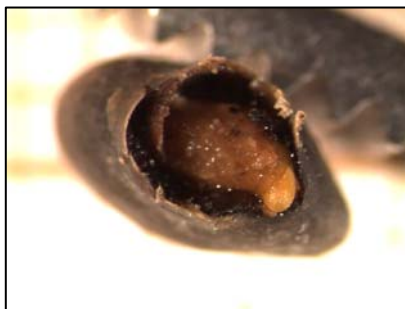


**Producción *ex situ* de material vegetal de reproducción de
Frangula alnus subsp. *baetica* por parte del Servicio de
Espacios Naturales y Biodiversidad**

Servicio de Espacios Naturales y Biodiversidad (Generalitat Valenciana)

CIEF - Banc de Llavors Forestals de la Generalitat Valenciana

Agosto, 2012



Dentro del Catálogo Valenciano de Especies de Flora Amenazadas, *Frangula alnus* subsp. *baetica* ha sido incluida dentro de la categoría de “**En Peligro de Extinción**”. Esta especie cuenta con muy pocas poblaciones dentro del territorio valenciano, únicamente se conocen 5 núcleos con un total de 22 individuos de origen natural que se sitúan en diferentes parajes, donde además los ejemplares están dispersos y sin posibilidad de producir fácilmente semillas. Así, desde la aprobación del Decreto 70/2009 han sido varios los trabajos que se han comenzado para la conservación de esta especie tanto *in situ* como *ex situ*.

Los trabajos de conservación *in situ* han consistido por una parte en el refuerzo poblacional de algunas de las poblaciones mejor conocidas, y por otro lado la creación de nuevos núcleos poblacionales entre los conocidos para aumentar la conectividad y número de efectivos en el medio natural. Aunque este último punto ya ha sido abordado en un informe anterior titulado “*Trabajos de conservación con Frangula alnus subsp. baetica en la Comunidad Valenciana*” elaborado a partir de la comunicación presentada en el III Congreso Nacional de Biodiversidad celebrado en Granada en 2011, será también abordado en un futuro informe. No obstante, adelantamos que en la actualidad el número total de ejemplares introducidos es de 391, en un total de 21 poblaciones, de las cuales al menos 8 se han instalado con éxito y las plantas producen flores y frutos.

En lo que respecta a los trabajos *ex situ*, cabe destacar los destinados a la producción de material vegetal de reproducción a partir de diferentes técnicas.

1. Multiplicación *in vitro* a partir de explantos procedentes de ejemplares naturales
2. Creación de bancos de clones
3. Establecimiento de huertos de progenies con planta madre productores de semillas
4. Germinación de semillas a partir de la producción *ex situ*

En todos los casos, la producción de material vegetal ha seguido las pautas indicadas en el anteproyecto del Plan de Recuperación de esta especie (para más información: Pablo Ferrer: flora.cief@gva.es). Estas pautas consisten básicamente en varios niveles de trabajo que se han realizado a lo largo del tiempo desde 2009:

NIVEL 1a: Manejo sólo de material de una línea clonal procedente de un núcleo poblacional.

NIVEL 1b: Manejo de varias líneas clonales procedentes de varios núcleos poblacionales.

NIVEL 2: Manejo de material procedente de origen sexual, obtenido a través de semillas, de diferentes núcleos poblacionales.

NIVEL 3: Manejo de material procedente de Castilla-La Mancha, de origen sexual o asexual.

NIVEL 4: Manejo de material procedente de Andalucía, de origen sexual o asexual.



Figura 1. Algunas de las nuevas poblaciones de *F. alnus* subsp. *baetica* implantadas en el medio natural dentro de espacios Red Natura 2000.

