

**MANUAL PARA LA CONSERVACIÓN  
DE GERMOPLASMA Y EL CULTIVO DE LA  
FLORA VALENCIANA AMENAZADA**



**MANUAL PARA LA CONSERVACIÓN  
DE GERMOPLASMA Y EL CULTIVO DE LA  
FLORA VALENCIANA AMENAZADA**

# MANUAL PARA LA CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA Y EL CULTIVO DE LA FLORA VALENCIANA AMENAZADA

Pedro Pablo Ferrer Gallego  
Inmaculada Ferrando Pardo  
Carlos Gago Alabau  
Emilio Laguna Lumbreras

2013 Valencia



## CÓMO CITAR ESTE LIBRO

Se **autoriza y agradece** toda la difusión posible de esta obra que, a efectos bibliográficos, debe citarse como:

FERRER-GALLEGO, P.P., I. FERRANDO, C. GAGO & E. LAGUNA (Eds.) 2013. *Manual para la conservación de germoplasma y el cultivo de la flora valenciana amenazada*. Colección Manuales Técnicos Biodiversidad, 3. Conselleria d'Infraestructures, Territori i Medi Ambient. Generalitat Valenciana. Valencia.

Descarga del libro: <http://www.cma.gva.es/web/indice.aspx?nodo=82491&idioma=C>

## EDITORES y COORDINADORES

Pedro Pablo Ferrer Gallego  
Inmaculada Ferrando Pardo  
Carlos Gago Alabau  
Emilio Laguna Lumbreras

## AUTORES

Pedro Pablo Ferrer Gallego<sup>1,2</sup>  
Inmaculada Ferrando Pardo<sup>1,2</sup>  
Emilio Laguna Lumbreras<sup>2</sup>  
M<sup>a</sup> Carmen Escribá Baeza<sup>1,2</sup>  
Albert J. Navarro Peris<sup>1,2</sup>  
Francisco J. Albert Llana<sup>1,2</sup>  
Víctor Martínez Granel<sup>1,2</sup>  
Carlos Peña Bretón<sup>1,3</sup>  
Araucana Sebastián de la Cruz<sup>1,3</sup>  
Alberto Guillén Bas<sup>4</sup>

## DISEÑO Y MAQUETACIÓN

Carlos Gago Alabau<sup>5</sup>  
Javier Blasco Giménez<sup>5</sup>

## MAPAS DE DISTRIBUCIÓN

Nuria Fabuel Ten<sup>6</sup>  
Yolanda Orduna Carrasquer<sup>6</sup>

<sup>1</sup>VAERSA, Generalitat Valenciana.

<sup>2</sup>Centro para la Investigación y Experimentación Forestal (CIEF). Servicio de Vida Silvestre. Conselleria d'Infraestructures, Territori i Medi Ambient. Generalitat Valenciana.

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones Piscícolas de El Palmar (CIP). Servicio de Vida Silvestre. Conselleria d'Infraestructures, Territori i Medi Ambient. Generalitat Valenciana.

<sup>4</sup>Departamento de Botánica. Facultad de Farmacia. Universitat de València.

<sup>5</sup>Equipo de Comunicación y Participación. *Simbiosi, espai ambiental*. Master Tour Alliance.

<sup>6</sup>Banco de Datos de Biodiversidad de la Comunitat Valenciana. Servicio de Vida Silvestre. Conselleria d'Infraestructures, Territori i Medi Ambient. Generalitat Valenciana.

## FOTOGRAFÍAS DE PORTADA Y CONTRAPORTADA

Portada: cultivo de altramuz valenciano (*Lupinus mariae-josephae*) en el CIEF.

Contraportada: plantación de silene de Ifach (*Silene hifacensis*) en el Cap de Sant Antoni (Xàbia).

## FOTOGRAFÍAS

Servicio de Vida Silvestre (Conselleria d'Infraestructures, Territori i Medi Ambient), Centro para la Investigación y Experimentación Forestal de la Generalitat Valenciana (CIEF), Banc de Llavors Forestals de la Generalitat Valenciana, Facultad de Farmacia (Universitat de València).

Han aportado fotografías:

Carlos Fabregat Llueca: *Pinguicula dertosensis*. Jaume X. Soler Mari: *Cheirolophus lagunae*, *Ferulago ternatifolia*, *Silene hifacensis*.

Joan Pérez Botella: *Astragalus alopecuroides* subsp. *grosii*, *Clematis cirrhosa*, *Halopeplis amplexicaule*, *Limonium lobatum*, *Sideritis glauca*.

José Juárez Roldán: *Campanula mollis*, *Leucanthemum arundanum*, *Vaccinium myrtillus*. Josep Enric Oltra Benavent: *Campanula mollis*, *Solenopsis laurentia*. Juan Carlos Moreno Saiz: *Astragalus oxyglottis*. Luis Serra Lliga: *Ferula loscosii*, *Festuca triflora*. Simón Fos Martín: *Galanthus nivalis*, *Leucojum valentinum*. Patricia Pérez Rovira: *Vaccinium myrtillus*.

## PATROCINA

**Conselleria d'Infraestructures, Territori i Medi Ambient**. Generalitat Valenciana.

**VAERSA**, Generalitat Valenciana.

**FUNDEM**. Fundación para la Conservación de la fauna y flora mediterránea. Jardín Mediterráneo L'Albarda, Pedreguer (Alicante). [http://www.fundem.org/index\\_es.html](http://www.fundem.org/index_es.html)

**Jardí Botànic de la Universitat de València**, València. <http://www.jardibotanic.org/>

**SEBICoP**. Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas. <http://www.conservacionvegetal.org/>

**6º Congreso de Biología de la Conservación de Plantas**. Murcia 15-18 octubre 2013. <http://www.congresosebicopmurcia.es/resumenes.aspx>

Las investigaciones y trabajos relacionados en este manual han sido financiados parcialmente por fondos europeos Life, FEOGA y FEADER.

## EDITA

Conselleria d'Infraestructures, Territori i Medi Ambient. Generalitat Valenciana. 2013.

## IMPRIME

La Imprenta, Comunicación Gráfica S.L.

ISBN: 978-84-482-5865-8  
Depósito legal: V-2472-2013

## PRESENTACIÓN

### Alfredo J. González Prieto

**Director General de Medio Natural.  
Conselleria d'Infraestructures, Territori  
i Medi Ambient.**

La Comunitat Valenciana ha destacado en el panorama nacional e internacional de la conservación de la flora amenazada en las últimas dos décadas gracias a diversas iniciativas, que en su conjunto han permitido crear y mantener una política sobresaliente de defensa de nuestro patrimonio vegetal autóctono. Las plantas silvestres no son sólo el marco natural que da estructura y parte de su funcionalidad a los hábitats, ni merecen ser conservadas por el simple mandato legal que obliga a evitar su extinción, sino que constituyen un tesoro estratégico que debe estudiarse y preservarse en profundidad, ya que de ellas han ido surgiendo a lo largo de la historia la inmensa mayoría de los alimentos, de los principios químicos de los medicamentos o de muchos de los materiales básicos para la industria. Una parte nada desdeñable de ese patrimonio está aún por descubrir y poner en valor, oculta en el genoma de las plantas silvestres, y son precisamente las especies más amenazadas aquéllas en las que resulta más urgente abordar tanto la preservación *in situ*, dentro de sus hábitats naturales, como asegurar la conservación fuera de esos entornos, afinando las metodologías y conocimientos que nos permitan mantener sus semillas con

la máxima viabilidad posible a medio y largo plazo, cultivarlas, reintroducirlas en el medio natural, y en su caso proveer a los centros de investigación suficiente material vegetal o protocolos para producirlo, a fin de que avancen en el descubrimiento de todas esas utilidades futuras que pueden ofrecer a nuestra sociedad. Quizá eclipsadas por el éxito y la popularidad de las medidas de conservación dentro del hábitat, las que se desarrollan *ex situ*, fuera de éste, han pasado desapercibidas, pero en muchos casos son tanto o más importantes que las anteriores, al menos en la fase inicial de recuperación de las especies con mayor riesgo de extinción.

Conscientes de la necesidad de abordar conjuntamente una estrategia de actividades *ex situ* que complemente la preservación y conservación de las plantas silvestres dentro de sus hábitat, la Conselleria de Infraestructuras, Territorio y Medio Ambiente viene desarrollando un trabajo continuado de recolección, procesamiento, conservación del germoplasma -semillas, esporas u otras unidades de propagación vegetal-, germinación, viverización y puesta en cultivo, que ha visto especialmente impulsada su actividad a partir de la aprobación del Catálogo Valenciano de Especies de Flora Amenazadas. Desde las instalaciones del Centro para la Investigación y Experimentación Forestal y del Centro de Investigaciones Piscícolas, el Servicio de Espacios Naturales y Biodiversidad ha ido acumulando gran parte de ese bagaje genético amenazado, y ha generado a lo largo de estos años un patrimonio si cabe tan importante como aquél: los protocolos de conservación de semillas, puesta en germinación y producción de planta, que aseguran que nuestras especies amenazadas no sean simples viajeros de un Arca de Noé, sino que pueden llegar a reinstalarse exitosamente en el medio natural, y ponerse a disposición de usos científicos y educativos que generen mayor beneficio para toda la sociedad. Quiero agradecer desde aquí el esfuerzo del personal técnico de la Conselleria que ha llevado adelante el trabajo que aquí se presenta, tanto en sus fases experimentales como en la propia redacción del libro, extendiendo además el agradecimiento a entidades colaboradoras como la Universitat de València, cuya aportación lo dota de un importante valor añadido, al tratarse del primer texto de este tipo que complementa los protocolos de conservación con fotografías de las semillas mediante microscopía electrónica. Desde el puesto que ocupó, del que depende la dirección de las unidades y servicio citados, me honra poder ofrecer este libro a quienes puedan usarlo para el mejor conocimiento y conservación de todo el medio natural de la Comunitat Valenciana, invitando también a quienes desde otros territorios comparten especies o problemas similares para la preservación de sus especies amenazadas.



## PRÓLOGO

### Gianluigi Bacchetta

**Profesor de Botánica Ambiental y Aplicada de la Universidad de Cagliari y director del Centro Conservazione Biodiversità (CCB) (Cerdeña, Italia).**

**H**an transcurrido veinte años desde que, el 14 de junio de 1992, se firmase en Río de Janeiro el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) y creo que editar hoy un volumen sobre “Conservación de germoplasma y el cultivo de la flora Valenciana amenazada” es oportuno y de gran importancia e interés, no sólo para los técnicos y profesionales sino también para un público más amplio.

Vivimos tiempos de crisis económica y política, pero a la vez ecológica. Muchos convenios en las últimas décadas han sido ratificados a nivel mundial (Washington 1973 y Berna 1979), diversas directivas comunitarias han sido promulgadas (1999/105/CE y 92/43/CEE) y al mismo tiempo nos hemos comprometido a poner en práctica estrategias para la conservación de la biodiversidad.

Casi medio siglo hemos empleado en comprender la necesidad de conservar la biodiversidad y sólo en el 2002, tanto a nivel mundial como europeo, se han logrado elaborar las primeras estrategias para la conservación de las plantas. Hoy, justo después de una década, sabemos que la mayoría de los objetivos planteados para el 2010 no han sido alcanzados en la mayor parte de las naciones firmantes aplazados muchos de ellos al 2020.

El incumplimiento generalizado de objetivos no se debe a la crisis económica detectada en el 2008, si no que depende de la crisis política e ideológica, además de una

falta real de ecosofismo, ancestro de la crisis ecológica que vivimos y sufrimos junto al resto de seres vivos de este planeta.

A pesar de todo, el Servicio de Espacios Naturales y Biodiversidad, y el Centro para la Investigación y Experimentación Forestal de la Generalitat Valenciana (CIEF) y, en concreto, los técnicos e investigadores que trabajan en el Centro, han actuado de forma ejemplar respetando los dictámenes de los convenios, las directivas comunitarias y las estrategias sobre conservación de la biodiversidad, dedicándose de forma coherente a la conservación de la flora amenazada de la Comunitat Valenciana. La presente obra es el resultado de numerosos años de duro trabajo de campo y laboratorio, y el fruto de un gran esfuerzo coral que siempre ha marcado el reto de los equipos coordinados por Emilio Laguna y Antoni Marzo.

No se trata simplemente de un manual, estamos frente a un volumen que aborda el tema de la conservación del germoplasma y del cultivo de la flora amenazada de forma exhaustiva. La primera parte del mismo aporta una generosa cantidad de datos difíciles de hallar en la bibliografía habitual. En particular, la información referida al cultivo, la viverización y las colecciones de plantas vivas denota la gran experiencia y el altísimo nivel alcanzado por el CIEF en el ámbito mediterráneo y más allá del él.

La segunda parte, que constituye el corazón de la obra, presenta más de 60 fichas sobre especies amenazadas de la flora valenciana, en las cuales, de forma muy completa, destacan los datos biológicos, así como los de germinación y conservación de semillas. En especial, es de resaltar el estudio y ensayo de cultivo de todas las plantas tratadas en el volumen, algunas de las cuales han sido estudiadas *ex situ* por primera vez.

Además de la importancia del contenido, cabe subrayar la ortodoxia terminológica, nomenclatural y taxonómica empleada, sólo comparable con las obras científicas de mayor prestigio internacional.

Se han conseguido resultados efectivos y satisfactorios para la conservación de la flora amenazada valenciana y esta obra es el testimonio más tangible. No sorprende en este sentido el hecho de que la Comunitat Valenciana sea hoy en día una de las pocas regiones en Europa que pueda demostrar haber cumplido la mayoría de los objetivos previstos por la Estrategia Europea para la Conservación de las Plantas (EECP) y que sea considerada una de las pocas comunidades realmente consciente de la importancia de conservar nuestra flora.





## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración de un gran número de personas e instituciones. A todos ellos les agradecemos su implicación.

Gracias a Juan Jiménez Pérez, Antoni Marzo i Pastor, Josep Enric Oltra Benavent, Simón Fos Martí, Patricia Pérez Rovira, Joan Pérez Botella, Roger Carchano Jordà, Elena Estrellés Perpiñá, Josefa Prieto Mossi, Christophe Zreik Stroobants, Mercedes Piera Ortiz, Vicente Deltoro Torró, Gabriel Ballester Pascual, Amparo Olivares Tormo, Ana Hurtado Bruixola, Juana M<sup>a</sup> Arregui García, José Juárez Roldán, Juan Antonio Gómez López, Pilar Risueño Mata, Juan Bautista Valdés Siquier, Roberto Roselló Gimeno, José Gómez Navarro, Juan Bautista Peris Gisbert, Miguel López Cárcer, Manuel Pereira Alexandre, Lluís Viciano Rives, Federico Martínez Pardo, Luis Serra Lliga, Daniel Arizpe Ochoa, Carlos Fabregat Lluca, Gonzalo Mateo Sanz, Manuel Benito Crespo Villalba, Jesús Martínez Llistó, Xavier García Martí, Julio López Martos, Vicente Serena García, Fco. Javier Bayarri Llorens, Marcos Márquez Barragán, José Fco. Ejarque Conesa, Rafael Martos Climent, Pedro Corral Sau, Vicente Izquierdo Asensi, Susana Sáiz García, Rubén Albarracín Veses, Vicent Ricart Lázaro, M<sup>a</sup> Carme Picher Morelló, Esperanza Campos Fuster, Pilar Veintimilla Antón, Vicent Cerdán Martínez, Francesc Bosch Domenech, Daniel Corral Ponce, Raquel Herreros García, María Aránzazu Prada, Gloria Ortiz Martín, M<sup>a</sup> Carmen Martínez Herrero, Sonia Mayordomo Moreno. Equipo de las Brigadas de Biodiversidad del Servicio de Espacios Naturales y Biodiversidad. Servicio Central Soporte a la Investigación Experimental, Sección de Microscopía Electrónica. Universitat de València (M<sup>a</sup> Teresa Mínguez, Enrique Navarro, Antonio Ibáñez y Pilar Gómez). Centro para la Investigación y Experimentación Forestal de la Generalitat Valenciana / Banc de Llavors Forestals de la Generalitat Valenciana. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Jardí Botànic de la Universitat de València. Instituto de Biodiversidad (CIBIO), Universidad de Alicante. Tercera Demarcación Forestal de Valencia. Servicios Territoriales de la Conselleria d'Infraestructures, Territorio i Medi Ambient. Servicio de Espacios Naturales Protegidos, Conselleria d'Infraestructures, Territorio i Medi Ambient.



