



*Protocolo de germinación de esporas y  
caracterización del desarrollo de los  
gametofitos de*

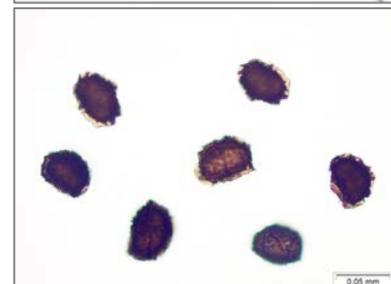
## **Asplenium majoricum Litard. (ASPLENIACEAE).**

*Los planes de conservación de flora amenazada incluyen acciones que requieren la conservación de esporas a largo plazo en bancos de germoplasma y la determinación de protocolos de germinación y cultivo de plántulas para la obtención de planta.*

*En los helechos el estudio de la respuesta germinativa y desarrollo gametofítico es fundamental para tener éxito en las labores de propagación orientadas a los programas de refuerzo y reintroducción.*

**Autores: Elena Estrelles & Ana M. Ibars**

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



Detalle de un esporangio abierto (arriba) y de las esporas (abajo)  
de *Asplenium majoricum*.

## *Asplenium majoricum*

En la Comunitat Valenciana esta especie ha pasado de vulnerable ([Decreto 70/2009](#)) a protegida no catalogada ([Orden 6/2013](#)) en el Catálogo Valenciano de Especies de Flora Amenazada, tras la localización de nuevas poblaciones en este territorio (Aguilella *et al.* 2009).

Los planes de conservación de flora amenazada financiados por la Generalitat Valenciana incluyen acciones que requieren la conservación de esporas, el desarrollo de protocolos de germinación de las mismas, cultivo de gametofitos y obtención de esporofitos. El objetivo de esta ficha es mejorar el conocimiento sobre su propagación.

El ciclo vital de esta especie, como en general de todos los helechos, requiere la presencia de agua para completar la fase sexual, permitiendo la fecundación de la ovocélula. Por ello sus individuos buscan refugio en grietas donde la humedad se mantiene elevada, y la condensación genera el ambiente adecuado.



Gametófito de *A. majoricum* en fase sexual, con anteridias y arquegonias desarrollados.



Detalle de las anteridias con anterozoides.



Detalle del arquegonio maduro y abierto, con un gameto masculino, o anterozoides (señalado con la flecha), en aproximación.

Es un helecho de pequeño tamaño, vulgarmente llamado helecho de roca o falcia. Es un endemismo baleárico-valentino que crece en grietas sobre roca caliza y muros de bancales, habitualmente con orientación norte o noroeste.

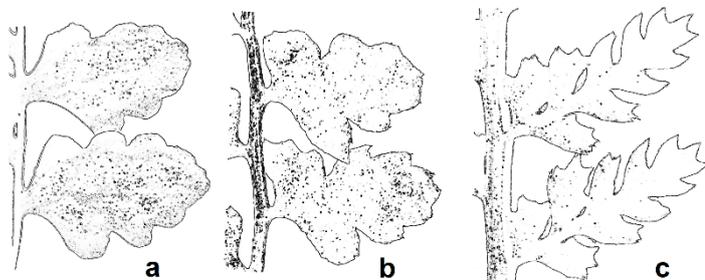
Esta especie es un alotetraploide procedente de la hibridación de *Asplenium fontanum* y *Asplenium petrarchae* subsp. *bivalens*. Sus poblaciones se encuentran distribuidas en la isla de Mallorca, donde es bastante frecuente, y en el este de la Península Ibérica, concretamente en las provincias de la Comunitat Valenciana y en el sur de Tarragona, donde son escasas y de menor tamaño, convirtiéndose en objetivo de las acciones de conservación. Hunt *et al.* (2011) señala la rareza de esta planta en los sectores Valenciano-Tarraconense y Setabense debido a la presencia de sus parentales con los que compite por el mismo hábitat.

La formación de alotetraploides en la naturaleza es un fenómeno singular relacionado con la genética de los parentales y las condiciones ecológicas. Diferentes aspectos del origen, evolución y distribución de esta planta han sido estudiados. Se puede encontrar información detallada en Hunt *et al.* (2011).



Hábitat característico de la planta.