Multiplicación *in vitro* a partir de explantos procedentes de ejemplares naturales

Desde el IVIA se ha realizado la producción de plántulas de esta especie a partir de la multiplicación *in vitro* en diferentes fases a lo largo de los últimos años. En un primer momento se utilizaron explantos de individuos presentes en las poblaciones naturales, el primer ejemplar clonado fue el **1 α CB** procedente de la población Casas de los Baños (Jalance, Valencia). En una segunda fase de producción se multiplicaron los clones **1 β MPF**, **2 β MPF**, **3 β MPF** y **4 β MPF** procedentes de la población Manantial Peña de la Fuente (Jalance, Valencia). Posteriormente se ha mantenido la línea de producción de estos 5 clones pertenecientes a dos poblaciones (de un total de 5 poblaciones naturales conocidas) a partir de clones mantenidos en las instalaciones del CIEF y también del IVIA.

La metodología utilizada para la producción *in vitro* por parte del equipo del IVIA ha sido la siguiente: Esterilización con hipoclorito sódico al 1% durante diez minutos, seguido de tres lavados con agua estéril. Una vez esterilizado superficialmente el material, se aislaron las yemas axilares y terminales y se colocaron en el medio de cultivo que estaba suplementado con 1 ml/l (v/v) de PPM (Plant Preservative Mixture), (Plant Cell Technology, Washington. D.C.), para reducir la contaminación. La siembra se realizó en tubos de ensayo que contenían 25 ml. de medio. El medio de cultivo utilizado fue el WPM suplementado con 1 mg/l de benciladenina, 30 gr/l de sacarosa y 8 gr/l de agar. El medio se esterilizó durante 15 minutos a 121°C después de ajustar el pH a 5'7.

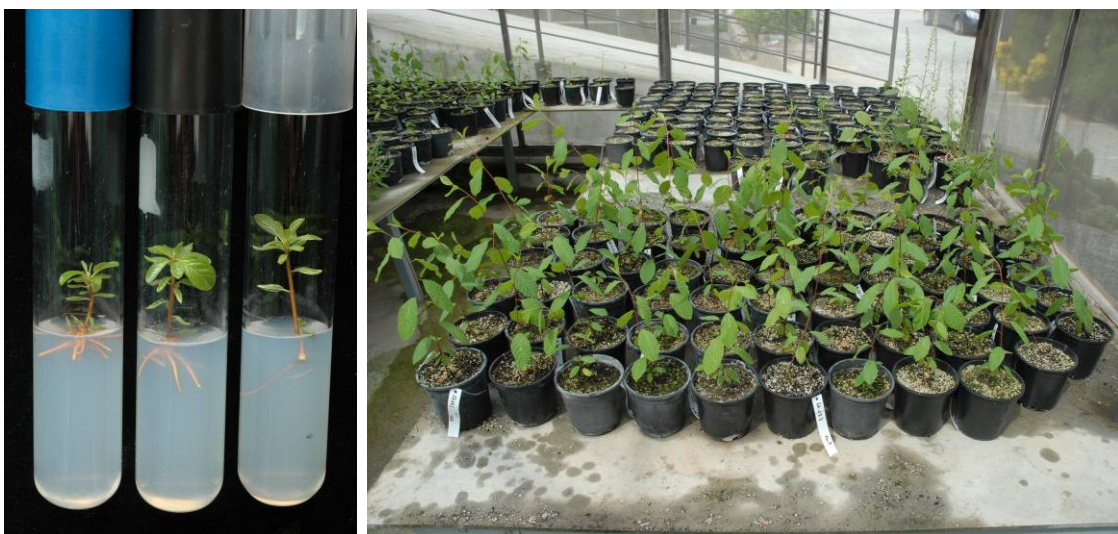


Figura 2. Producción *in vitro* de *F. alnus* subsp. *baetica* y aclimatación de las plántulas obtenidas antes de ser repicadas y endurecidas en contenedores forestales.

Establecimiento de huertos de progenies con planta madre productoras de semillas

A partir de material producido *in vitro* se han confeccionado varios bancos de clones y un huerto de progenies con planta madre. Este huerto productor de semillas será nutrido en sucesivas fases de regeneración y enriquecimiento de planta a partir de material producido de semilla obtenida por las propias plantas madre en estos años así como de material de origen vegetativo producido a partir de material de las poblaciones naturales.