## TABLA DE CONTENIDOS

1	Introducción .....	12	7	Consideraciones generales para elaborar protocolos de germinación .....	54
2	Aspectos preliminares .....	16	7.1	Fase preliminar: aclimatación de la accesión y desinfección .....	54
	2.1 Las técnicas <i>ex situ</i> como complemento de la conservación <i>in situ</i> .....	16	7.2	Viabilidad de las semillas .....	55
	2.2 Requisitos de las técnicas <i>ex situ</i> para su utilidad en la conservación integrada .....	18	7.3	Factores ambientales e inhibiciones de la germinación .....	56
	2.3 Una visión de futuro: La conservación <i>quasi in situ</i> .....	20	7.4	Pretratamiento .....	56
	2.4 La flora amenazada y su conservación <i>ex situ</i> en la Comunitat Valenciana .....	20	7.5	Test de germinación .....	57
	2.5 La trazabilidad del material, hilo conductor de la conservación integrada.....	22	7.6	Etapas del test de germinación .....	59
			7.7	Protocolos de germinación .....	60
			7.8	Nuevas técnicas para los tests de germinación .....	61
3	Método de trabajo .....	26	8	Cultivo y viverización .....	64
4	Recolección de material vegetal de conservación y reproducción .....	30	8.1	Precisiones previas sobre el cultivo de especies amenazadas .....	64
	4.1 Material vegetal de origen y precauciones para maximizar su diversidad .....	30	8.2	Particularidades para el cultivo de planta acuática .....	65
	4.2 Momento óptimo de la recolección .....	31	8.3	Tipos de contenedores de cultivo .....	66
	4.3 Precauciones para la recolección y el transporte de semillas .....	31	8.4	Tipos de sustrato .....	66
	4.4 Indicaciones adicionales para el material vegetativo .....	32	8.5	Tipos de propagación .....	69
	4.5 Datos de campo a incluir junto a la muestra .....	33	9	Colecciones de planta viva: huertos semillero y bancos clonales .....	78
5	Procesado del material vegetal de reproducción .....	36	10	Fichas sobre germinación y cultivo de plantas amenazadas .....	82
	5.1 Registro de las muestras .....	36	10.1	Especies en peligro de extinción .....	85
	5.2 Limpieza y manipulación .....	36	10.2	Especies vulnerables .....	131
	5.3 Desecación de las semillas: fundamentos y procesos .....	41	11	Bibliografía .....	210
	5.4 Técnica de la deshidratación .....	43	11.1	Bibliografía general citada o de consulta recomendada .....	210
6	Conservación de germoplasma .....	48	11.2	Bibliografía por especie .....	215
	6.1 Fundamentos de la conservación: reglas de Harrington .....	48	12	Índice de especies .....	240
	6.2 Encapsulado para almacenamiento .....	48	12.1	Por nombre científico .....	240
	6.3 Colecciones de semillas .....	49	12.2	Por nombre vulgar en valenciano .....	241
	6.4 Factores a controlar en las colecciones de germoplasma .....	50	12.3	Por nombre vulgar en castellano .....	243
	6.5 El Banco de Germoplasma del CIEF-CIP ...	50	13	Lista de acrónimos .....	246



**1**

**INTRODUCCIÓN**



## 1 INTRODUCCIÓN

< *Silene cambessedesii*.

El presente libro pretende exponer en términos técnico-divulgativos el resultado de la aplicación de técnicas de propagación y conservación de plantas amenazadas valencianas fuera de su hábitat -**conservación *ex situ***- para aquellas especies en las que se han desarrollado experiencias desde la Conselleria de Infraestructuras, Territorio y Medio Ambiente, a través del Servicio de Espacios Naturales y Biodiversidad (SENB). En concreto se aportan fichas para especies del Catálogo Valenciano de Especies de Flora Amenazadas (CVEFA) del máximo nivel de protección legal designado por la normativa valenciana (Decreto 70/2009), correspondientes a las categorías de “en peligro de extinción” y “vulnerable”. Tales actividades se han desarrollado para las plantas de hábitat terrestre en el Centro para la Investigación y Experimentación Forestal (CIEF) y para las acuáticas en el Centro de Investigaciones Piscícolas (CIP). Este documento pretende ser una herramienta útil y práctica, tanto de uso interno para hacer frente al reto de la conservación con estas especies valencianas, como para todos aquellos que afronten el manejo y gestión de estas especies u otras afines y estrechamente relacionadas, enfatizando el reto que supone la obtención de técnicas óptimas en la germinación y el cultivo de las plantas amenazadas, para los que en la mayoría de casos no existen antecedentes de experiencias anteriores (BACCHETTA *et al.*, 2008).

Como indican muchos de los principales tratados sobre conservación vegetal (GÓMEZ-CAMPO, 1985; HERNÁNDEZ BERMEJO *et al.*, 1990; HERNÁNDEZ BERMEJO & CLEMENTE, 1994; HERRANZ *et al.*, 2002), el proceso de germinación y puesta en cultivo de las especies amenazadas aporta una cantidad notable de información útil para el

desarrollo de los programas de recuperación o manejo que las integran. De un lado, se maximiza tanto la información útil obtenible como el éxito de las actuaciones reduciendo al máximo sus costes económicos y ambientales; por otro, se obtiene una gran cantidad de inferencias sobre la eco-fisiología de la germinación (v. BASKIN & BASKIN, 2004)



Instalaciones para el cultivo de especies amenazadas en el CIEF (Centro para la Investigación y Experimentación Forestal) y el CIP (Centro de Investigaciones Piscícolas).

y la respuesta de las plantas en condiciones controladas de cultivo, lo que facilita la interpretación de su posterior comportamiento en campo una vez reintroducidas al medio natural. Además de la importancia que tiene este conocimiento adquirido *ex situ* para el futuro manejo *in situ*, dentro del hábitat (v. HEYWOOD & IRIONDO, 2003; HEYWOOD & DULLOO, 2005), otros muchos autores (CHIN, 1994; IRIONDO, 2001; GUERRANT *et al.*, 2004; BACCHETTA *et al.*, 2008, etc.) enfatizan aspectos prácticos paralelos relacionados con la utilidad implícita del conocimiento sobre la propagación de cada especie, como base para garantizar la obtención actual o futura de productos útiles como alimentos, medicinas, etc. (MAXTED *et al.*, 2007; IRIONDO *et al.*, 2008), ya sea de las propias especies amenazadas una vez que salgan del riesgo de extinción y puedan ser cultivadas con menores barreras legales, o por la información que de estas especies protegidas puede extraerse para el cultivo de otras taxonómicamente próximas.

El libro recoge los casos de especies del CVEFA para las que se ha podido conformar un protocolo de germinación de semillas por sistemas convencionales como principal vía de propagación; se han excluido, y podrán formar parte de futuros textos similares, aquellas plantas que por no producir semillas o por recurrir usualmente en la naturaleza a la propagación vegetativa deben reproducirse preferentemente por dicha vía -p. ej., gran parte de las plantas acuáticas amenazadas-; no obstante para las especies que poseen ficha, se ofrecen los resultados obtenidos mediante la propagación vegetativa. En el mismo sentido, se excluye igualmente el trabajo de conservación *ex situ* a través de vías biotecnológicas avanzadas como la propagación *in vitro* de tejidos vegetales, o la germinación *in vitro* de embriones, que se han aplicado con éxito para la conservación de algunas especies amenazadas valencianas.

La mayor parte del texto se dedica a la exposición de los resultados ya indicados a través de fichas para cada especie, pero se preceden de una introducción donde se facilita



Colección viva (huerto-semillero) de *Silene hifacensis* en las instalaciones del Centro de Información del Parc Natural del Penyal d'Irac.

información sobre técnicas y procedimientos necesarios para recolectar, procesar, conservar y poner en germinación semillas de especies silvestres, así como cultivar las plantas obtenidas. Aunque las especies aquí tratadas están legalmente protegidas, y la recolección de semillas y su puesta en cultivo solo puede autorizarse en condiciones excepcionales para fines previstos en la normativa valenciana, las técnicas descritas pueden servir para guiar la propagación de otras muchas plantas similares, pertenecientes a los mismos géneros o familias botánicas; igualmente, algunas de estas especies poseen poblaciones no protegidas fuera de la Comunitat Valenciana, y en consecuencia las directrices para su propagación pueden aplicarse allí con su propio material vegetal. Además, los resultados que aquí se exponen facilitarán el trabajo de entidades o especialistas que, por necesidades de su investigación o para el desarrollo de iniciativas conservacionistas, obtengan autorizaciones administrativas para propagar y conservar *ex situ* estas especies dentro del territorio valenciano. Desde el equipo de autores desea resaltarse que las técnicas descritas pueden aplicarse por personas o entidades interesadas en la conservación de especies de interés local, no estrictamente protegidas, en instalaciones propias y usando recursos relativamente sencillos y poco costosos.

Sin merma de que para muchas especies amenazadas valencianas ésta es la primera publicación en la que se aportan datos y protocolos sobre su germinación y puesta en cultivo, particularmente para el caso de las plantas endémicas, el libro incluye un elemento novedoso de primer orden: fotografías de las semillas realizadas por técnicas de microscopía electrónica de barrido, por especialistas del Departamento de Botánica de la Universitat de València. Estas fotografías descubren por primera vez para la ciencia la morfología y ornamentación de las cubiertas de semillas de muchas especies, mostrando detalles que pueden ayudar decisivamente a explicar problemas en su germinación o hipótesis sobre su dispersión natural.



Equipo de microscopía electrónica de barrido del Campus de Ciencias de Burjassot de la Universitat de València.



2

ASPECTOS PRELIMINARES



## 2 ASPECTOS PRELIMINARES

< *Thelypteris palustris*.

### 2.1 Las técnicas *ex situ* como complemento de la conservación *in situ*

El territorio valenciano, como otros de la cuenca del Mediterráneo, es particularmente rico en diversidad vegetal (DAVIS *et al.*, 1994; MÉDAIL & QUÉZEL, 1997; THOMPSON, 2005) incluyendo una significativa concentración de plantas exclusivas -endémicas-, raras o amenazadas (LAGUNA, 1998). Hasta hace pocas décadas la

conservación de estas especies singulares se centró en los trabajos dentro del hábitat -conservación *in situ*-, que en muchos casos son los únicos que permiten actuaciones efectivas (HEYWOOD & DULLOO, 2005), pero como norma general, sobre todo para las especies más amenazadas, la protección y manejo del territorio resulta insuficiente para reducir el riesgo de extinción y debe recurrirse a técnicas de conservación *ex situ*, trabajos que se realizan fuera del medio natural (GÓMEZ-CAMPO, 1981; HERNÁNDEZ BERMEJO *et al.*, 1990; GIVEN, 1994; BAÑARES, 2002). En los trabajos de conservación *ex situ* convergen simultáneamente dos vertientes: 1) su papel como elemento de conservación permanente o a largo plazo del germoplasma vegetal a través de los bancos de semillas, relativamente independiente de la conservación *in situ*, 2) su función como etapa intermedia, para producir fuera del hábitat nuevos ejemplares, que posteriormente realimenten el trabajo de conservación en el medio natural; este último aspecto corresponde a lo que muchos expertos denominan 'ciclo *in situ* / *ex situ* / *in situ*'. Aunque las técnicas que se usan para ambos fines son en parte similares, el trabajo al que se refiere este libro se ha desarrollado con orientación a la segunda vertiente citada, donde la conservación *ex situ* es un elemento al servicio de una cadena de acciones que nacen y tienen su destino en el medio natural. En dicho proceso es importante recordar que las actuaciones *ex situ* no son una panacea, y que además pueden estar afectadas de significativas limitaciones, ya que como norma general permitirán conservar o regenerar solo una parte de la variabilidad genética de las especies que se pretenden conservar (HEYWOOD & IRIONDO, 2003).



Microreserva de la Muntanya del Cavall en Albalat dels Tarongers, un buen ejemplo de conservación *in situ*.



Para alcanzar la máxima posibilidad de éxito en la conservación de las especies amenazadas, los dos tipos de técnicas ya citadas, *in situ* y *ex situ*, deben ser aplicadas en el territorio de forma sinérgica (HERNÁNDEZ BERMEJO & CLEMENTE, 1994; LAGUNA, 1994, 1998) y deben concretarse en un *continuum* que parte del estudio y conocimiento detallado de las especies y los factores que afectan a su viabilidad, y que puede resumirse de la siguiente manera:

1 Garantizar la conservación o adecuado manejo del hábitat en el cual la especie puede vivir y reproducirse. Conviene recordar que la protección legal solo es un medio y no un fin (LAGUNA, 1994,1998) y que muchas veces la conservación *in situ* puede obtenerse por vías complementarias como las prácticas de custodia del territorio.

2 Monitorizar las poblaciones y analizar los factores que han causado la regresión de la especie en la naturaleza y/o que impiden la reproducción espontánea. Diseñar las medidas adecuadas para frenar o en su caso compensar las causas de la regresión, incluyendo las correspondientes técnicas *in situ* y *ex situ*.

3 Recolectar semillas u otras formas de propagación de la especie, perjudicando lo mínimo posible a la población original y cultivar nuevos individuos en cantidad suficiente para abordar los trabajos de mejora poblacional en el medio natural.

4 Reinsertar la especie en su hábitat natural, con los cuidados necesarios para garantizar una implantación definitiva y desarrollar el correspondiente seguimiento.

En la práctica, la conservación se plasma en el establecimiento de 'árboles de decisiones' sobre las actividades a realizar, que deben rediseñarse regularmente en función de la retroalimentación de todo el conocimiento sobre la especie y los factores que le afectan.

El presente libro aborda principalmente los aspectos descritos en el anterior apartado 3, que concentra la actividad *ex situ*. Aunque el conocimiento y uso de muchas técnicas *ex situ* para la conservación de especies vegetales se conoce y viene aplicando desde las primeras civilizaciones como elemento básico de la agricultura, su aplicación específica a la conservación de plantas amenazadas se inició a mediados del pasado siglo (GÓMEZ-CAMPO, 1981; HERNÁNDEZ-BERMEJO & CLEMENTE, 1994; IRIONDO, 2001; BACCHETTA *et al.*, 2008) centrándose especialmente en la creación



Plantaciones de especies amenazadas. De arriba a abajo:

- *Gypsophila bermejoi*, Parque Natural de la Puebla de San Miguel.
- *Silene hifacensis*, Parque Natural del Penyal d'Ifac (Calp).
- *Limonium lobatum*, playa del Carabassí, LIC l'Illa de Tabarca (Alicante).
- *Medicago citrina*, Parque Natural del Montgó, Microreserva de flora del Cap de Sant Antoni.

de bancos de germoplasma, instalaciones dedicadas al almacenamiento y preservación a largo plazo de las semillas y esporas. Sin embargo, la escasa interrelación entre estas colecciones, albergadas inicialmente solo en centros de investigación, y las entidades de gestión del hábitat -usualmente administraciones y ONG- hizo que muchos bancos de germoplasma se plantearan durante décadas como 'Arcas de Noé', que pretendían preservar semillas para un hipotético uso futuro pensado a muy largo plazo o frente a grandes catástrofes ambientales. Esta visión se ha ido abandonando en los últimos años, cuando se ha dotado de mayor protagonismo a propuestas de conservación integrada -las que coordinan medidas *in situ* y *ex situ*- donde sin abandonar la opción de la preservación del germoplasma a largo plazo como medida básica de seguridad, se enfatiza en la importancia de la puesta en cultivo de las especies. En consecuencia los bancos de germoplasma se transforman en proveedores de material base para el desarrollo de proyectos a corto y medio plazo, como son por ejemplo los planes de recuperación de especies amenazadas (HEYWOOD & IRIONDO, 2003; IRIONDO & *et al.*, 2008). De este modo, tal y como recomienda el art. 9 de la Convención sobre la Diversidad Biológica de las Naciones Unidas, se ha desarrollado una colaboración mucho más estrecha entre las entidades dedicadas a las dos líneas tradicionales de conservación ya citadas e incluso se ha tendido a unificarlas en un solo centro de trabajo (p. ej., como ocurre en la Red de Conservatorios Botánicos Nacionales en Francia).



Interior de la cámara de conservación de semillas a 4 °C en el Banco de Germoplasma del CIEF.

## 2.2 Requisitos de las técnicas *ex situ* para su utilidad en la conservación integrada

A fin de alcanzar un adecuado encadenamiento de las acciones *ex situ* con las técnicas de conservación de las especies en su hábitat, las primeras deben cumplir al menos tres requisitos básicos:

- que se aspire a la opción de tener 'copias de seguridad' del genoma de cada una de las poblaciones de cada especie amenazada. No basta con tener una muestra de una o pocas poblaciones dejando otras sin representación.
- que preserve de forma representativa la diversidad genética de cada población, recogiendo en campo material del máximo posible de ejemplares o una adecuada muestra representativa de éstos.
- que se multiplique de manera efectiva material para hacer frente a las demandas del trabajo a realizar dentro del hábitat.