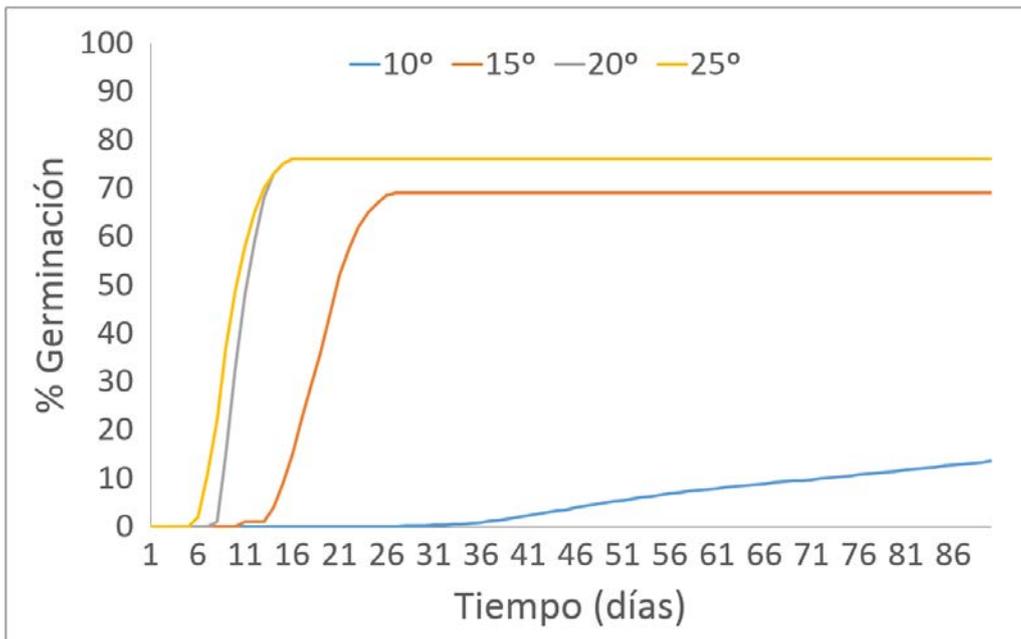
Sin una lupa, su morfología en el campo puede resultar muy parecida a la de sus parentales. Sin embargo, se distingue bien por algunas características de la fronde, semejante a la de *A. petrarchae* por tener el peciolo de color marrón y estar menos dividida (1 vez pinnada) que la de *A. fontanum* que es 2-3 veces pinnada.



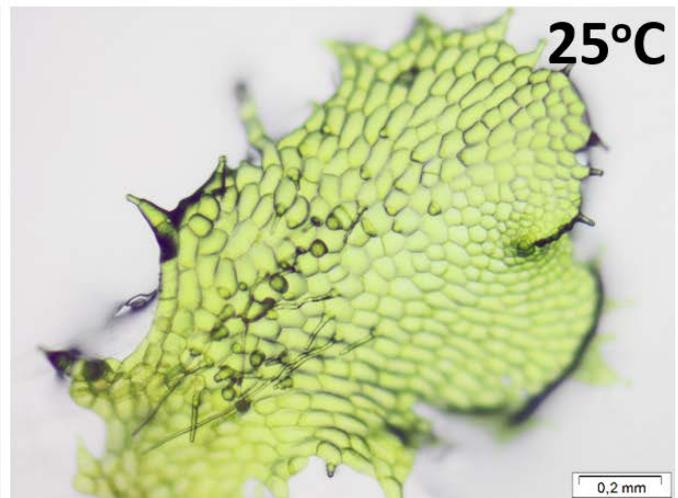
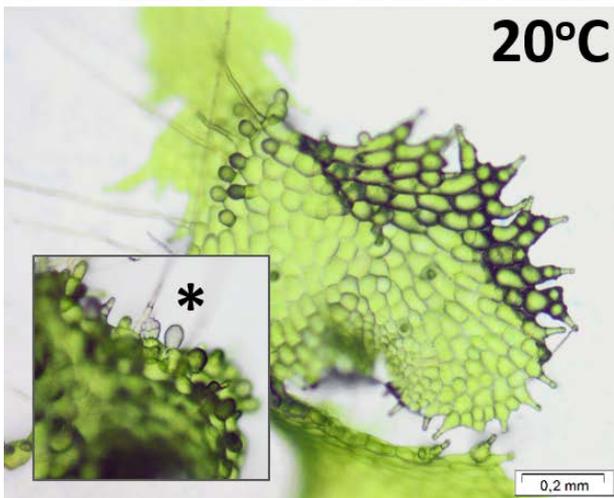
Silueta característica de las pinnas: a. *A. petrarchae*, b. *A. majoricum*, c. *A. fontanum* (Obtenidas a partir de material de herbario).