En el CIEF se mantiene un huerto con plantas procedentes de diferentes poblaciones naturales valencianas (Tabla 1), lo que ha aumentado la cantidad de semillas fértiles, algo que en la naturaleza que está muy mermado creemos que por la falta de polen y número de efectivos poblacionales. Por otro lado, un segundo huerto productor se ha confeccionado a partir de material valenciano y plantas de origen andaluz. Este huerto experimental se mantiene en las dependencias del CIP-El Palmar, y las semillas únicamente son estudiadas y ensayadas con fines experimentales, ya que son de gran utilidad para la comparación y evaluación de la calidad de los cruces entre material únicamente valenciano (estudios *fitness*). Este huerto ha producido en 2012 un total de 627 frutos y 1417 semillas. Un tercer huerto se mantiene en el Centro de Recuperación de Fauna de El Saler, en este caso con material solo de procedencia andaluza.

Creación de bancos de clones

Huerto productor instalado en el CIEF	
Procedencia material	Total
Clon 1 αCB	114
Clon 1βMPF	195
Clon 2βMPF	181
Clon 3βMPF	195
Clon 4βMPF	203
Clon 1,2,3,4 βMPF (mixto)	15
Clon βTL Tranco del Lobo	18
Total	939

Huerto productor instalado en La Granja	
Procedencia material	Total
Planta de Cádiz	56

Huerto productor instalado en CIP-El Palmar	
Procedencia material	Total
1 αCB (6 plantas) + Cádiz (6 plantas)	12

Tabla 1. Producción de semillas de *F. alnus* subsp. *baetica* en el huerto de progenies del CIEF en 2011 y 2012.

Calle 1	Calle 2	Calle 3
Clon 1 Casa de los Baños αCB	Clones 1, 2, 3 y 4. Manantial Peña de la Fuente βMPF	Clon 1 Casa de los Baños αCB
Origen: In vitro IVIA	Origen: Estaquillado	Origen: In vitro IVIA
Fecha de plantación 18-4-2011	Fecha de plantación 21-10-2010	Fecha de plantación 20-9-2011
1 αCB 2011 = 0 2012 = 0	1 βMPF 2011 = 0 2012 = 13	1 αCB 2012 = 1
1 αCB 2011 = 1 2012 = 0	2 βMPF 2011 = 0 2012 = 3	1 αCB 2012 = 2
1 αCB 2011 = 4 2012 = 0	3 βMPF 2011 = 2 2012 = 222	1 αCB 2012 = 0
Fecha de plantación 18-1-2010	4 βMPF 2011 = 78 2012 = 63	1 αCB 2012 = 8
1 αCB 2011 = 430 2012 = 0	1 βMPF 2011 = 4 2012 = 478	1 αCB 2012 = 0
1 αCB 2011 = 536 2012 = 178	2 βMPF 2011 = 9 2012 = 122	1 αCB 2012 = 0
1 αCB 2011 = 187 2012 = 2	3 βMPF 2011 = 7 2012 = 123	1 αCB 2012 = 0
1 αCB 2011 = 41 2012 = 0	4 βMPF 2011 = 29 2012 = 507	1 αCB 2012 = 0
1 αCB 2011 = 351 2012 = 0	Fecha de plantación 18-4-2011	1 αCB 2012 = 0
1 αCB 2011 = 83 2012 = 0	1 βMPF 2011 = 0 2012 = 442	1 αCB 2012 = 39
1 αCB 2011 = 53 2012 = 0	1 βMPF 2011 = 0 2012 = 24	1 αCB 2012 = 40
1 αCB 2011 = 46 2012 = 0	1 βMPF 2011 = 0 2012 = 89	1 αCB 2012 = 2
1 αCB 2011 = 11 2012 = 0	1 βMPF 2011 = 0 2012 = 35	1 αCB 2012 = 0
1 αCB 2011 = 62 2012 = 0	1 βMPF 2011 = 0 2012 = 31	1 αCB 2012 = 7
1 αCB	1 βMPF	1 αCB