Los anteriores requisitos solo pueden atenuarse cuando las condiciones de partida del proceso no permiten su desarrollo, como ocurre con las especies en las que no existe diversidad genética -plantas exclusivamente clonales, determinadas formas de apomixis, especies de las que solo quedan uno o muy pocos ejemplares, etc. En tales casos adquieren especial relieve otras técnicas más adelante detalladas -p. ej. esquejado- y trabajos *ex situ* de alta tecnificación como la micropropagación *in vitro* (CLEMENTE, 1994, 1999; FAY & CLEMENTE, 1997). Aunque estas técnicas se han asociado usualmente con la propagación clonal, cuyo empleo es poco recomendable para las especies o poblaciones que sí que están dotadas de suficiente diversidad, resultan casi las únicas factibles cuando se trabaja con plantas de semillas extremadamente pequeñas o con necesidades nutricionales especiales, como ocurre con las orquídeas mediterráneas (LAGUNA, 2001).



Clon de *Populus tremula* obtenido mediante técnicas de producción *in vitro* en las instalaciones del CIEF.

Cultivo *in vitro* de *Cistus heterophyllus* subsp. *carthagenensis*. >



### 2.3 Una visión de futuro: La conservación *quasi in situ*

Recientemente ha aparecido en la literatura científica un nuevo concepto denominado **conservación *quasi in situ*** aplicado a las actividades mediante las cuales se mantienen colecciones vivas dentro del hábitat, con un grado de intervención humana superior al habitual, o desarrollándose en ecosistemas seminaturales en contacto con el medio natural. Este modelo, teóricamente sugerente, es al mismo tiempo difícil de implementar, ya que se necesita disponer de terrenos adecuados y capacidad para su gestión. Es probable que parte de las acciones futuras de conservación *ex situ* se desarrollen por esta vía, ya que la descendencia de las plantas que se mantengan en colecciones vivas en condiciones ambientales poseerá un grado de selección natural más acorde con ese medio; por el contrario, la excesiva recurrencia al cultivo en viveros alejados del lugar de plantación facilita la acumulación de expresiones génicas que pueden ser luego de escasa utilidad cuando se intenta reimplantar la especie en el hábitat originario (p. ej. menor resistencia a sequías, a heladas o al ataque de hongos y fitófagos).

### 2.4 La flora amenazada y su conservación *ex situ* en la Comunitat Valenciana

La flora de la Comunitat Valenciana está integrada por más de 3.200 especies, de las que en torno a 370 (11%) son endemismos (plantas exclusivas) de la Península Ibérica o íbero-baleáricas. De éstas, un total de 64 (17%) solo viven en el territorio valenciano, no considerándose nativas de otros sitios del planeta (LAGUNA, 1998, 2008). Además, en lo referente a la flora amenazada, según dicta el Decreto 70/2009, de 22 de mayo, por el que se crea y regula el Catálogo Valenciano de Especies de Flora Amenazadas (CVEFA), existen 398 especies con protección legal (ANÓNIMO, 2009), entre las que destacan por su particular riesgo de desaparición las del propio CVEFA, que reúne un total de 42 especies en peligro de extinción y 83 que catalogan como vulnerables, integrando ambos grupos el anexo I de la citada normativa. La biología de estas especies ha sido detallada en el trabajo editado por AGUILELLA *et al.* (2009).

El Servicio de Espacios Naturales y Biodiversidad (SENB), adscrito a la Dirección General de Medio Natural, es la unidad técnica responsable de diseñar y desarrollar las acciones de conservación de las especies protegidas por el Decreto 70/2009. Para la conservación *ex situ*, la mayoría de actividades se desarrollan operativamente en el Centro para la Investigación y Experimentación Forestal

(CIEF) coordinadamente con el equipo del Banc de Llavors Forestals -dedicado preferentemente a especies arbóreas o grandes arbustos-, y en el Centro de Investigación Piscícola de El Palmar (CIP). Tales actividades se desarrollan en colaboración con centros de investigación y otros departamentos de la Conselleria con infraestructuras de apoyo, como son los viveros forestales o los dependientes de los espacios naturales protegidos. Para el caso concreto de los bancos de semillas u otros materiales vegetales de reproducción (bulbos, estaquillas, etc.), tanto el CIEF como



Algunas especies en peligro de extinción incluidas en el Catálogo Valenciano de Especies de Flora Amenazadas. De arriba a abajo:

- *Limoniun lobatum*.
- *Rededa hookeri*.
- *Erodium celtibericum*.

### El Catálogo Valenciano de Especies de Flora Amenazadas (CVEFA)

El CVEFA es la máxima figura de protección legal para las plantas valencianas, establecida por el Decreto 70/2009. Contiene las 125 especies que se consideran con mayor riesgo de extinción. Algunas de ellas llegan al extremo de tener incluso 1 solo ejemplar nativo vivo en zonas naturales (caso de *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis*), o que todos los efectivos mundiales vivan reunidas en menos de 100 m<sup>2</sup> (caso de *Limonium perplexum*). El CVEFA tiene a su vez dos categorías, plantas En Peligro de Extinción y Vulnerables, siendo las primeras las que corren mayor riesgo de desaparición.



el CIP poseen instalaciones específicas que se integran en el Banco de Germoplasma de Flora Silvestre Valenciana (BGFSV), creado por el art. 23 del Decreto 70/2009 y cuya sede o unidad central de conservación a largo plazo reside en el Jardí Botànic de la Universitat de València; dicha unidad acumula ya casi dos décadas de experiencia en la conservación de semillas de especies singulares valencianas (ESTRELLES *et al.*, 2004).

Las colecciones CIEF y CIP empezaron su rodaje con muy pocas especies a finales de la década de 1990, gracias al apoyo de diversos proyectos LIFE de la Comisión Europea, se han venido incrementando y mejorando con el apoyo de otros fondos comunitarios como FEOGA-Orientación o más recientemente FEADER. Los trabajos actualmente cofinanciados por el fondo FEADER se centran en poblaciones de plantas situadas en terrenos de la Red Natura

2000 o con previsión de su implantación en tales zonas, dando prioridad a las características de tipos de vegetación considerados como 'hábitats de interés comunitario' por la normativa de la Comisión Europea.

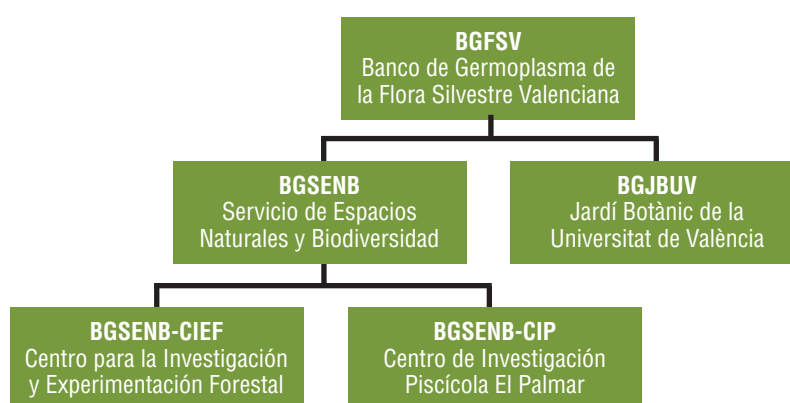


Instrumentos para la conservación de semillas en el Banco de Germoplasma del Jardí Botànic de la Universitat de València.

### El Banco de Germoplasma de Flora Silvestre Valenciana (BGFSV)

El BGFSV es una red de instalaciones que conserva semillas de especies de flora silvestre, dando prioridad a los táxones protegidos por el Decreto 70/2009 y a los endémicos exclusivos o ibero-

levantinos presentes en la Comunitat Valenciana. Dicha red la integran las colecciones sitas en el Banco de Germoplasma del Jardí Botànic de la Universitat de València, donde reside la sede central y la principal unidad de conservación a largo plazo del BGFSV, y en las instalaciones del CIEF y CIP-El Palmar, donde adquieren más importancia las colecciones de semilla para la producción de plantas a corto o medio plazo. Además, complementa el BGFSV el Banc de Llavors Forestals de la Comunitat Valenciana, adscrito al CIEF y dedicado a la conservación y producción de especies autóctonas arbóreas y de grandes arbustos, que se desarrolla a través del programa ECOGEN.



## 2.5 La trazabilidad del material, hilo conductor de la conservación integrada

Desde el Servicio de Espacios Naturales y Biodiversidad (SENB) se desarrolla para cada especie amenazada un grupo de acciones concatenadas que permiten desarrollar el ciclo de conservación integrada, y que utiliza como hilo conductor el principio de **trazabilidad** de las muestras vegetales, traducido en fichas de información para cada población, lote de semillas, partida de plantas producidas y material implantado en campo. La línea de actividad se inicia con la localización, censo, cartografía, estudio demográfico y caracterización de las poblaciones de las especies amenazadas (NAVARRO *et al.*, 2010), procediéndose posteriormente a la recolección del material útil para conservación y propagación -semillas, esporas u otros propágulos-.

El material recolectado es fichado, procesado y limpiado y se prepara debidamente para su conservación en condiciones de baja humedad y niveles reducidos de temperatura (HERNÁNDEZ BERMEJO *et al.*, 1990; BACCHETTA *et al.*, 2008). Según se detalla más adelante; gran parte de las semillas procesadas por el SENB se incorporan a la '**colección activa**' del CIEF y CIP, mantenida en torno a 4 °C, lista para su inmediata puesta en germinación al servicio de los programas de plantación. Las accesiones de semillas son testadas para conocer su viabilidad, al tiempo que se estudian y caracterizan para estimar sus posibilidades de uso futuro; el elemento sustancial de este proceso es la obtención de un **protocolo de germinación**, esto es, una técnica depurada y susceptible de repetición con adecuadas garantías para obtener la máxima cantidad posible de

nuevas plantas. Otra parte de los mismos lotes de semillas, en particular para aquellos que demuestran poseer mejores resultados en los diferentes parámetros germinativos, pasan a formar parte de la '**colección base**' o 'fondo de investigación'; este tipo de colecciones, más habituales en los jardines botánicos y centros de investigación, se conservan a mucha menor temperatura, entre -15 y -25 °C, y son los que aseguran la preservación del material a muy largo plazo -teóricamente durante miles de años.

Como último eslabón de la actividad, parte de este germoplasma es utilizado en la producción de planta, tanto en las diferentes instalaciones del CIEF, como a través de los viveros forestales de la Generalitat Valenciana repartidos por el territorio valenciano, e instalaciones similares de espacios naturales protegidos. La mayor parte de la producción de planta que se realiza en las instalaciones del SENB está destinada a abastecer los trabajos de conservación dentro de los terrenos gestionados por la Generalitat y adscritos a red Natura 2000, con particular prioridad en las microrreservas de flora y en los espacios naturales protegidos (LAGUNA, 2003), siguiendo las recomendaciones de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (AKERROYD & WYSE JACKSON, 1995; IUCN, 1998). En la medida de lo posible, las futuras implantaciones en el medio natural se programan con un diseño experimental que permite obtener la mayor cantidad de información sobre el éxito del proyecto y asegurar el seguimiento de su efectividad. La producción en los centros del SENB permite además el abastecimiento de planta para la confección de rocallas didácticas y otras actividades divulgativas.



Accesiones de semillas del SENB en el CIEF con sus correspondientes etiquetas y códigos que permiten la trazabilidad de la muestra.





**3**

**MÉTODO DE TRABAJO**





< Germinación de *Ferulago ternatifolia*.

La cadena de trabajo para la conservación y gestión del germoplasma de las especies vegetales de interés consiste en una serie de pasos que constituyen un proceso cíclico (Fig. 1), comenzando con la localización de las poblaciones y terminando, en el mejor de los casos, con la implantación exitosa de material vegetal también dentro del medio natural.

Como el objetivo final es el mantenimiento o mejora de la diversidad de cada especie amenazada (HERNÁNDEZ BERMEJO *et al.*, 1990; IRIONDO, 2001; IRIONDO *et al.*,

2008), es necesario poseer una robusta información de partida sobre la biología de la especie y la caracterización de sus poblaciones y las razones de su declive (BAÑARES, 2002; IRIONDO *et al.*, 2009), lo que ayuda a planificar futuras plantaciones y reducir el riesgo de fracaso en el proceso de reintroducción en el medio natural. Tras el estudio *in situ* de la población, se inicia la fase de trabajo *ex situ* en sentido estricto, muchos de cuyos fundamentos son comunes a los desarrollados para la conservación de germoplasma y el cultivo de especies agrarias y forestales, por lo que pueden encontrarse en tratados básicos sobre

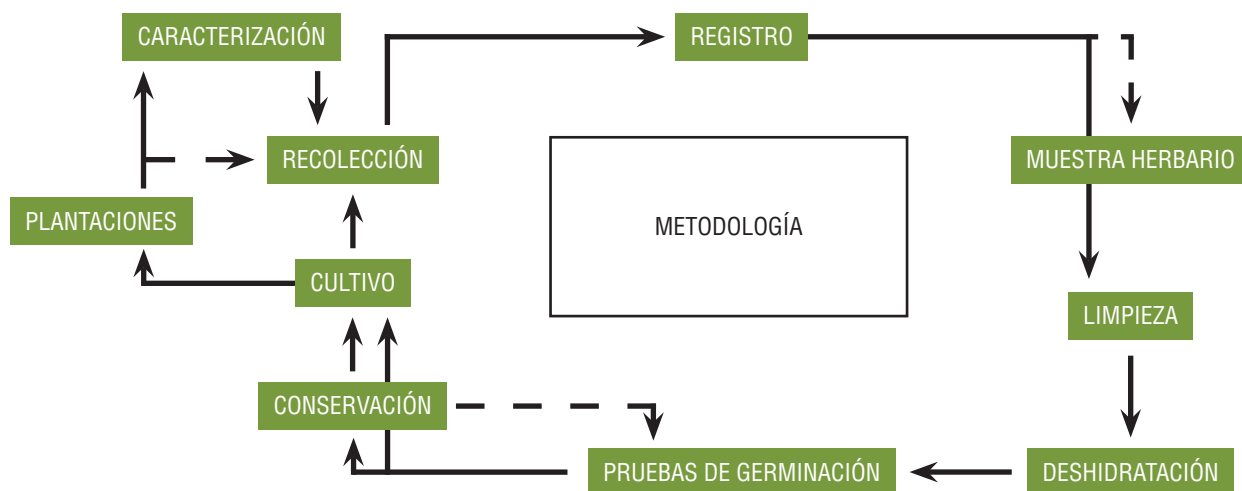


Figura 1. Método y pasos de la cadena de trabajo con el material vegetal de reproducción dentro del Banco de Germoplasma de la Flora Silvestre Valenciana. Las flechas de trazo continuo indican un paso obligado, mientras que las discontinuas indican pasos ocasionales.



De arriba a abajo, imágenes de censos de:

- *Lupinus mariae-josephae*, Plà del Tramussar, Xàtiva (Valencia).
- *Erodium celtibericum*, Penyagolosa, Vistabella (Castellón).
- *Limonium mansanetianum*, Font Amarga, Villanueva de Castellón (Valencia).
- *Limonium dufourii*, Marjal del Moro, Sagunto (Valencia).

tecnología de semillas y producción de plantas (THOMSON, 1979; BEWLEY & BLACK, 1985; CUISANCE, 1988; BESNIER, 1989; HARTMAN & KESTER, 1991).

La actividad *ex situ* debe precederse de una adecuada etapa de documentación sobre la especie -o en su defecto sobre otras taxonómicamente cercanas- y la fisiología de sus **unidades de conservación** (esporas, bulbos, esquejes, etc.). Igualmente, cada fase del proceso da lugar a conocimientos concretos, que deben registrarse y analizarse, retroalimentando y mejorando todo el ciclo de actividad. Aunque siempre se dé más importancia a los aspectos materiales de la actividad -p. ej. al número de plantas producidas- lo que hace funcionar el ciclo es la protocolización progresiva de sus resultados, de modo que el conocimiento que emana de la gestión (p. ej. los protocolos de germinación) es tan importante como sus resultados.