Por otro lado, solo presenta tricomas glandulosos dispersos, diferenciándose así de *A. petrarchae*, caracterizado por su gran densidad, tanto en el peciolo como en la lámina. En el envés se





Representación gráfica de la evolución de la germinación de las esporas a las diferentes temperaturas testadas.



Desarrollo de los gametofitos de *A. majoricum* 2.5 meses después de la siembra a diferentes temperaturas. \*Detalle de los anteridios que están desarrollándose a 20°C.

La germinación de las esporas, señalada por la protrusión del primer rizoide al atravesar la pared esporal, se observó aproximadamente en una semana después de la siembra en las condiciones más favorables. A 20 °C y 25 °C la germinación se completó en 14 y 16 días, respectivamente.

Muestra	Condiciones	Inicio germinación (días)	Porcentaje final (%)	TMG (días)
125B2017	10°C, 12/12h	34	13,5±1,5	59,0±2,9
125B2017	15°C, 12/12h	13	69,0±7,6	19,3±0,3
125B2017	20°C, 12/12h	8	76,2±5,3	11,1±0,9
125B2017	25°C, 12/12h	5	76,3±6,2	10,0±0,8

La fase filamentosa del gametófito, formada por 3 a 5 células, se inició alrededor del día 15 a 20 °C, y el crecimiento posterior de los gametofitos se completa muy pronto; esta especie presenta un desarrollo sexual muy rápido, los primeros anteridios y arquegonios han aparecido en 5 y 7 semanas respectivamente. Los anteridios se han desarrollado antes que los arquegonios, esta secuencia en la formación de los gametangios es la más común en los helechos homosporos (Atkinson & Stockey, 1964). En los anteridios la célula opercular es prominente, y en los arquegonios los cuellos están formados longitudinalmente por cuatro hileras de 5-7 células.

Los primeros esporófitos aparecen en 12 semanas. Los resultados son similares a los obtenidos por Prada *et al.* (1996) para las poblaciones baleáricas. Tras seis meses de cultivo más del 50% de gametófitos han alcanzado la fase esporofítica y en 8 meses se alcanza el 100%.



Primeros esporofitos de *A. majoricum* 6 meses después de la siembra en incubación a 20 °C.

Tras la aparición de las primeras hojas del esporofito, las plántulas se han repicado a alvéolos de 4 x 4 cm y posteriormente a macetas de 9 cm de diámetro cuando el desarrollo de las plantas lo requería. El cultivo se ha realizado dentro de envases transparentes cerrados hasta obtener planta adulta. La aclimatación al ambiente exterior se ha realizado durante el otoño.

*Asplenium majoricum* tiene un comportamiento estándar en cuanto a sus requerimientos de propagación.

(ver: [BotanicasPPECTS 1.1, 2015](#)).

- No se debe recolectar material de esta especie sin revisar la legislación vigente y solicitar los permisos necesarios a la Generalitat valenciana. Es una especie protegida. (Ver: [Decreto 70/2009](#) y [Orden 6/2013](#)).

- Se recomienda no recolectar más de una fronde fértil por individuo. Con poca cantidad es suficiente.

- Dejar secar las frondes prensadas entre dos hojas de papel satinado para que se abran los esporangios, liberando las esporas.

- Sembrar sobre sustrato de turba y arena fina (3:1). Es preferible sembrar poca cantidad de esporas para que la densidad de los gametofitos no sea excesiva y se retrase por ello su desarrollo.

- Mantener la humedad constante, sin encharcamiento. Se recomienda utilizar un envase de plástico con tapa para ralentizar la evaporación.

- La temperatura debe ser suave, aproximadamente 20 °C. Aunque la germinación es rápida a 25 °C, parece que el desarrollo mejora a 20 °C

- La iluminación es mejor que no sea excesiva, aunque es necesaria, tanto para la germinación como para el desarrollo adecuado de los gametófitos. Nunca en exposición directa al sol.

- La germinación se completará en un par de semanas aproximadamente, dependiendo de la temperatura.