2011 = 40 2012 = 0	2011 = 0 2012 = 69	2012 = 0
1 αCB 2011 = 6 2012 = 0	4 βMPF 2011 = 7 2012 = 11	1 αCB 2012 = 0
1 αCB 2011 = 0 2012 = 0		1 αCB 2012 = 0
1 αCB 2011 = 0 2012 = 0		
1 αCB 2011 = 1 2012 = 0		
TOTAL 2011 Totales= 1852 frutos	TOTAL 2011 Totales= 136 frutos	TOTAL 2012 Totales= 99 frutos
TOTAL 2012 Totales= 180 frutos	TOTAL 2012 Totales= 2232 frutos	



Figura 3. Huerto de clones productores de semillas con genotipos procedentes de varias poblaciones valencianas mantenido en las instalaciones del CIEF.

Estudio, caracterización y germinación de semillas a partir de la producción *ex situ*

La extracción de las semillas es complicada, algunos autores recomiendan un despulpado suave y secado en calor (30-40°C) durante 1 o 2 días hasta que se observa la separación de las semillas de las cubiertas que las protegen. En nuestro caso, al tratarse de recolecciones pequeñas, optamos por la extracción de las semillas de manera manual despulpando mediante compresión al poco tiempo de la recolección para evitar la desecación.

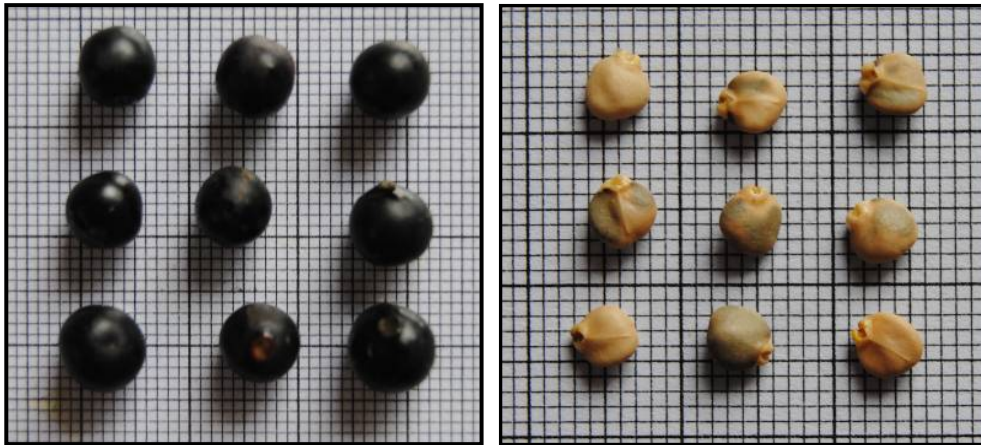


Figura 4. Frutos y semillas de *F. alnus* subsp. *baetica* obtenidos de los huertos de semillas mantenidos en el CIEF.



Figura 5. Método empleado en el despulpado y limpieza de semillas de *F. alnus* subsp. *baetica*.

Descripción del fruto y de la semilla

FRUTO	
Dimensiones (mm x mm) ($X \pm S.D.$)	$6,161 \pm 0,615 \times 6,049 \pm 0,571$
Color y forma	Negro brillante en la madurez, circular
Peso (g) de 100 unidades ($X \pm S.D.$)	$18,886 \pm 0,636$

SEMILLA	
Dimensiones (mm x mm) ($X \pm S.D.$)	$4,597 \pm 0,243 \times 4,101 \pm 0,217$
Color y forma	Gris anaranjado, obovadas
Peso (g) de 100 unidades ($X \pm S.D.$)	$1,622 \pm 0,186$

Las semillas una vez ha finalizado la fase de deshidratación han sido encapsuladas en viales de vidrio transparente cerrados herméticamente, capaces de garantizar durante largo tiempo la preservación del germoplasma.