La recolección con la que se inicia el ciclo da lugar a un **lote** de material reproductivo, y a partir de éste a sus posteriores **acciones**; partes en las que se divide el lote, y que se someten al almacenamiento en banco de germoplasma como unidades independientes. Como se indica más adelante, estas partidas de material tienen asignado un código que permite su trazabilidad a través de las diferentes fases del ciclo metodológico. En la mayoría de especies, la pieza central de esta cadena de procesos de conservación es la capacidad de las semillas u otras unidades reproductivas para ser mantenidas por tiempo prolongado en estado artificial de letargo, lo que en la mayoría de casos se consigue gracias a la combinación de bajos niveles de humedad y temperatura. La perdurabilidad de las unidades de conservación en estas condiciones de letargo con la mínima pérdida posible de viabilidad asegura que puedan utilizarse en cualquier momento, sin que los gestores de la conservación de flora -que fundamentalmente deberán trabajar *in situ* a través de plantaciones- deban depender necesariamente de la aleatoriedad ambiental interanual, la vejería en la producción de semillas, etc.



Cartografía de *Silene diclinis* en Quatretonda (Valencia).



**4**

**RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL DE CONSERVACIÓN  
Y REPRODUCCIÓN**

## 4 RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL DE CONSERVACIÓN Y REPRODUCCIÓN

< *Helianthemum caput-felis*.

### 4.1 Material vegetal de origen y precauciones para maximizar su diversidad

Como material vegetal de reproducción y conservación se entiende cualquier parte de la planta susceptible de ser propagada y/o mantenida a largo plazo: esquejes, rizomas, tubérculos, bulbos, frutos y por supuesto semillas o esporas en el caso de plantas criptógamas. De entre todos los propágulos las semillas son las mejor capacitadas para la recolección, transporte, almacenamiento, reproducción, cultivo, etc., ya que constituyen un estadio del ciclo vital compacto, pequeño, resistente y en la mayoría de los casos muy longevo. La semilla es en sí misma un individuo con plena potencialidad y contiene parte de la variabilidad genética de la especie.

Como ya se ha adelantado, las recolecciones de semillas seleccionadas deben ser representativas de la variabilidad genética de las poblaciones de origen (IRIONDO *et al.*, 2008). De esta manera los procesos evolutivos, entre ellos la selección natural, cuentan con la máxima variabilidad genética y fenotípica posible facilitando así la supervivencia y adaptabilidad de las especies a su entorno a través del tiempo y del espacio (NICOLAU *et al.*, 2003). Como norma más habitual debe aspirarse a recolectar pocas semillas de cada ejemplar, pero haciéndolo sobre el máximo número posible de éstos en la población, o sobre una representación aleatoria o estratificada -en función de la especie, finalidad de la colecta del material, etc.- suficiente de dicha población. Esto implica que el conocimiento previo de la abundancia y distribución de las poblaciones y el patrón espacial de agregación de



Recolección de frutos de *Rives uva-crispa* en el Parque Natural de la Puebla de San Miguel (arriba) y de *Amelanchier ovalis* en la sierra de Aitana (abajo).

sus individuos, es una pieza clave para la planificación de las tareas de recolección, reforzando lo ya indicado sobre la obtención de una adecuada información preliminar -censo y cartografía poblacional suficientemente precisas-. Igualmente la población de la que se extraerán las semillas debe visitarse a menudo para reconocer el ciclo fenológico, y por tanto elegir el momento de madurez adecuada de la muestra a recolectar.

En la mayoría de los casos, las poblaciones objeto de trabajo no suelen estar caracterizadas genéticamente, por lo que por regla general la recolección debe de ser al menos del 50% de los individuos presentes, con las excepciones más abajo comentadas. Este porcentaje puede resultar excesivo para poblaciones con censos altos, por lo que alternativamente se puede optar por recolectar de ejemplares distribuidos por toda el área de ocupación conocida



Prueba de corte de semillas de *Juniperus oxycedrus* subsp. *macrocarpa* (arriba) y de *Corema album* mostrando el embrión sano (abajo).

de la población, siguiendo recorridos o transectos al azar. En el caso de pequeñas poblaciones, es necesario evitar la toma de muestras de un número excesivo de individuos cuando ello puede poner en riesgo la supervivencia a medio plazo, p. ej. en el caso de plantas con escasa producción de semilla, que a su vez deba residir mucho tiempo en el suelo para ir venciendo procesos internos de dormición o resistencia de las cubiertas de la semilla. En estos casos es mejor recolectar el material repitiendo la recolección cada año y recogiendo pocas semillas a la vez de cada ejemplar, y estableciéndose normalmente como límite el 10% del total disponible. Esta regla es particularmente importante para las plantas de ciclo anual, ya que normalmente no serán sometidas a cultivo -dado que su finalidad suele ser la siembra directa-.

#### 4.2 Momento óptimo de la recolección

Para garantizar una óptima viabilidad de las semillas a largo plazo es prioritario hacer coincidir la recolección con el momento en que éstas han alcanzado el estado de maduración, durante la época dispersiva o justo antes -predispersiva-. En campo puede evaluarse la madurez de la simiente mediante la técnica denominada "prueba del corte", que consiste en cortar la semilla en dos mitades, mostrándose dura y seca si está madura, por comparación con otras del mismo ejemplar o población. Alternativamente existen algunos otros indicadores que revelan la fase dispersiva, como por ejemplo para los frutos carnosos el aumento de tamaño, el cambio de color y a veces la propia dureza del fruto. De manera general, en la maduración de los frutos no carnosos, los propágulos se vuelven más secos y duros, y en una gran parte de ellos al agitar la planta o el fruto se oyen las semillas ya desprendidas. Por otro lado, en algunos frutos el indicador es el inicio de la dehiscencia por medio de poros, hendiduras, etc. En general, las evidencias morfológicas pueden ser muy variadas y a veces no del todo fiables por lo que la experiencia del recolector es de gran importancia.

#### 4.3 Precauciones para la recolección y el transporte de semillas

Cuando nos enfrentamos a especies nuevas, con las que se trabaja por primera vez, o en determinados casos en los que pueda existir probabilidad de error de identificación, es aconsejable la recolección de una muestra vegetal para la confección de un pliego de herbario. Este testigo siempre identificará la muestra de germoplasma y permitirá en casos de cambios en la clasificación y sistemática del grupo reconocer el taxon al cual pertenece la muestra conservada en el banco. En el mismo sentido es



Utilización de guantes para la recolección de semillas de plantas alérgicas como *Dictamnus hispanicus*, arriba, o espinosas como *Echium saetabense*, abajo.

recomendable anotar la coexistencia en la zona de recolección de otras especies del mismo género u otras taxonómicamente muy próximas, ya que en algunos casos la descendencia puede contener híbridos, no detectables en la fase de semilla.

En el momento de la recolección, los propágulos y semillas no han de evidenciar síntomas de enfermedad o parasitismo. En caso necesario, cuando se trabaja con plantas de familias cuyas semillas suelen ser atacadas por insectos u otros predadores (p. ej., muchas de las Asteráceas o Compuestas) es recomendable llevar algún producto insecticida para aplicar directamente a las semillas tras su recogida, siempre que se haya comprobado que sus principios activos no actúan como inhibidores de la germinación. En cualquier caso y en estas situaciones es importante la limpieza inmediata una vez se traslada la muestra al laboratorio.

Normalmente las recolecciones de semillas se realizan a mano, protegiéndose con guantes cuando es necesario, particularmente en el caso de plantas espinosas, alérgicas o con compuestos tóxicos al tacto. A menudo es de gran utilidad el empleo de pinzas, tijeras, u otros utensilios; en ocasiones se requieren herramientas o materiales especiales (pértigas, pequeñas nasas de muselina, etc.). Para los bulbos y rizomas suele requerirse el uso de azadillas y paletas. El hábitat de las especies también plantea precauciones especiales, y en algunos casos debe recurrirse a personal con habilidades especiales en escalada, barranquismo u otras actividades de montaña.

En la recolección, el material ha de depositarse dentro de un contenedor poroso que permita la transpiración, no impermeable y lo suficientemente resistente (por ejemplo, un sobre de papel) de manera que la humedad no se acumule en su interior durante la jornada de muestreo, evitando la proliferación de hongos o bacterias. En el caso de frutos carnosos es conveniente utilizar una bolsa de plástico, que no conviene cerrar del todo.

#### 4.4 Indicaciones adicionales para el material vegetativo

Para la recolección de esquejes, rizomas y bulbos es imprescindible documentarse previamente ya que la época del año, estado fenológico, órgano recolectado, etc., son importantes para la supervivencia de estos propágulos. Al igual que con las plantas de las que se recolectan semillas, con las de material vegetativo ha de seguirse una regla que optimice la diversidad de la muestra. Por ejemplo, en las especies donde los bulbos suelen crecer agregados

en grupos compactos -usualmente hijuelos de aquel mayor al que se asocian-, conviene recolectar solo una parte de los mismos.

En general, los esquejes recolectados han de preservarse durante el transporte en condiciones de humedad ambiental alta y temperatura baja para evitar la deshidratación de sus tejidos. Si las estaquillas son de pequeño tamaño, pueden transportarse bien en bolsas herméticas dentro de neveras portátiles, a temperaturas algo inferiores a las ambientales. Los bulbos y rizomas son más resistentes, pero al recolectarlos se ha de preservar parte del sistema radicular al que están conectados, por ejemplo extrayendo a su vez parte del sustrato donde crecen.

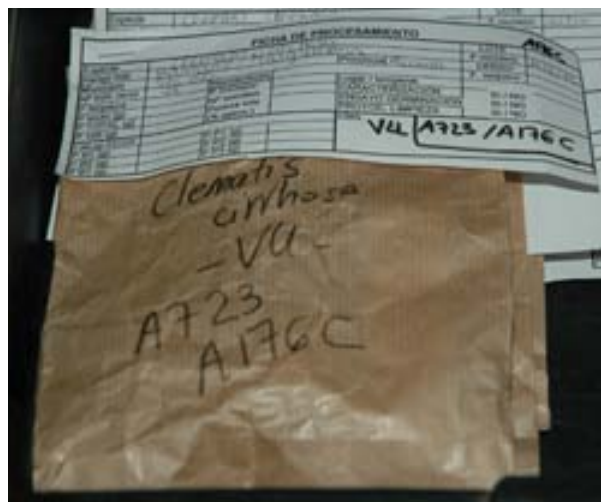
#### 4.5 Datos de campo a incluir junto a la muestra

Una vez acabada la recolección se sella el contenedor de forma segura para evitar así la pérdida del material y se anotan los datos necesarios en la ficha de campo. Sin merma de otras formas de almacenamiento (libretas, ordenadores de campo, etc.), es conveniente llevar lápices y rotuladores de tinta indeleble para identificar cada contenedor de muestras (bolsas, sobres, cajas...) acompa-

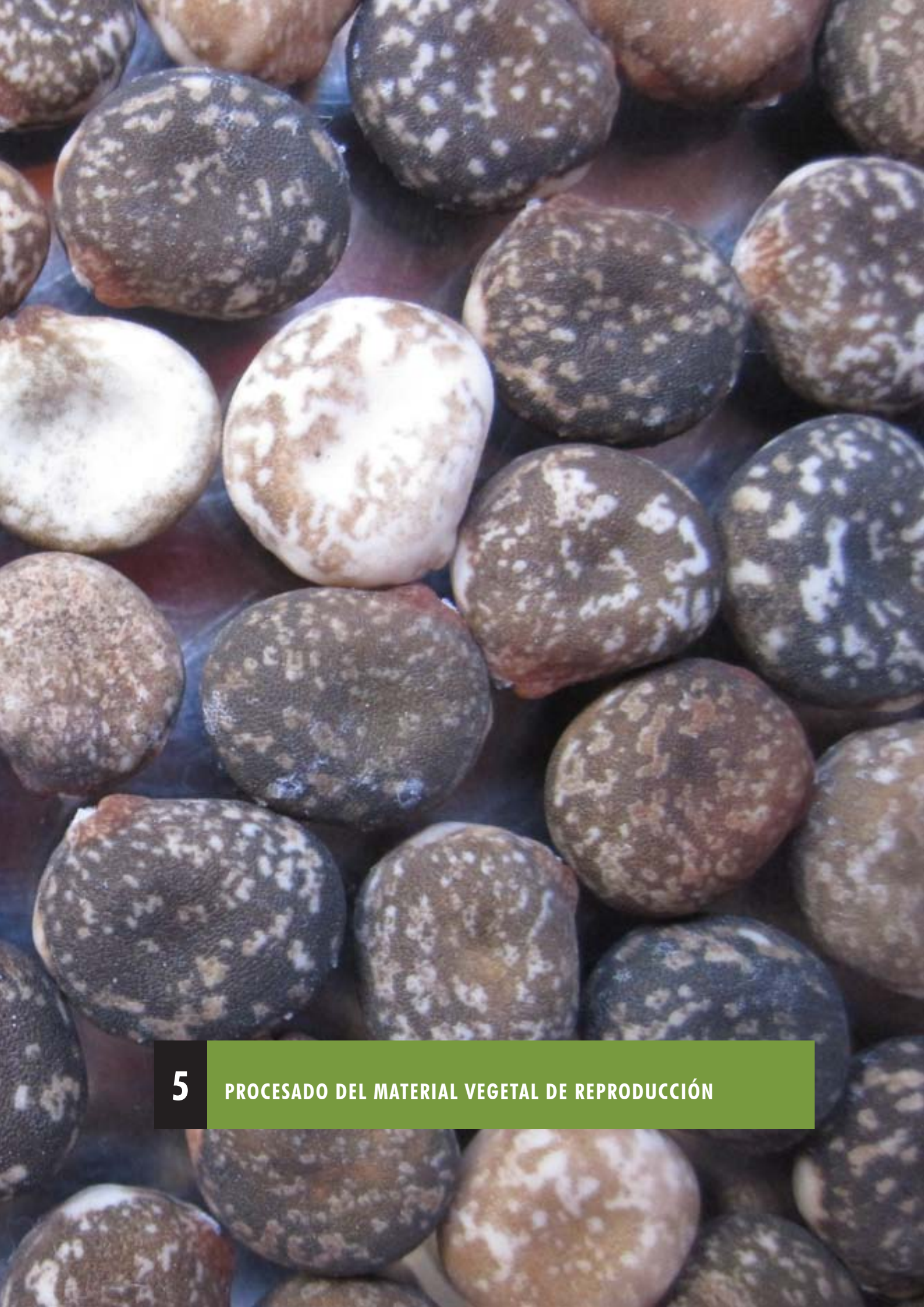


Recolección de esquejes de *Mentha cervina* (arriba) y preparación de los esquejes de *Frangula alnus* subsp. *baetica* en el CIEF (abajo).

ñándolo de una etiqueta o ficha básica de información. Se incluirán datos como el nombre del taxon, paraje donde se recolecta, municipio, identidad de los recolectores y fecha de recolección, coordenada geográfica, número de ejemplares de los que se ha recogido la muestra (exacto o suficientemente aproximado), y si es posible cualquier observación que facilite el conocimiento del patrón de distribución espacial de las plantas o de su diversidad (p. ej. diferencias de coloración floral, tamaños, etc.). En caso de no poderse tomar en campo la citada coordenada, se deberá posteriormente buscar la zona con adecuados visores cartográficos. Las coordenadas pueden referirse a un centroide orientativo de la población, o en algunos casos a cada ejemplar -p. ej. cuando se recolectan esquejes de un número pequeño y disperso de especímenes, que van a dar lugar a diferentes líneas clonales en cultivo-.



Ficha con los datos recogidos después de la recolección de las semillas (arriba) y georeferenciación del lugar de recolección (abajo).



**5**

**PROCESADO DEL MATERIAL VEGETAL DE REPRODUCCIÓN**





## 5 PROCESADO DEL MATERIAL VEGETAL DE REPRODUCCIÓN

< Semillas de *Lupinus mariae-josephae*.

Dentro de este apartado se incluyen las fases preliminares que permiten preparar la semilla para asegurar su posterior uso o conservación (registro, limpieza, desecación, encapsulado). Muchos de estos procesos han sido detallados con carácter general por BACCHETTA *et al.* (2008). Además, es habitual que algunas de las técnicas que más adelante se detallan estén descritas y aconsejadas para otras especies, en particular las forestales o cuantas se usan en restauración, por lo que es aconsejable la lectura paralela de obras dedicadas a tales materias (p.ej. HANSON, 1985; YOUNG & YOUNG, 1986; WILLAN, 1991; IRIONDO & PÉREZ GARCÍA, 1999; IRIONDO, 2001; KOLOTELO *et al.*, 2001; IPGRI/FAO/FLD, 2004), en particular cuando corresponden a sus aplicaciones al territorio valenciano (GARCÍA-FAYOS, 2001) u otros próximos (CATALÁN, 1991; HERNÁNDEZ BERMEJO & CLEMENTE, 1994; ALOMAR & GARCÍA DELGADO, 2000; NAVARRO & GÁLVEZ, 2001; PIOTTO & NOI, 2001).