- Humectar periódicamente con un spray suave para favorecer la fecundación. Se pueden observar esporofitos a partir de 4-5 meses.

-Realizar repicados a envases o macetas de mayor tamaño según el desarrollo de las plantas.

- Aclimatar gradualmente al exterior en zona sombreada.

**Alotetraploide**- Planta que procede de la hibridación de dos especies diferentes, pero que mantiene toda su dotación cromosómica, y por ello en lugar de ser diploide (doble dotación cromosómica), es tetraploide; tiene cuatro grupos de cromosomas (cuádruple dotación cromosómica).

**Anteridio**- Órgano reproductor masculino.

**Anterozoide**- Gameto masculino.

**Arquegonio**- Órgano reproductor femenino.

**Esporangio**- Órgano productor de esporas.

**Esporófito**- En las plantas que presentan alternancia de generaciones, fase del ciclo generalmente diploide que produce esporas haploides.

**Fecundación**- Fusión de las células reproductoras sexuales (gametos).

**Fronde**- En general significa hoja, pero más particularmente se utiliza para referirse a las hojas de los helechos.

**Fronde fértil**- Aquellas hojas que han desarrollado los soros en el envés.

**Gameto**- Célula reproductora sexual.

**Gametófito**- En las plantas que presentan alternancia de generaciones, plántula haploide y generalmente microscópica que genera los órganos reproductores: anteridios y arquegonios. También llamado prótalo.

**Gametangio**- Órganos reproductores donde se formarán los gametos. Según el sexo se denominan específicamente anteridios y arquegonios.

**Indusio**- Órgano de origen epidérmico de morfología variable, con una o varias capas de células, que protege a los esporangios de los helechos.

**Ovocélula**- Se refiere a las células sexuales, gametos femeninos u óvulos.

**Parentales**- Desde un punto de vista genético son los individuos que aportan la información genética (cromosomas) necesaria para que se desarrolle un nuevo ser; los progenitores.

**Pinna**- Es una porción o división de una fronde cuya lámina está dividida.

**Pinnada**- Es una fronde cuya lámina está dividida.

**Soro**- En los helechos, agrupaciones de esporangios que se desarrollan, protegidos o no por el indusio.

**Tricoma**- Apéndices de la epidermis de formas muy variables. Pelos vegetales.



Esporofito joven en cultivo, con un tamaño adecuado para repicar a maceta.

### Agradecimientos

Queremos agradecer al equipo de técnicos del CIEF, y en especial a Albert Navarro por su apoyo en el seguimiento de las poblaciones naturales de esta especie y su ayuda para la recolección de esporas. Este trabajo se ha cofinanciado por la Generalitat Valenciana (Consellería 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 (eds.). 2009. Catálogo Valenciano de Especies de Flora Amenazadas. Colección Biodiversidad, 18. Conselleria de Medi Ambient, Aigua, Urbanisme i Habitatge. Generalitat Valenciana. Valencia. 358 pp.
- Atkinson LR & Stokey AG. 1964. Comparative morphology of the gametophyte of homosporous ferns. *Phytomorphology* 14: 51-70.
- 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.
- Hunt HV, Ansell SW, Russell SJ, Schneider H & Vogel JC. 2011. Dynamics of polyploid formation and establishment in the allotetraploid rock fern *Asplenium majoricum*. *Annals of botany* 108: 143-157.
- Nogueira I & Ormonde J. 1986. *Asplenium* L. In: Castroviejo & al. (Eds.) *Flora Ibérica* vol. 1. CSIC, Madrid, pp. 90-92.
- Prada C, Pangua E, Herrero A & Pajarón S. 1996. Estudio comparativo de los gametófitos de *Asplenium majoricum* Litard. (Aspleniaceae) y táxones relacionados. *Anales del Jard. Bot. Madrid* 54: 126-136.
- Pangua E, Prada C, Pajarón S & Salvo E. 1992. A new *Asplenium* hybrid from Valencia (Spain) related to *A. majoricum* Litard. *Botanical Journal of the Linnean Society* 108(1): 1-13.



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Jardí Botànic



GENERALITAT  
VALENCIANA

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

Estrelles E & Ibars AM. 2017. Protocolo de germinación de esporas y caracterización del desarrollo de los gametofitos de *Asplenium majoricum* Litard. (ASPLENIACEAE). *Botanic asPPECTS* 3.1: 1-6.