Figura 6. Tipo de viales empleados para la conservación de semillas de *F. alnus* subsp. *baetica* a corto plazo (derecha) y a largo plazo dentro de la colección base (izquierda).



Tabla. 2. Lotes conservados en el Banco de Germoplasma del CIEF de *F. alnus* subsp. *baetica* obtenidos de los huertos semilleros del CIEF (todas plantas madre proceden en este caso de ejemplares de las poblaciones valencianas de Jalance).

Id	Id especie	Procedencia	Fecha recolección	Peso total (g)	Nº semillas	Peso 100 semillas (g)
V711	V198A	Clon α CB	30-ago-10	0,073	5	1,460
V797	V198B	Clon α CB	14-jun-11	8,036	571	1,406
V815	V198C	Clon α CB + Cádiz	14-jun-11	42,093	2209	1,905
V819	V198D-1	Esqueje de Pie 1 Clon β MFP	29-sep-11	0,163	11	1,481
V819	V198D-2	Esqueje de Pie 2 Clon β MFP	29-sep-11	0,690	40	1,725
V819	V198D-3	Esqueje de Pie 3 Clon β MFP	05-oct-11	1,573	98	1,605
V819	V198D-4	Esqueje de Pie 4 Clon β MFP	29-sep-11	1,955	111	1,776
V893	V198F	Clon α CB + Cádiz	06-jun-12		104*	
V894	V198G-1	Esqueje de Pie 1 Clon β MFP	07-jul-12		1638*	
V894	V198G-2	Esqueje de Pie 2 Clon β MFP	07-jul-12		204*	
V894	V198G-3	Esqueje de Pie 3 Clon β MFP	07-jul-12		513*	
V894	V198G-4	Esqueje de Pie 4 Clon β MFP	07-jul-12		1005*	
V895	V198H	Clon α CB	26-jun-12		339*	

* Todavía en producción. Se indica solamente el número de semillas recolectadas hasta la fecha de edición de este informe.

Experiencias de germinación ensayadas

Se realizaron varios ensayos de germinación ya que los test estándar realizados previamente según las recomendaciones consultadas en la bibliografía y aplicados a nuestros lotes no dieron resultados positivos (ver tabla).

Para todos los ensayos realizados se ha seleccionado al azar una muestra del total del lote y se diseñaron varias experiencias con el fin de aumentar la permeabilidad de las cubiertas de las semillas y permitir el flujo de fluidos hasta el embrión hasta alcanzar niveles suficientes de humedad como para provocar su germinación. La lectura de la germinación fue diaria y según fueron germinando las semillas se retiraron y se repicaron a macetas de 8 cm de diámetro para ser posteriormente cultivadas y viverizadas en las instalaciones del CIEF.



Figura 7. Tipo de placas de Petri utilizadas en algunos de los ensayos realizados con semillas de *F. alnus* subsp. *baetica* e imágenes de semillas germinando.

Tabla. 3. Lotes de semillas testados en el Banco de Germoplasma del CIEF de *F. alnus* subsp. *baetica* a partir del material obtenido del cultivo *ex situ*.

Pre-tratamientos	Temperatura y fotoperiodo	% Germinación	T50 (días)	Tiempo ensayo (días)	Inicio germinación (días)	Última germinación (días)
Imbibición 24 horas	20 °C_12/12 h luz/oscuridad	0	-	90	-	-
Escaldado Imbibición 24 horas	20 °C_12/12 h luz/oscuridad	0	-	90	-	-
Imbibición 24 horas	20/10°C_24h oscuridad	0	-	30	-	-
Escaldado Imbibición 24 horas	20/10°C_24h oscuridad	0	-	30	-	-
Escaldado Imbibición 24 horas. Corte en la cubierta	20/10°C_24h oscuridad	85 ±7,1	12,1 ± 0,3	50	6	39
24h Imbibición Lijado suave Estratificación en frío (4 °C_60 días) Corte en la cubierta	20/10°C_24h oscuridad	75 ± 0,1	13,6 ± 1,41	50	5	41
10 min 98% H ₂ SO ₄ Imbibición 24 horas Estratificación en frío (4 °C_30 días) Corte en la cubierta	20/10°C_24h oscuridad	67,5± 3,53	8,85± 0,35	50	5	44