### 5.1 Registro de las muestras

Cada recolección se acompaña de una determinada información básica asociada para el control de trazabilidad a lo largo de todo el proceso de manipulación en el banco de germoplasma. Parte de estos datos se extraen de lo ya aconsejado en el apartado precedente sobre las etiquetas y anotaciones en los contenedores de material en el momento de la recolección, mientras que otros corresponderán a las fases de laboratorio y gabinete. Entre estos datos figuran el nombre de la especie, lugar y fecha de la recolección, viabilidad y/o germinabilidad inicial, fecha y

condiciones de almacenamiento, protocolos de germinación y cultivo, datos sobre ensayos de germinación y de viabilidad periódicos, etc. En el caso del SENB, toda esta información, de gran importancia para el futuro uso de las muestras almacenadas, está registrada en una base de datos denominada BDBGFSV (Base de Datos del Banco de Germoplasma de la Flora Silvestre Valenciana), dónde se asigna a cada accesión un código alfanumérico que la identifica y que asegura su trazabilidad.

### 5.2 Limpieza y manipulación

Una vez recolectadas las semillas, frutos u otros propágulos, el material es procesado y manipulado pasando por una serie de operaciones, adecuadas para cada especie y cuya finalidad es obtener un material apto para su almacenamiento -o en su caso para su puesta en cultivo a la mayor brevedad- en condiciones fitosanitarias óptimas y con la menor pérdida posible de vigor y viabilidad. Tras la llegada al laboratorio o instalación concreta de procesamiento, las semillas se procesan según se indica en el siguiente párrafo, o en caso necesario se mantienen en cuarentena para eliminar los riesgos de infestación, contaminación o predación por insectos, hongos u otros parásitos. El tiempo transcurrido entre la llegada de la muestra y la fase de procesamiento más abajo descrita ha de ser el mínimo posible. En caso de requerirse un almacenamiento preliminar -p.ej. si se han recolectado a la vez muchas especies por coincidir fenológicamente el momento óptimo de su recogida-, las semillas de las que se sepa que no toleran la desecación se han de almacenar

## Registro de las muestras

**Código localización** **Código de la especie B/A**

**Nombre del taxon**

Paraje. Municipio

Provincia. Fecha. Grado de protección

**V207 V140B B1**

***Garidella nigellastrum***

La Hoya. Pedralba

Valencia. 22/06/2009. EP

- **Código localización:** código alfanumérico. La letra indica la inicial de la provincia donde se han recolectado las semillas (A: Alicante, C: Castellón y V: Valencia). El número hace referencia al lugar físico donde se encuentra la accesión en las cámaras frigoríficas donde se conserva.
- **Código de la especie:** código alfanumérico. La primera letra indica la inicial de la provincia donde se han recolectado las semillas al igual que en el anterior código. El número hace referencia al código asignado para ese taxon en la base de datos. La letra final indica el número de la accesión para el taxon para una determinada población y fecha concreta.
- **B/A:** código alfanumérico. Colección base (B), colección activa (A).
- **Nombre del taxon:** nombre científico de la planta de la que se ha recolectado las semillas.
- **Paraje:** nombre del paraje que recibe el área geográfica donde han sido recolectadas las semillas.
- **Municipio:** nombre del municipio donde se han recolectado las semillas.
- **Provincia:** provincia donde queda inscrita la población.
- **Fecha:** día/mes/año de recolección de las semillas.
- **Grado de protección:** según el Decreto 70/2009 por el que se crea el Catálogo Valenciano de Especies de Flora Amenazadas. Se utiliza un acrónimo según la categoría, EP (En Peligro), VU (Vulnerable), EPNC (Especie Protegida No Catalogada), EV (Vigilada).

en un lugar húmedo y a temperaturas bajas pero sin llegar al punto de congelación. En el caso de bulbos, rizomas y esquejes es conveniente conservarlos en un sitio fresco y oscuro, y con un nivel de humedad proporcional al que poseen en su hábitat natural o superior. Estas condiciones de almacenamiento preventivo pueden diferir sustancialmente de las que más adelante se detallan para el almacenamiento a largo plazo.

La **finalidad** del procesamiento es separar las semillas del resto de partes del fruto, salvo cuando éstos, completos o en parte, son las propias unidades de almacenamiento de germoplasma o de puesta en germinación para producción de planta. Gran parte del procesamiento corresponde a lo que popularmente se denomina '**limpieza**' de las semillas. En una primera fase las impurezas son los elementos no adscritos a los frutos o sus semillas (restos de ramillas u otras partes de la inflorescencia, hojas, etc.) pero en la mayoría de casos gran parte del trabajo de limpieza consiste en la extracción de las partes que no han de conservarse posteriormente (alas u otras estructuras que acompañan a la semilla, cubiertas de frutos, pulpas, etc.), y que pueden constituir posteriormente una fuente de contaminación por hongos o bacterias (v. BESNIER, 1989; HONG *et al.*, 1996).



Semillas recién recolectadas de *Medicago citrina* (arriba) y *Limniris pseudacorus* (abajo).



En el proceso de limpieza se utilizan una serie de instrumentos diferentes, según el tipo de semilla y fruto a procesar. Como se detalla más adelante, la separación de algunas semillas contenidas en frutos carnosos se realiza inmediatamente tras la recolección, evitando que las partes carnosas de los frutos se dessequen. En frutos secos, el propio proceso de desecación provoca en muchos casos la dehiscencia y la expulsión de las semillas. Para los casos más complejos, en los que las semillas son de tamaño muy pequeño o la recolección ocasiona una gran cantidad de restos e impurezas, la limpieza se suele realizar mediante aventados suaves, a través de tamices, o mediante máquinas concretas que aprovechan características concretas como calibres, pesos, etc. En último término, cuando los métodos anteriores no permiten la limpieza, ésta debe realizarse manualmente, seleccionando una por una las semillas que compondrán la accesión o muestra de conservación.



En función de las fuentes de consulta, existen diversas clasificaciones de los frutos y semillas en función del tipo de procesamiento al que deben someterse. Para el caso de frondosas BONNER (1977) estableció tres clases que a menudo pueden extrapolarse a otros tipos de plantas:

- semillas que deben secarse antes de la limpieza, extracción y el almacenamiento.
- semillas que deben mantenerse húmedas en todo momento durante la limpieza y almacenamiento, corresponden normalmente al concepto de semillas 'recalcitrantes', más adelante detallado.
- semillas que deben mantenerse húmedas para la extracción y después han de secarse para su almacenamiento.



Los métodos de extracción más utilizados son:

1. **Despulpado (maceración).** Debe realizarse al poco tiempo de la recolección. Se aplica a las especies con frutos carnosos, en las que se precisa separar las semillas de la pulpa. Los frutos son inmersos en agua, manteniéndose por poco tiempo -el suficiente para reblandecer las cubiertas- y dependiendo del tamaño de los mismos, se puede realizar el despulpado manualmente mediante frotación o bien mediante una despulpadora mecánica.

2. **Secado.** Para los frutos secos dehiscentes se utilizan urnas cerradas de metacrilato o cristal transparente que son expuestas durante 2-3 días

Instrumentos utilizados en la limpieza de las semillas. De arriba a abajo:

- mesa densimétrica para separar por densidad mediante vibración.
- aventadora para separar por flujo de aire.
- diferentes tamices con tamaños de luz distintos.

al sol directo, salvo que se tenga constancia de que la iluminación perjudica la viabilidad de la semilla o favorece dormiciones en ésta; en este último caso se puede recurrir a vías alternativas en instalaciones cerradas (p.ej. sometimiento a flujos de aire caliente).

3. **Trillado.** Consiste en romper la cubierta del fruto mediante máquinas trituradoras. Una vez trillada la semilla se usan diversos tamices para separar las diferentes impurezas.



De arriba a abajo: despulpado, cribado, y limpieza de semillas con guantes.

Una vez extraído el material de conservación para la especie, éste se somete a diferentes operaciones adicionales de limpieza con el fin de separar las unidades viables de las no viables. El método más apropiado para esta selección y la obtención del mayor número de semillas viables dependerá del tamaño, forma y demás características de las mismas. Los métodos de limpieza más utilizados en esta segunda fase, son los siguientes, que en ocasiones puede usarse adicionalmente para la etapa anterior (extracción y eliminación de impurezas) o combinarse directamente con aquéllas:

1. **Aventado.** Se basa en el principio de que cualquier objeto puede flotar en una corriente de aire a velocidad suficiente, dividiendo la muestra de material en dos fracciones, una ligera que asciende a mayor altura que la segunda, más pesada -usualmente la más ligera corresponderá a las impurezas. Esta operación se puede realizar mediante máquinas aventadoras o bien manualmente, como por ejemplo con ayuda de un secador de pelo o soplando suavemente.

2. **Cribado.** Consiste en pasar las semillas por tamices de diferentes tamaños de luz acompañados de un movimiento rotatorio, separándose las semillas e impurezas en función de su grosor y diámetro. El cribado puede acompañarse complementariamente de un trillado, añadiendo a la muestra arena u otros componentes estériles duros que luego puedan separarse con facilidad.

3. **Flotación en un líquido.** Método densimétrico. Se basa en la diferente densidad específica de las semillas en función de su grado de viabilidad, siendo habitualmente más pesadas las que están en buen estado.

4. **Lavado.** Consiste en utilizar una criba sobre la cual se depositan las semillas, que se someten a un flujo de agua a presión. En muchas especies las semillas vanas o insuficientemente formadas tienen menor tamaño, por lo que pueden resultar eliminadas mediante este procedimiento.

5. **Manual.** Manualmente se separan las semillas sanas cuando se poseen indicadores externos que así lo permiten, como el color, la rugosidad de la cubierta, etc.

Tras este periodo se realizan una serie de test previos a partir de una muestra representativa de semillas del lote

seleccionada al azar. Estos análisis incluyen la evaluación de determinados parámetros, siendo los más relevantes los siguientes:

- **análisis de pureza:** porcentaje total de semillas viables respecto del total del lote.
- **dimensión:** tamaño medio (longitud, grosor) de la unidad de conservación.
- **aspecto:** color y estado fitosanitario de la unidad de conservación.
- **peso medio de 100 unidades (semillas o frutos):** peso calculado a partir de seis réplicas de 100 unidades cada una.
- **tamaño del lote:** número de semillas totales, obtenido mediante conteo directo a partir de extrapolación del peso de 100 unidades antes indicadas.

Toda la documentación que genera este trabajo queda reflejada en fichas de trabajo y en formato electrónico dentro de la base de datos BDBGFSV, cuyo contenido se ha ido depurando y estandarizando progresivamente. La información no solo permite caracterizar los lotes de semillas y las accesiones a las que éstos darán lugar, sino que ayuda a interpretar procesos fisiológicos posteriores, ya que algunos de los tratamientos a los que se someten tales unidades de conservación pueden tener posteriores consecuencias (p.ej. aumento o generación de dormiciones).

Para las unidades de conservación debe decidirse el modelo de mantenimiento posterior, en función de su tolerancia al proceso estándar (deseccación y conservación en frío). Las especies que no soportan la desecación (p. ej. las bellotas de especies del género *Quercus*) deben someterse a procedimientos especiales, diferentes de los aquí indicados. Por el contrario, la mayoría de las especies de la flora mediterránea, y particularmente las terrestres, parecen responder bien al citado proceso estándar.

### 5.3 Deseccación de las semillas: fundamentos y procesos

El fundamento de las técnicas de conservación de semillas en la mayoría de especies de países de clima templado es la capacidad de éstas para mantenerse en una prolongada fase de letargo en condiciones de escasa humedad, tanto ambiental como interna. La tolerancia a la desecación en condiciones naturales o inducidas artificialmente está

ligada a las propiedades del protoplasma de las células. Para poder afrontar la deshidratación, los tejidos celulares deben ser capaces de limitar o reparar los daños sufridos y mantener su integridad fisiológica durante el periodo en el que el tejido está seco (BACCHETTA *et al.*, 2008).

La morfología y fisiología de las semillas son elementos característicos de cada especie, y aunque en la mayoría de casos científicamente documentados la desecación permite alargar su longevidad, también existen circunstancias -p. ej. especies de ambientes húmedos o permanentemente inundados, de climas tropicales, etc.- en las que la pérdida de humedad sea una mala estrategia vital. Es por ello que los especialistas suelen considerar una escala que va desde el comportamiento ortodoxo al heterodoxo de las semillas frente a la desecación, detallado en el recuadro adjunto.

El proceso de desecación que se describe más adelante constituye un protocolo estandarizado que puede aplicarse a la mayoría de semillas ortodoxas. A cambio el tratamiento de las heterodoxas y semiortodoxas es



Comparación entre una semilla fresca (abajo) y desecada (arriba) de *Ruscus aculeatus*.

Ficha de trabajo en formato electrónico que se almacena en la base de datos BDBGFSV

### FICHA DE CARACTERIZACIÓN

LOTE

TAXON

FECHA

#### DESCRIPCIÓN DE LA UNIDAD DE CONSERVACIÓN

Unidad de conservación:  
Dimensiones (mm × mm):  
Color:

#### ANÁLISIS DE PUREZA

Peso bruto muestra (g)

Peso neto muestra (g)

Peso otras materias (g)

GRADO DE PUREZA (%)

Valor medio peso 100  
semillas (g)

Nº aprox. semillas

Repeticiones peso 100  
semillas (g)

<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>

#### ENSAYO DE VIABILIDAD CON TETRAZOLIO

Fecha inicio

Fecha final

VIABILIDAD

Repeticiones		1	2	3	4	TOTAL	TOTAL
Nº semillas VIABLES	Totalmente teñidas	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	Teñido partes vitales	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
	No teñida pero sana	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
Nº semillas NO VIABLES	No teñida vacía	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	No teñida podrida	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
	No teñida atrofiada, defectuosa	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	

#### PRUEBA DE CORTE

Fecha

VIABILIDAD

Repeticiones	1	2	3	TOTAL	TOTAL
Nº semillas sana	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Nº semillas no sanas	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
Nº semillas vacías	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	

#### OBSERVACIONES

### Tolerancia de las semillas a la deshidratación

En base a la respuesta frente a la deshidratación las semillas son clasificadas en dos categorías:

**Semillas ortodoxas:** también llamadas ‘de larga vida’, son aquellas tolerantes a la deshidratación, capaces de conservar la viabilidad después de alcanzar niveles muy bajos en el contenido de humedad interna (en ocasiones por debajo del 5%), muy inferior a los que se alcanzan bajo condiciones naturales; soportan así también la congelación.

**Semillas recalcitrantes o heterodoxas:** sensibles a la desecación, pierden la viabilidad cuando se desecan significativamente respecto al contenido de humedad presente en el momento de la diseminación (en muchos casos por debajo del 30%); no toleran la congelación.

Muchas de las semillas recalcitrantes están contenidas en frutos carnosos, con contenidos altos de humedad (50-70%) en su madurez fisiológica, tienen tamaños seminales mayores y embriones menores que las ortodoxas, y suelen carecer de dormiciones u otros procesos que ralenticen su metabolismo. También se encuentra en este grupo gran parte de las plantas acuáticas, y en particular los hidrófitos.



Nenúfar (*Nymphaea alba*), ejemplo de planta con semillas recalcitrantes o heterodoxas.

Existen algunas especies que muestran un comportamiento intermedio entre ambas categorías, denominadas “**semillas intermedias**” (DICKIE & PRITCHARD, 2002) o **semiortodoxas**. Estas semillas soportan mejor la deshidratación que las recalcitrantes, pero peor en comparación con las ortodoxas. En general las semillas de especies clasificadas en esta categoría intermedia no toleran temperaturas por debajo de 0 °C, y solo pueden deshidratarse hasta alcanzar contenidos del 10- 20% (HONG *et al.*, 1998).

particularmente complejo, y en muchos casos se carece de experiencia previa o no existe literatura de consulta sobre géneros o especies botánicas concretas. Al menos, en las semillas semiortodoxas puede abarcarse en muchos casos parte del proceso de desecación tal y como se ha descrito, pero sin alcanzar niveles excesivos de deshidratación. Por el contrario, las semillas de otras especies solo pueden mantenerse en medio hidratado y sin acercarse al punto de congelación, tal y como ocurre con algunas plantas acuáticas. Normalmente las semillas heterodoxas tienen una vida breve, y al no detener sus procesos vitales generan subproductos químicos o gaseosos –p. ej. CO<sub>2</sub>- que provocan la autotoxicidad en los lotes de germoplasma, por lo que deben ponerse en germinación en cuanto se recolectan o tras un periodo de tiempo muy breve. Como alternativa de conservación hasta la utilización de las semillas heterodoxas se pueden enterrar en un medio húmedo (fibra de coco a 0 °C y humedad ambiental elevada).

