio de Botánica Criptogámica, pp. 325-326. Valencia.
- GOPAL, B. (1969). Ecological studies of the genus *Marsilea* I. Water relations. *Trop. Ecol.* 9: 153-170.
- HÚSAK, S. & H. OTAHELOVÁ (1986). Contribution to the ecology of *Marsilea quadrifolia* L. *Folia geobotanica et Phytotaxonomica* 21: 85-89.
- IBARS, A. M., & E. ESTRELLES (1997). *Asistencia técnica para la conservación de especies del género Marsilea, protegidas por la directiva de Habitats*. Consellería de Medio Ambiente. Generalitat Valenciana. Inédito.
- JOHANSEN, D. A. (1940). *Plant Microtechnique*. Mc Graw-Hill Book Co., NY & London.
- LAGUNA, E., BALLESTER, G., IBARS, A. M. & E. ESTRELLES (1997). Conservación de las especies del género *Marsilea* en la Comunidad Valenciana. *Conservación Vegetal* 2: 8-9.
- SAINZ-OLLERO, H. & J. E. HERNÁNDEZ-BERMEJO (1979). Experimental reintroductions of endangered plant species in their natural Habitats in Spain. *Biol. Conserv.* 16(3): 195-206.
- TRYON, R. M. & A. F. TRYON (1982). *Ferns and allied plants with special reference to Tropical America* Springer-Verlag. NY, Heidelberg, Berlin.
- VITALIS, R., B. COLAS, M. RIBA & I. OLIVIERI (1998). *Marsilea strigosa* Willd.: statut génétique et démographique d'une espèce menacée. *Ecologia mediterranea* 24(2): 145-157.

- WHITE, R. A. (1971). Experimental studies of the sporofites of ferns. *Bioscience* 21: 271-275.
- WHITE, R. A. (1979). Experimental investigations of fern sporophyte development. In A. F. DYER (Ed.) *The Experimental Biology of Ferns*. pp. 505-549. Academic Press, London.

Original recibido: 22 de Noviembre de 2000

Versión final recibida: 6 de Septiembre de 2001