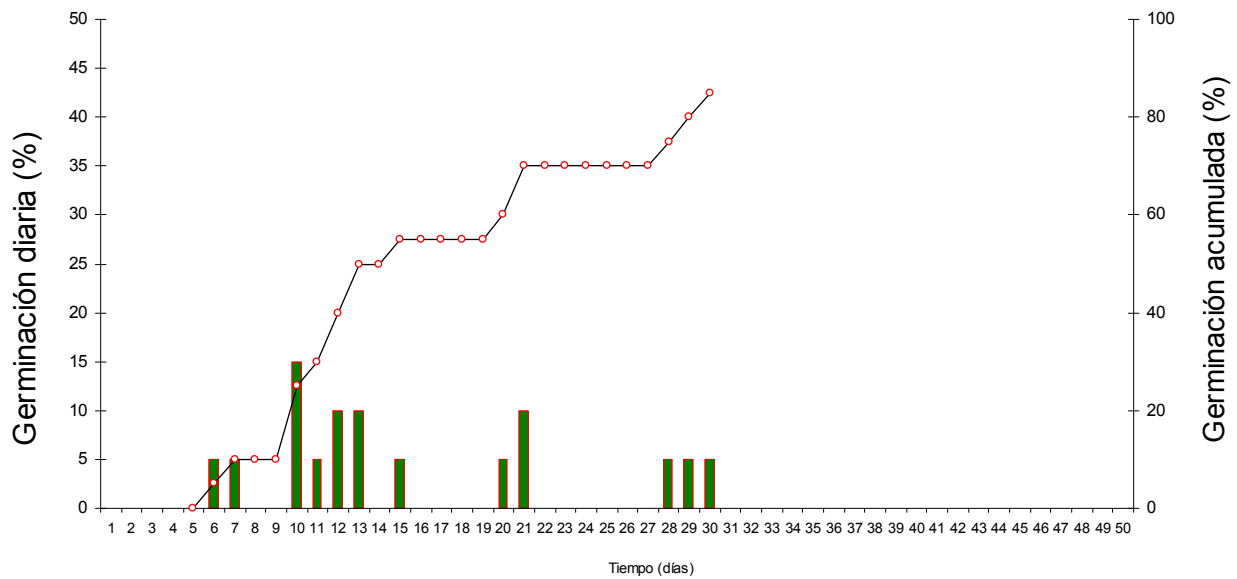


Figura 8. Curva de germinación del protocolo por el que se ha obtenido mayor porcentaje de germinación de las semillas de *F. alnus* subsp. *baetica*.

En los ensayos en los que no se obtuvieron germinaciones se realizaron posteriormente con las mismas semillas ensayos de viabilidad mediante el test de tetrazolio, y se obtuvo el 100% de viabilidad, lo que indica un buen estado de los embriones en todos los casos. La no germinación en estos ensayos puede ser explicada por la falta de cierto pretratamiento, no siendo suficiente un escaldado, ya que otros ensayos realizados después con semillas pretratadas (estratificación, lijado de cubiertas, cortes e incisiones en las testas) han dado muy buenos resultados de germinación (ver Tabla)