Es importante no confundir la tolerancia a la desecación/ congelación con las **dormiciones** -ver más adelante el apartado sobre letargos, en el capítulo sobre los ensayos de germinación-, que a su vez pueden ser inducidas secundariamente por estos procedimientos cuando se emplean en los bancos de germoplasma (BASKIN & BASKIN, 1998, 2000, 2004). En ocasiones, al enfrentarse al trabajo con especies sobre las que no existen experiencias previas, es fácil caer en interpretaciones erróneas, considerando como semillas recalcitrantes las de especies que lo que realmente exhiben son letargos prolongados por culpa de las propias técnicas de conservación. En ambos casos el comportamiento externo es similar, pero cuando se trata de dormiciones no se produce una degeneración morfológica del germoplasma, mientras que en las verdaderas especies recalcitrantes se producen daños irreversibles o incluso la destrucción del embrión, lo que puede determinarse mediante las correspondientes pruebas químicas o anatómicas.

La dormición es un proceso endógeno de la semilla (BRADBEER, 1988; BASKIN & BASKIN, 1998), que en muchos casos responde a estrategias adaptativas precisas desarrolladas por selección natural. Se trata de mecanismos, usualmente químicos, que retrasan o ralentizan el inicio de la germinación. La evolución vegetal ha favorecido en muchos casos como estrategia completa para toda una especie o población; en otros casos, es muy probable que la producción seminal de una planta posea, como mecanismo de seguridad, una pequeña fracción de semillas que se desvían de la norma general del comportamiento germinativo de sus semillas hermanas, y que a diferencia de aquéllas pueden ser más exitosas ante nuevas condiciones ambientales, adversas para el resto de su misma población.



Cámara de deshidratación de semillas del CIEF.

## 5.4 Técnica de la deshidratación

La deshidratación de las semillas, fundamental para la gestión de las **accesiones** -muestras de semillas a conservar, independizadas en frascos o contenedores diferentes para cada una-, es un proceso que puede requerir varios meses y que precisa un conocimiento de la morfología, la anatomía y los parámetros fisiológicos relativos al desarrollo y a la madurez de la semilla. La deshidratación se efectúa en cámaras o estancias ('sequeros' o 'secaderos') a temperatura y humedad controladas (10-20 °C y 10-15% de humedad relativa), primero en bandejas y luego en recipientes herméticos con sustancias desecadoras.

En la fase inicial de secado en bandeja los niveles ambientales citados han de obtenerse artificialmente mediante acondicionadores, bombas de calor, entrada de aire ca-



Accesión de semillas preparada para su conservación a largo plazo en la colección base.

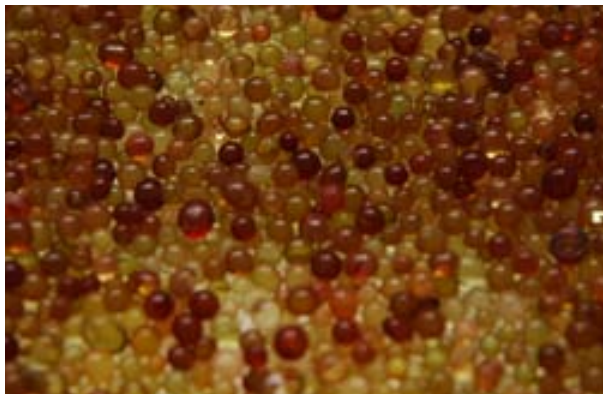
### Gel de sílice (Silicagel)

Uno de los métodos más prácticos utilizados en la deshidratación de las semillas consiste en la utilización de gel de sílice con indicador (a través del cambio de su coloración). Este compuesto químico es una forma granular y porosa no tóxica ni inflamable, de dióxido de silicio, fabricado sintéticamente a partir de silicato sódico. Su gran porosidad le convierte en un absorbente muy eficaz para reducir la humedad en atmósferas controladas cerradas. Normalmente lleva un compuesto químico indicador que se añade para indicar el contenido de humedad que ha absorbido. Algunos tipos de silicagel llevan como indicador cloruro de cobalto, compuesto tóxico, que en estado seco es de color azul y vira a rosa al absorber humedad. Existen en el mercado otros geles de sílice libres de cobalto con indicadores no tóxicos. Este compuesto, en recipientes herméticos cerrados y en contacto con las semillas permite la ultradesecación de las mismas, llegando a alcanzar valores entre el 2-5% de la humedad interna de los cotiledones y el embrión, dependiendo de la estructura de las cubiertas seminales.



liente o frío en función de la estación, etc. Durante este proceso es necesario efectuar un seguimiento continuo, ya que las distintas etapas por las que pasará la semilla pueden favorecer cambios fisiológicos que en casos extremos pueden favorecer su germinación o su dormición. Cada tipo de semilla pasa por un proceso diferente de deshidratación que, si se efectúa mal, puede comprometer la viabilidad de todo el lote, y por tanto malograr el esfuerzo que se ha desarrollado para obtenerlo y procesarlo. En la mayoría de casos, una vez se estima que el lote ya limpio ha pasado un tiempo suficiente de secado en bandeja, alcanzando niveles de humedad en torno al 10%, las semillas se colocan en recipientes herméticos similares a los que posteriormente se emplearán en el encapsulado -ver más adelante-, acompañándose de gel de sílice, que extrae progresivamente la humedad tanto del aire del recipiente como del interior de las propias unidades de conservación. A fin de evitar la mezcla de semillas y sílice, ambos quedan separados por una capa de algodón u otra sustancia estéril de fácil separación.

Hasta época reciente los bancos de germoplasma utilizaban como desecante el silicagel poliédrico azul (ver recuadro gel de sílice), que demostró tener cierto grado de toxicidad por su contenido en cobalto; por ello ha sido sustituido en los últimos años por otro de color naranja, que puede utilizarse tanto en forma poliédrica como en unidades esféricas de aproximadamente 1 mm de grosor.



Tipos de silicagel naranja: en esferas (arriba) y poliédrico (abajo).

La forma poliédrica vira del naranja al blanco al adquirir humedad y tiene en general menor poder de extracción de humedad, ya que deja más intersticios de aire en los recipientes de las semillas; se usa por ello en procedimientos iniciales o que exigen una gran cantidad de desecante.

Las esferas de silicagel son de manejo más difícil debido a su tamaño, pero su intensidad de extracción de agua intersticial de las semillas es mayor. Estas esferas pueden manejarse más fácilmente si se integran en cápsulas transparentes -de formatos similares a las que se usan como excipiente en las medicinas convencionales-, pero con envuelta celulósica no coloreada. Sin embargo, el uso del gel de sílice dentro de las cápsulas solo ha de utilizarse para la desecación y no para la conservación ya que extrae la humedad de las mismas y puede provocar que se fracturen con el manejo.

En el BGFSV se ha establecido un protocolo de colores del silicagel esférico que permite reconocer el grado de desecación de las semillas durante dicho proceso. Este tipo de silicagel vira desde el naranja hasta un verde oscuro intenso, casi negro, a medida que adquiere humedad.

En los recipientes de vidrio con semillas, el silicagel puede virar rápidamente en los primeros días, pero a medida que se ha ido extrayendo la humedad y reponiendo el contenido con nuevas cápsulas de gel de sílice, el virado se hace progresivamente más leve. En función de las especies y de la humedad inicial de las semillas, el proceso completo desde el inicio del desecado en bandejas hasta la obtención de una accesión herméticamente cerrada -fase de encapsulado- donde el gel de sílice ya no cambia de color suele durar de 1 a 3 meses.



Viales de semillas con silicagel en diferentes grados de virado e hidratación.

Cápsulas con esferas de silicagel naranja. >





**6**

**CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA**



## 6 CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA

< Accesiones del Banco de Germoplasma.

### 6.1 Fundamentos de la conservación: reglas de Harrington

El principio básico para la conservación de las semillas a largo plazo es la limitación de los cambios químicos que son originados por el metabolismo o los procesos de envejecimiento inherentes en cada ser vivo. De acuerdo con las reglas de Harrington (HARRINGTON, 1972; JUSTICE & BASS, 1978) existe una relación exponencial entre la longevidad de las semillas, la temperatura y la humedad de almacenamiento, de manera que el tiempo de supervivencia de una semilla se duplica por cada reducción de 5 °C en la temperatura y de un 1% en el contenido de humedad interna. Según este modelo, las semillas ortodoxas conservadas a bajas temperaturas y con bajos contenidos de humedad se mantienen viables durante cientos e incluso

miles de años. Sin embargo, ELLIS *et al.* (1990) y VERTUCCI & ROOS (1990) han mostrado que existen límites a los efectos beneficiosos de la desecación sobre la longevidad y que estos límites dependen de la composición química de la semilla. También se ha comprobado que, en contra de lo establecido por las reglas de Harrington, los efectos de la temperatura y el contenido de humedad no son independientes (VERTUCCI & ROOS, 1993). En cualquier caso un uso apropiado de estos factores, con temperaturas entre 5 y -20 °C, y un contenido de humedad entre el 3-7% aseguran una larga longevidad seminal para la mayoría de especies ortodoxas conocidas (FAO, 1994).

### 6.2 Encapsulado para almacenamiento

Cada accesión es una muestra de semillas adecuadamente preparada para su conservación a corto o largo plazo, en condiciones que aseguren la mínima pérdida posible de viabilidad. Después de la fase de deshidratación, las semillas son encapsuladas en contenedores herméticos capaces de garantizar durante largo tiempo la preservación del germoplasma (CHIN, 1994; IRIONDO & PÉREZ-GARCÍA, 1999; GÓMEZ-CAMPO, 2001, 2002, 2006). Los tipos más usuales de contenedores son sobres de aluminio, botes de cristal con tipos de cierre adecuados, tubos de cristal cerrados a la llama, ampollas, viales de vidrio o botellas de cristal Pyrex. Dichos recipientes, además de las semillas, contendrán usualmente silicagel, al igual que se ha explicado para el proceso de deshidratación, pero en este caso su función no será tanto la de incrementar la desecación, que ya ha alcanzado niveles suficientes, sino la de



Preparación de accesiones de semillas para su conservación en cámaras frigoríficas a baja temperatura.

avisar del mantenimiento de la adecuada hermeticidad. El virado del silicagel en una muestra que ya ha superado un proceso complejo de desecación como el antes descrito, indica que el recipiente no es suficientemente hermético y debe sustituirse por otro. En consecuencia, en la mayoría de bancos de germoplasma se opta por emplear contenedores de vidrio u otros materiales transparentes, que permiten ver directamente el estado del silicagel. Los trabajos de GÓMEZ-CAMPO (2002, 2006) han permitido testar la efectividad de los distintos tipos de recipientes, materiales, mecanismos de cierre, etc. Las ampollas de vidrio cerradas a la llama son probablemente los envases más adecuados para el almacenamiento de las semillas en colecciones base, destinadas a la conservación del germoplasma por tiempo indefinido. Este sistema tiende a denominarse ‘anaerobio’, porque el proceso de cierre de las ampollas a la llama arrastra gran parte del aire existente en el recipiente; por el contrario, el resto de procedimientos suelen denominarse ‘aerobios’, ya que se conserva mayor cantidad de aire en el recipiente, aún cuando se extraiga el máximo posible de humedad. Otra opción, últimamente muy extendida, es el uso de viales de cristal transparente (IRIONDO, 2001; GÓMEZ-CAMPO, 1987, 2002, 2006).



Diversos tipos y tamaños de contenedores utilizados en el Banco de Germoplasma del CIEF para la conservación de semillas.

La tipología y tamaño de los contenedores de semillas ha de ser proporcional a la dimensión de las semillas o frutos y, en una situación óptima, cada accesión debería contener una cantidad de semillas suficiente para englobar un grado representativo de la variabilidad genética de la población de la que proviene. En el banco de germoplasma dependiente del CIEF y CIP se utilizan distintos modelos previstos respectivamente para semillas de diferentes dimensiones. Para la colección base la unidad estándar son viales de vidrio muy similares a los que tradicionalmente se han utilizado para contener antibióticos inyectables, utilizándose además un sistema de cierre hermético idéntico a aquellos. Para la colección activa se utilizan frascos de vidrio cerrados con rosca tipo PILFER.

### 6.3 Colecciones de semillas

Una vez encapsuladas las semillas en contenedores adecuados formando las correspondientes accesiones, éstas pasan a formar parte de dos tipos de colecciones: **activa**, para uso a corto o medio plazo, y **base**, para conservación a muy largo plazo (ver recuadro). En función del tamaño de las colecciones, éstas pueden disponerse en neveras o congeladores convencionales, o bien en cámaras frigoríficas de gran tamaño. En ambos casos deben estar dotados de adecuados mecanismos de seguridad adicional, p. ej. grupos electrógenos para sustitución de la fuente de energía, que han de revisarse regularmente.



Cámara de conservación de semillas a -18 °C del Banco de Germoplasma del CIEF.

### Colecciones de semillas

**-Colección activa**, conservada a temperatura entre 0 y 10 °C. Está constituida por accesiones de semillas que son utilizadas en pocos años para las actividades *in situ* (reforzamiento de poblaciones, trabajos de restauración, reintroducciones, etc.), *ex situ* (multiplicación, intercambios de *Index Seminum*, etc.), o para el desarrollo de tests y diferentes análisis de laboratorio. En las instalaciones del CIEF se conserva el material entre 0 y 4 °C y se destinan a esta colección las semillas con previsión de uso de hasta 15 años.

**-Colección base**, conservada en cámaras frías a temperaturas de -18 °C o inferior (IPBGR, 1985) y destinada a la conservación de semillas a muy largo plazo. Con estas accesiones se efectúan solamente los controles periódicos, cada 5-10 años. En el caso del CIEF la cámara de la colección base se abre una sola vez al año, por el tiempo necesario para introducir nuevas muestras y extraer las que deben someterse a testado periódico.

Las colecciones base de los bancos de germoplasma son auténticas 'Arcas de Noé', destinadas a asegurar la provisión de semillas si fallara cualquier otro mecanismo de conservación, por lo que usualmente están integradas por aquellas muestras que exhiben mayor grado de germinación y mejor representatividad de la diversidad de la población original. Dado que las colecciones han de ser sometidas a tests regulares de viabilidad de sus muestras, éstas deben seguir normas precisas de ordenación e identificación, y a menudo debe planificarse el espacio disponible del frigorífico o cámara contenedora.

### 6.4 Factores a controlar en las colecciones de germoplasma

El principal factor que asegura la conservación a largo plazo es la desecación (GÓMEZ-CAMPO, 2002, 2006), en tanto la disminución de temperatura constituye un elemento adicional pero no tan estrictamente necesario para alargar la vida de las accesiones. Las causas más

frecuentes de la destrucción de las semillas durante su almacenamiento son tanto internas (agotamiento de sus reservas y factores relacionados con la estructura de la cubierta y el grado de madurez), como especialmente los daños provocados por agentes externos, tales como el incremento de humedad, temperatura y contenido de oxígeno. La luz también puede causar daños a algunas especies durante la manipulación de las muestras que se extraen de los bancos de germoplasma.

Independientemente de las condiciones de almacenamiento utilizadas, para la viabilidad y el contenido de humedad deben realizarse periódicamente controles de las muestras, mediante ensayos de germinación y/o viabilidad cada 5-10 años como máximo. Estos plazos suelen reducirse en el caso de colecciones activas. Además, debe revisarse regularmente el color del gel de sílice comprobando que no vire y que en consecuencia las accesiones se mantienen en adecuadas condiciones de hermeticidad. En las colecciones activas los trabajos de revisión visual de las accesiones pueden realizarse con gran periodicidad -cada 1 o 2 meses-, mientras en las colecciones base suelen reducirse a una única vez al año, empleando pocos minutos en cada revisión, ya que la apertura de las cámaras congeladoras hace ascender rápidamente la temperatura.



Semillas de *Silene hifacensis* dañadas por hongos.

### 6.5 El Banco de Germoplasma del CIEF-CIP

Las unidades de producción de flora silvestre del SENB aseguran su actividad mediante la conservación de suficientes muestras de semillas de especies protegidas del Decreto 70/2009 a través de sendas instalaciones de colecciones activas en el CIP (frigorífico convencional) y CIEF (área específica dentro de la cámara de conservación del Banc de Llavors Forestals de la Generalitat Valenciana).