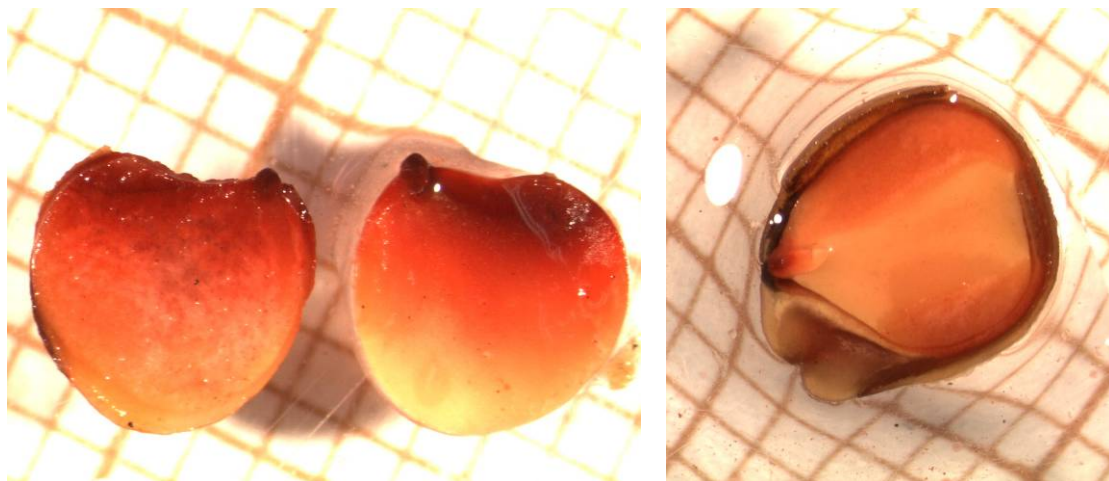


Figura 9. Semillas de *F. alnus* subsp. *baetica* teñidas en la prueba de viabilidad de tetrazolio.

Producción asexual mediante multiplicación de estaca

Producción de material manchego, población Tranco del Lobo (Casas de Ves, Albacete). Se ha establecido una línea de colaboración entre el Servicio de Espacios Naturales y Biodiversidad, y el Banc de Llavors Forestals CIEF de la Generalitat Valenciana y la Dirección General de Áreas Protegidas y Biodiversidad de la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de Castilla-La Mancha para la producción de material vegetal de reproducción a partir de la población manchega de esta especie sita en Casas de Ves (Albacete) denominada Tranco del Lobo. Esta población resulta de gran interés debido a la proximidad que tiene con las poblaciones valencianas, por el gran número de plantas y su situación geográfica, posicionada al norte y aguas arriba de todas las poblaciones valencianas.

Entre los objetivos planteados para trabajar con esta población destacan los siguientes: 1) El estudio de la capacidad reproductiva de esta especie en el Levante peninsular ibérico a través del cultivo *ex situ* de diferentes progenies (valencianas y manchegas). 2) La multiplicación de material vegetal de reproducción mediante el cultivo *in vitro* y mesa de cultivo a partir de esquejes para reforzar el huerto de planta madre así como los bancos de clones que se mantienen en las instalaciones del CIEF. 3) El abastecimiento para futuros trabajos de conservación con esta planta desarrollados por el Servicio de Espacios Naturales y Biodiversidad, y el Banc de Llavors Forestals del CIEF, así como por la Dirección General Áreas Protegidas y Biodiversidad de la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de Castilla-La Mancha.



Figura 10. Mesa de cultivo utilizada para la producción de planta a partir de estacas procedentes de la población manchega Tranco del Lobo.

PRODUCCIÓN DE MATERIAL VEGETAL

Origen: Población Tranco del Lobo (Casas de Ves, Albacete)												
Condiciones de cultivo y de la estaca: Mesa de cultivo con sustrato de turba:perlita: (50%/50%) y 25°C, 24h. La estaca se hace de 25 cm de longitud, con el corte en flauta (45º) en la parte superior y recto (90º) en la inferior. Toda la estaca se ha sumergido en una dilución de indolbutilico al 50% durante 20 segundos y después se ha lavado con agua.												
Origen	Estaca_Ejem_1		Estaca_Ejem_2		Estaca_Ejem_3		Estaca_Ejem_4		Estaca_Ejem_5		Estaca_Ejem_6	
Fecha de recolección	2-2-2012		2-2-2012		2-2-2012		2-2-2012		2-2-2012		2-2-2012	
Fecha de cultivo	3-2-2012		3-2-2012		3-2-2012		3-2-2012		3-2-2012		3-2-2012	
UTM	30SXJ 0645416 4341213		30SXJ 0645408 4341218		30SXJ 0645402 4341214		30SXJ 0645319 4341202		30SXJ 0645333 4341196		30SXJ 0645390 4341186	
Recolectores	JALD, ELL, PPFG,PG, MP, AAG, SB		JALD, ELL, PPFG,PG, MP, AAG, SB		JALD, ELL, PPFG,PG, MP, AAG, SB		JALD, ELL, PPFG,PG, MP, AAG, SB		JALD, ELL, PPFG,PG, MP, AAG, SB		JALD, ELL, PPFG,PG, MP, AAG, SB	
Clon	Clon 1 βTL		Clon 2 βTL		Clon 3 βTL		Clon 4 βTL		Clon 5 βTL		Clon 6 βTL	
Número de estaca por clon en cultivo	33		26		45		27		16		40	
Tratamiento	Con corte	Sin corte	Con corte	Sin corte	Con corte	Sin corte	Con corte	Sin corte	Con corte	Sin corte	Con corte	Sin corte
Nº Estacas	17	16	13	13	22	23	14	13	8	8	20	20
Supervivencia 5-2-2012												
Número estacas enraizadas	2	3	0	1	0	0	3	5	0	1	6	0
% Enraizado	11,76	18,75	0	7,69	0	0	21,46	38,46	0	12,5	30	0
% Media por clon	15,255		3,845		0		29,96		6,25		15	
% Media por tratamiento: <u>Con corte</u>	10,536											
% Media por tratamiento: <u>Sin corte</u>	12,9											
Supervivencia 1-7-2012	Mantenemos un total de 18 plantas vivas											

Resultados fase de rizogénesis en mesa de cultivo: El **Clon 3** β TL no ha enraizado en ningún tipo de tratamiento. El **Clon 2** β TL y **Clon 5** β TL no han enraizado con la prueba de corte, y el **Clon 6** β TL no ha enraizado sin cortar. El **Clon 6** β TL con el tratamiento de corte es el que mayor número de estaca enraizada presenta, con un total de 6 estacas enraizadas (30%) respecto del total de las 20 estacas que fueron cultivadas. El **Clon 1** β TL y **Clon 4** β TL son los que mejores datos medios han proporcionado, y han enraizado estacas tanto con el tratamiento de corte como sin él. El porcentaje medio de enraizamiento con la prueba de cortes es de 10,536% y sin corte de 12,9%. Con la prueba de corte han enraizado estacas de 3 clones (**Clon 1** β TL , **Clon 4** β TL , **Clon 6** β TL), y sin corte han enraizado estacas de 4 clones (**Clon 1** β TL , **Clon 2** β TL , **Clon 4** β TL, **Clon 5** β TL),

Conclusiones

1. La mezcla de individuos procedentes de las diferentes poblaciones valencianas cultivados *ex situ* en un mismo huerto de progenies ha aumentado significativamente la producción de semillas.
2. Las semillas obtenidas a partir de plantas cultivadas *ex situ* tienen una viabilidad del 100%, obtenida mediante ensayos de tetrazolio.
3. Varios pretratamientos aplicados a las semillas (escaldado, corte de la cubierta, estratificación en frío 30 días, aplicación de ácido sulfúrico) en condiciones de 20/10°C y total oscuridad producen elevados porcentajes de germinación, siempre mayores al 65%.
4. En la multiplicación vegetativa a partir de estaca es un método eficaz y rápido de obtención de planta. Con este método se consigue el mismo porcentaje de rizogénesis a partir de estaca tratadas con corte en la corteza que sin corte.
5. El mantenimiento de *ex situ* en huertos semillero y procedentes de diferentes poblaciones se muestra como un método muy rentable para la producción de semillas para realizar trabajos de restitución en campo con esta especie.