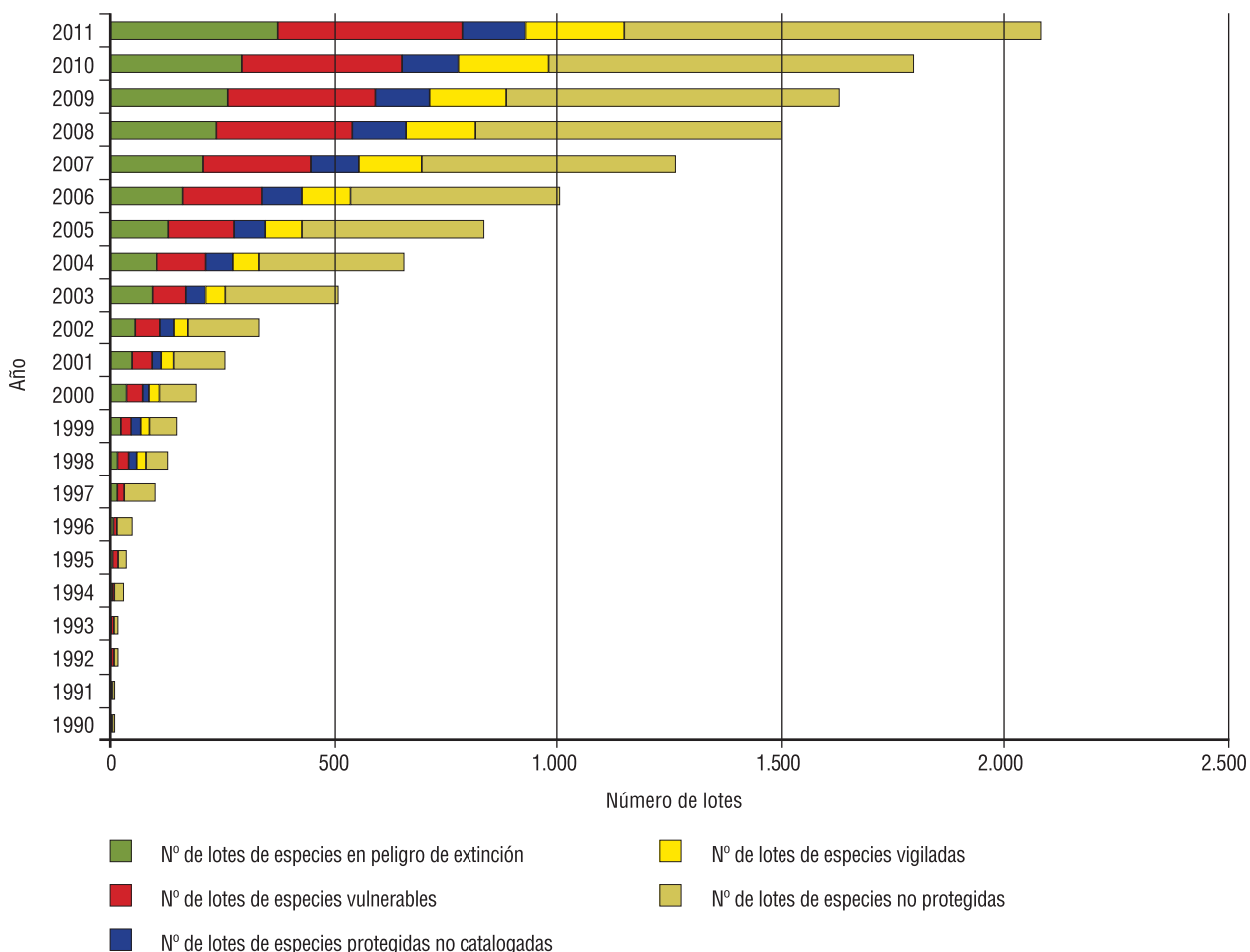


Figura 2. Número de lotes de las dos colecciones del Banco de Germoplasma sitas en el CIEF clasificadas por su grado de protección según el Catálogo de Especies de Flora Amenazada de la Comunitat Valenciana (Decreto 70/2009).

Además, con menor relevancia, como copia de seguridad de parte de las accesiones que se conservan en el Jardí Botànic de la Universitat de València, el CIEF dispone de la colección base ya citada en apartados precedentes, conservada a -18 °C. En los últimos años, gracias al apoyo de diferentes fondos comunitarios (LIFE, FEOGA y actualmente FEADER) se recolecta en torno a 1 millón de semillas de unas 100 especies vegetales anualmente. En el caso del CIEF, donde al trabajar con flora terrestre es más fácil la

conservación de especies de semillas ortodoxas, la suma de sus dos colecciones cuenta con más de 2.000 accesiones, que en conjunto superan los 4 millones de semillas, y que representan a poblaciones de más de 450 especies silvestres valencianas (Fig. 2). Actualmente más del 60% de las especies terrestres del CVEFA están representadas en el Banco de Germoplasma, y dicha proporción es aún mayor para las plantas en peligro de extinción, de las que se poseen accesiones del 70% de las especies

### El Banco de Germoplasma CIEF + CIP y red Natura 2000

Natura 2000 es la red de espacios naturales europeos que gozan de sistemas de protección preventiva, definidos desde 1992 por la Directiva de Hábitats (92/43/CEE) de la Comisión Europea, y fijados en nuestro país a través de la Ley 42/2007 de Patrimonio Natural y Biodiversidad (BOE núm. 299, de 14 de diciembre de 2007). En torno al 80% de las especies representadas en las colecciones activas de semillas del SENB, corresponden a plantas que viven en hábitats prioritarios de la Directiva 92/43/CEE y cuyo destino preferente es la posterior plantación en actividades de manejo de los Lugares de Interés Comunitario que componen la red Natura 2000.





7

ELABORACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE GERMINACIÓN





## 7 ELABORACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE GERMINACIÓN

< *Kernera saxatilis* subsp. *boissieri*.

La obtención de **protocolos de germinación** es un elemento sustancial en el proceso de conservación de las especies amenazadas, ya que permite obtener un procedimiento susceptible de repetición futura con suficientes garantías de éxito para la obtención de nuevas plantas. Las diferentes pruebas a que se someten los lotes de semillas reciben el nombre de **ensayos de germinación**. En una primera fase es fácil que las primeras semillas con las que se trabaja para una especie dada se sometan a una **prueba preliminar**, no sistematizada, pero si la calidad y cantidad de la accesión lo permite habrá de acometerse uno o más **tests de germinación**, con procedimientos estandarizados que se describen más adelante.



Batería de cámaras germinadoras del Banco de Germoplasma del CIEF.

### 7.1 Fase preliminar: aclimatación de la accesión y desinfección

Los ensayos de germinación realizados en el laboratorio siguen unas pautas que dependen del taxon objeto de estudio. Todo ensayo, ya sea 'preensayo' preliminar o definitivo, comienza con la selección de una muestra



Desinfección de semillas. En la foto inferior semillas de *Genista umbellata* imbiéndose previamente pretratadas con ácido.

de semillas tomada al azar del total de una accesión. A menudo es necesario dejar destapada la muestra una vez abierto el recipiente, a fin de que las semillas se adapten progresivamente a la temperatura y humedad ambiental. A continuación son sumergidas en agua destilada durante un determinado tiempo, usualmente corto, suficiente para el embebido en humedad pero no tan extenso en el tiempo como para causar la asfixia del embrión. Este paso puede ir precedido de una desinfección. El tipo de desinfección se hace en función del tamaño y morfología de la semilla, y la mayoría de las veces consiste en sumergirlas en una disolución de hipoclorito de sodio  $\text{NaClO}$  1-3% (lejía) durante 10-15 minutos, o bien en ácido clorhídrico muy diluido,  $\text{HCl}$  2%; el tiempo de la desinfección puede ser superior -hasta 30 minutos- en los casos en que se prevé una mayor concentración de patógenos, o cuando tras un preensayo con las concentraciones y tiempos habituales se observa que siguen apareciendo infecciones en la incubación de las muestras. En el caso de semillas muy pequeñas -sobre todo las menores de 1 mm-, se imbiben en peróxido de hidrógeno,  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Después de la desinfección hay que lavar la muestra abundantemente con agua destilada.

## 7.2 Viabilidad de las semillas

Antes de acometer la puesta en germinación es conveniente desarrollar pruebas que nos indiquen la viabilidad de las semillas (FREELAND, 1976). Una de las más fáciles de ejecutar en cualquier laboratorio es la **prueba del corte**, que consiste en observar directamente el aspecto que presenta el interior de las semillas a las que previa-

mente se les ha efectuado un corte longitudinal. Es en esencia similar a la que ya se indicó en el apartado sobre recolección, pero fiarse exclusivamente de aquella es a menudo insuficiente porque la semilla puede haberse visto afectada por el procesamiento y las propias técnicas de conservación de las accesiones, reduciendo su vitalidad e incluso eliminando definitivamente su posibilidad de germinación. Otra de las opciones más empleadas en el estudio de la viabilidad es la **prueba de tetrazolio**. Se trata de una experiencia colorimétrica que utiliza una solución al 1% de 2,3,5-trifenil tetrazolio cloruro o bromuro a pH 6.5-7.5 (ISTA, 2006), fotosensible, transparente y soluble en agua.

El tetrazolio permite obtener una medida directa de la actividad mitocondrial, ya que los enzimas deshidrogenasas celulares situados en las mitocondrias reducen las sales incoloras del tetrazolio a formosán, un compuesto de color rosa-rojizo. Así, la intensidad de color está directamente relacionada con la actividad de las deshidrogenasas de la mitocondria de cada célula. De esta forma los tejidos muertos no presentan actividad y no se observa la tinción de los mismos en la prueba. Se ha comprobado que la prueba de tetrazolio tiende a sobreestimar la viabilidad aproximadamente un 10% por encima del valor que se obtiene con las pruebas de germinación (PIOTTO & DI NOI, 2001). Ello no implica necesariamente un fallo de la técnica, sino la tendencia a que no todas las semillas teóricamente viables de una muestra lleguen a germinar, en parte por razones que no suelen computarse con carácter habitual y pueden ser difíciles de detectar: problemas genéticos, teratologías del embrión, etc.



Semillas de *Fraxinus angustifolia* tintadas en la prueba del tetrazolio.

### 7.3 Factores ambientales e inhibiciones de la germinación

Para que de la semilla madura se obtenga una plántula es necesario que el material que la compone posea unas características endógenas adecuadas -que haya conservado su poder germinativo, posea la adecuada madurez morfológica y fisiológica, y que se hayan desbloqueado las inhibiciones internas si se poseían- y coincidan unas condiciones exógenas dependientes de la fisiología de cada especie. El agua, el oxígeno, la temperatura y la luz son los cuatro factores exógenos más estrechamente vinculados en el proceso de germinación de las semillas. Para los dos primeros suelen requerirse valores altos y bajos respectivamente en la mayoría de las especies, pero en el caso de temperatura y luz es donde existen más divergencias comportamentales, y de hecho son aquellos con los que se pueden establecer más combinaciones en las cámaras germinadoras convencionales con las que se acometerá el ensayo. Se distinguen hasta cuatro tipos de reacción cualitativa a la luz en el proceso germinativo: inhibición, retraso, indiferencia y promoción. Además, tanto la intensidad lumínica como el ciclo -simulación del efecto de día y noche en la germinadora- también pueden matizar el comportamiento. En lo referente a la temperatura, importan igualmente tanto los rangos como los ciclos. En el caso de los factores achacables a ecofisiología de las propias semillas, las **inhibiciones** o limitaciones a la germinación se detectan cuando a pesar de facilitarles unas condiciones teóricamente óptimas para su germinación, ésta no acontece o se retrasa extraordinariamente. Las principales causas son:

- **inhibiciones tegumentarias:** se deben a envolturas impermeables al agua, al oxígeno o a la presencia de inhibidores químicos. Presentan gran resistencia mecánica u otros factores que constituyen obstáculos a la emergencia de la radícula, e incluso al metabolismo del embrión pero por causas achacables a la cubierta seminal. Como ya se



Semillas germinando de *Lupinus mariae-josephae*, un ejemplo de especie con inhibiciones tegumentarias.

ha indicado, son los procesos que deben vencerse gracias a la escarificación.

- **letargos o dormiciones:** son causadas por procesos del metabolismo interno de la semilla de cada especie. Pueden darse distintos tipos: embrionario o primario, letargo secundario, y letargo inducido por otras condiciones desfavorables a la germinación de una especie concreta. La mayoría de letargos pueden desactivarse mediante los pretratamientos, o en ocasiones por el propio tratamiento -combinaciones concretas de temperatura y luz- en la germinadora.

El objetivo de un protocolo de germinación es determinar las condiciones experimentales óptimas para conocer el potencial de germinación máximo de un lote de semillas. Tales condiciones obviamente pueden diferir de modo notable de aquéllas que las mismas semillas tendrían que experimentar para germinar en el medio natural. Sin embargo, y en sentido inverso, en los tests de germinación es habitual que se someta a las semillas a procesos que imitan aquellos factores naturales que pueden favorecer el proceso germinativo en función de rasgos ecológicos o biológicos concretos de la especie, y que en gran parte coinciden con los 'pretratamientos' indicados más abajo. Además, desde el punto de vista de la posterior gestión de las especies amenazadas, es importante recordar que los citados tests pueden forzar la germinación de semillas que pudieran no llegar a hacerlo nunca en el medio natural y que, en consecuencia, el cultivo posterior de las plantas obtenidas puede expresar formas de variabilidad superiores a las del propio hábitat.

### 7.4 Pretratamientos

En muchos casos las semillas habrán de someterse a sistemas que permitan o bien romper las dormiciones endógenas, o bien debilitar las barreras físicas que imponen las testas o cubiertas que poseen; es lo que se denominan '**pretratamientos**', ya que se realizan antes de someter el lote al verdadero test de germinación. Los pretratamientos más habituales son las **escarificaciones** (debilitaciones de las cubiertas seminales) y el uso de **hormonas**. Las escarificaciones se realizan cuando las semillas presentan testas duras, y consisten en conseguir aumentar la permeabilidad de las mismas, permitiendo que accedan al embrión niveles suficientes de humedad y gases como para provocar su germinación. Para ello se emplean diferentes métodos:

- **escarificación mecánica** mediante lijado, por el que se consigue microfisurar la testa.

- **escarificación física:**

- **térmica húmeda**, mediante el escaldado de las semillas con agua en ebullición ( $100 \pm 1$  °C), o bien sumergiendo las semillas en agua en ebullición y dejándolas hasta su enfriamiento.

- **térmica seca**, mediante la incubación de las semillas en estufa a temperaturas entre 105-115 °C durante un tiempo determinado.

- **escarificación química**, mediante diluciones de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a diferentes concentraciones durante tiempos determinados. Este procedimiento se utiliza con frecuencia en semillas de frutos carnosos endozoócoros, cuya dispersión natural implica el paso por el tubo digestivo de la fauna silvestre, y que por tanto están adaptadas a resistir e incluso a necesitar una escarificación ácida.

- **hormonas**, mediante la aplicación de diferentes hormonas (p. ej. giberelinas) en diferentes concentraciones (100-400 ppm) que potencian la germinación.

Cuando lo que se necesita es romper las dormiciones endógenas de las semillas o cuando es necesario que el embrión aumente de tamaño, se recurre a procesos de **estratificación**, donde el tratamiento está enfocado a desbloquear procesos físico-químicos internos del embrión y/o los cotiledones. La **estratificación fría** es un proceso mediante el cual se mantienen las semillas mezcladas con turba humedecida a bajas temperaturas (2-4 °C) o en cultivo de agar cuando las semillas son pequeñas y en oscuridad durante periodos variables de tiempo que van desde los 30 a los 120 días. De este modo, se simulan las condiciones ambientales que ocurren en el hábitat natural donde viven muchas especies de alta montaña o fuertemente continentales, que acostumbran a exigir estos periodos fríos para poder germinar. En algunos casos este proceso va precedido de una **estratificación cálida**,



Contenedores en la cámara del Banco de Germoplasma del CIEF para la estratificación de semillas en frío.

similar a la anterior pero manteniendo las semillas de 1 a 3 meses a temperaturas alternantes 30-20 °C día/noche. En ocasiones se suele efectuar una desinfección con lejía antes y después de este proceso de estratificación.

## 7.5 Test de germinación

El test de germinación responde a un diseño experimental en el que se usan por defecto protocolos estandarizados por la International Seed Testing Association (ISTA, 2006), con 4 réplicas de semillas mantenidas en placas de Petri en germinadoras, incubadoras o fitotrones. El número de réplicas puede ser superior cuando así se requiere para diseños experimentales concretos, o cuando se desea testar el efecto de más de un factor incidente en la germinación (p. ej. el de diferentes rangos de temperatura) concentraciones salinas del medio, etc. Existe un amplio elenco comercial de germinadoras, aunque lo deseable es que al menos se puedan programar para mantener ciclos concretos de iluminación -en horas al día y/o en intensidad lumínica- y temperatura. La siembra de las semillas se efectúa en placas de Petri sobre papel de filtro FILTER-LAB, y riego con agua destilada hasta saturación, evitando el encharcamiento. En ocasiones se emplea como medio de cultivo el agar-agar, a distintas concentraciones (usualmente 0,6, 1 o 2%). El número de semillas empleadas en cada ensayo es variable y depende en última instancia de la cantidad de semillas de la que se disponga. Si es posible se realizan 4 réplicas de 100 semillas cada una, y en todo caso el mínimo recomendado



Siembra de semillas en placas de Petri (arriba) y semillas germinadas de *Helianthemum edetanum* (abajo).

es de 25 semillas por placa. Las siembras se deben realizar siempre en condiciones de asepsia en cámaras de flujo laminar. Las placas de Petri con las semillas se precintan con tiras de parafilm, se etiquetan convenientemente y se llevan desde la cámara de flujo a la cámara de germinación. Las condiciones de cultivo en cada ensayo de germinación se indican en cada ficha de trazabilidad.

Usualmente se considera germinada una semilla cuando su radícula emergida supera la longitud de 1 mm. La lectura de la germinación es diaria, anotando los datos observados y retirándose inmediatamente las semillas germinadas de cada placa, que se pasan en un medio intermedio para la posterior fase de cultivo. La extracción de las plántulas reduce el riesgo de contaminación, y sobre todo el de autointoxicación de toda la muestra, ya que sus procesos de respiración perjudicarían al resto de semillas aún no germinadas, facilitándoles la entrada en períodos de dormición secundaria o afectando a los embriones por toxicidad del CO<sub>2</sub> o de metabolitos concretos. En muchos casos la repetición de pruebas con diferentes lotes permite diferenciar las plantas germinadas del propio día de observación y del anterior, en función de la longitud de la radícula, lo que permite hacer lecturas cada 2 días infiriendo las germinaciones del día intermedio. Si hay contaminación fúngica en la placa, se recomienda cambiar las semillas a una nueva

placa, o en caso necesario reiniciar toda la experiencia. El tiempo del ensayo es de al menos de 30 días para pruebas estándar (ISTA, 2006), pero en algunos casos las semillas exhiben procesos adicionales de dormición y los ensayos deben prolongarse durante 2 o más meses.

Los resultados obtenidos en un test de germinación se expresan mediante el cálculo de determinados parámetros básicos de germinación:

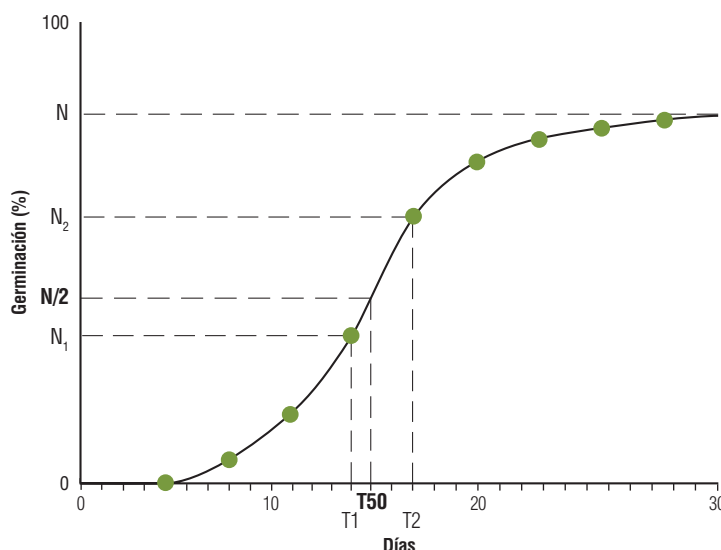
- **porcentaje de germinación ( $\bar{X} \pm S.D.$ ).** Expresa el porcentaje de germinación total al final del ensayo.
- **duración del ensayo.** Tiempo en días que se han mantenido las placas de Petri en la cámara germinadora. La duración del ensayo no incluye el tiempo de pretratamiento. Ante el desconocimiento del comportamiento germinativo de algunas especies, se suele mantener el ensayo siempre que se prevea posibilidad de que germinen las semillas.
- **tiempo de inicio.** Número de días transcurrido desde la siembra hasta que germina la primera semilla en la placa de Petri.
- **T50 ( $\bar{X} \pm S.D.$ ).** Tiempo en días necesario para alcanzar el 50% del valor de la germinación final.

### Velocidad de germinación T50

El valor T50 indica el tiempo necesario en días para obtener el 50% de la capacidad germinativa, es decir, la mitad del total de semillas germinadas al final del ensayo. Este valor informa sobre la velocidad de germinación y se calcula por extrapolación lineal a partir de los dos valores de germinación más próximos a la media de germinación. La representación de los valores acumulados de germinación frecuentemente presentan una forma sigmoidea en la que el valor del parámetro T50 se sitúa próximo al punto de inflexión de la curva. El valor se calcula mediante la fórmula:

$$T50 = T1 + \left[ \frac{(N + 1) / 2 - N_1}{N_2 - N_1} \right] \times (T2 - T1)$$

Donde N = % final de semillas germinadas; N<sub>1</sub> = % de semillas germinadas inmediatamente antes de N/2; N<sub>2</sub> = % de semillas germinadas inmediatamente después de N/2; T1 = número de días que corresponden a N<sub>1</sub>; T2 = número de días que corresponden a N<sub>2</sub>; T50 = número de días que corresponden a N/2.



- **otros parámetros de interés.** Existen otros parámetros que permiten hacer inferencias posteriores sobre la fisiología de la germinación, tales como el índice de vigor, retardo germinativo, tiempo medio de germinación, valor pico, valor de germinación, T25, T75, uniformidad (T75 -T25), asimetría, velocidad de Kotowsky, etc. (BROWN & MAYER, 1988; RANAL & GARCÍA DE SANTANA, 2006)

Cuando se considera que ha finalizado el ensayo de germinación, se evalúan las semillas que han quedado en la placa de Petri sin germinar, y entre ellas se diferencia entre frescas, vacías, duras y muertas, mediante la prueba de corte o un test de tetrazolio.

## 7.6 Etapas del test de germinación

Los pasos que se siguen en el test, y que sirven para elaborar un protocolo de germinación son los siguientes:

1°. **Búsqueda bibliográfica** para encontrar información sobre otras experiencias en germinación con la misma especie o especies relacionadas, o bien de morfología seminal similar o de hábitos ecológicos parecidos.

2°. **Preensayo.** Es una prueba de germinación en blanco, usualmente sin pretratamientos salvo el embebido y desarrollado en condiciones estándar, aparentemente ideales en base a la ecología de la especie. Se utilizan las indicaciones ya dadas de cantidad de semilla -25 a 100 por placa-, de duración -mínimo 30 días-, y como medio de cultivo papel de filtro, procurando en este último caso que si se emplea agar-agar esta primera prueba se haga con la concentración más baja posible, para reducir la interferencia con el proceso de germinación. La temperatura se elige de acuerdo con las recomendaciones bibliográficas o se toma como referencia la del hábitat de la especie en la época óptima de germinación natural -en nuestro caso otoño o primavera-. Se recomiendan preensayos en el rango de los 5 °C (para las especies altimontanas) a los 25 °C (para las de zonas insoladas de menor altitud). En lo referente a la luz, el preensayo suelen realizarse con fotoperíodo, sometiendo las placas en la germinadora a un ciclo diario de 12 horas de iluminación y otras 12 de oscuridad. Algunos casos concretos pueden requerir condiciones de oscuridad total, recubriendo totalmente las placas con papel de aluminio u otras cubiertas opacas como por ejemplo el caso de especies dunares o que

puedan enterrarse de manera natural. Los recuentos de las germinaciones se realizan bajo luz verde, cuya longitud de onda no afecta al fitocromo.

3° **Análisis posterior al preensayo.** Cuando los preensayos han finalizado, es necesario evaluar los resultados: porcentaje de germinación, T50 y clasificación de las semillas del ensayo que no han germinado en viables y no viables. En el caso de que se obtengan bajos porcentajes de germinación en relación a lo esperado, deben estimarse las causas más probables, a fin de acometer en su caso las escarificaciones o estratificaciones necesarias, o plantear un diseño experimental para testar las condiciones lumínicas y térmicas óptimas para los ensayos definitivos posteriores. Si al menos parte de las semillas han muerto por causa fúngica o bacteriana, deberá acometerse una desinfección más severa antes de iniciar la siguiente fase. A los efectos técnicos de la compilación de resultados, la desinfección suele estar considerada como un pretratamiento.

4°. **Ensayos de germinación.** Se sigue un procedimiento similar al del preensayo, pero habiendo pretratado las semillas en caso necesario y desarrollando en su caso experiencias paralelas a diferentes temperaturas, ciclos de iluminación, etc. Usualmente los ensayos, y en consecuencia la información que puede extraerse de ellos, estará condicionada por la cantidad de semilla viable de la accesión, que ha de proveer de suficiente número de unidades para la cantidad de réplicas necesarias, en función del diseño experimental que se adopte.



Interior de la germinadora con muestras de semillas en proceso de evaluación de su viabilidad.

## 7.7 Protocolos de germinación

El protocolo de germinación es un documento -o la suma de su información en una base de datos- que contiene al menos los siguientes resultados, precedidos por los datos de trazabilidad del material utilizado: 1) **caracterización y estudio morfológico de la semillas**, incluyendo sus envolturas, secciones transversal y longitudinal y tipo y posición del embrión, conforme a clasificaciones estandarizadas; 2) **resultado de la prueba de corte y/o del tetrazolio**, si se han realizado; 3) **reseña de las dimensiones** de las muestras; 4) **resultados del test patrón** o preensayo; 5) **reseña analítica** de la información que se extrae del preensayo (posibles inhibiciones, dormiciones,

etc.); 6) en caso necesario, **ensayos bajo diferentes condiciones** controladas (luz, temperatura, salinidad u otros elementos del medio, adición de hormonas u otros reguladores, etc.) hasta obtener una selección de condiciones óptimas, en las que se obtienen los mayores valores de germinación; y 7) **ensayos sucesivos** con accesiones de orígenes y años diferentes (Fig. 3).

En resumen los protocolos deben incluir información como la que se aporta, ya sintetizada, en las fichas que más adelante componen el grueso del presente libro. Aunque el protocolo de germinación puede considerarse cerrado tras obtener una información que permite prever su repetibilidad de resultados en condiciones de ensayo

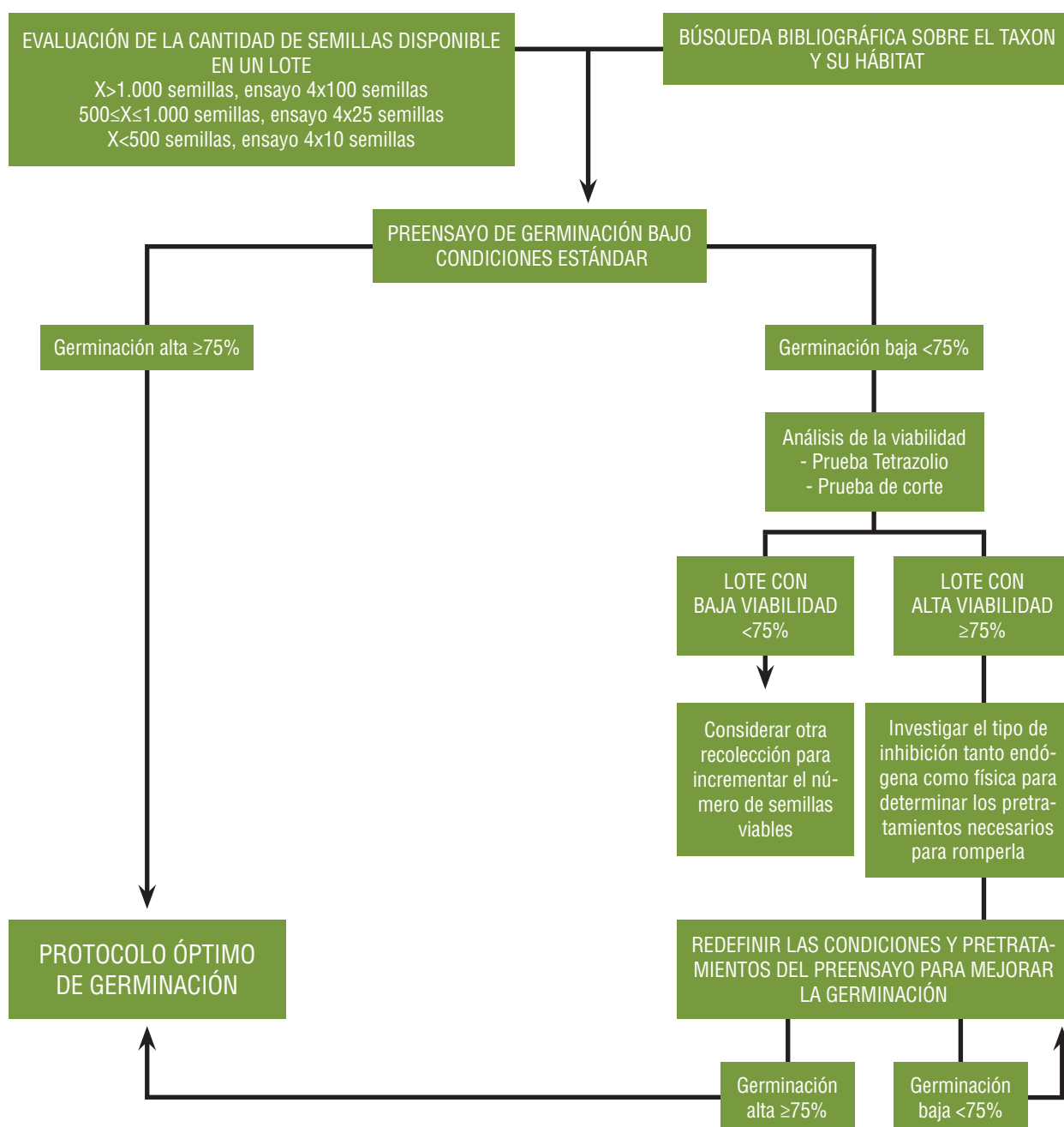


Figura 3. Método y pasos de la cadena de trabajo para establecer el protocolo de germinación óptimo.

similares, en el caso de las especies amenazadas ha de considerarse usualmente como un archivo abierto al que habrán de añadirse sucesivamente nuevos resultados, tal y como se van localizando nuevas poblaciones, se comprueba el efecto de factores estocásticos adversos, etc.

Se considera como **protocolo óptimo** aquel que consigue expresar la mayor germinación posible de las semillas objeto de estudio, con unos niveles mínimos proporcionados a cada finalidad de trabajo. En la mayoría de especies agrarias y forestales suelen considerarse óptimos los protocolos en los que se alcanzan niveles muy altos de germinación, del 80-90% o superiores. En el caso de es-



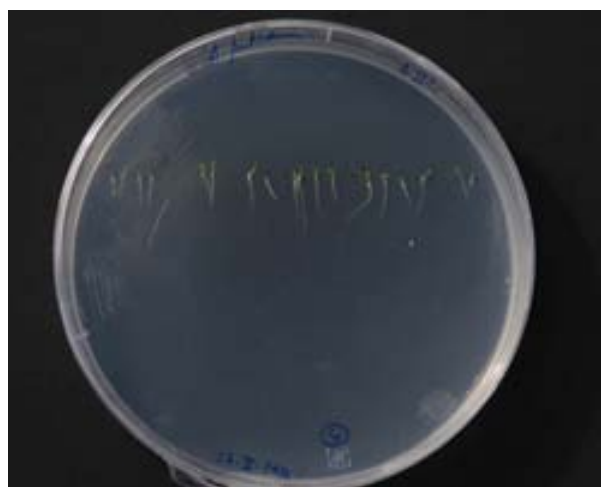
Ejemplos de germinación de semillas. Arriba: germinadora del CIEF; centro: semillas en germinación de *Biarum dispar*; abajo: germinación de *Ferula loscosii*.

pecies amenazadas tienden a establecerse líneas de corte inferiores. Según los criterios utilizados por el BGFSV-CIEF, se considera que se ha alcanzado un protocolo óptimo para una determinada accesión de semillas cuando ésta alcanza al menos el 75% de germinación.

## 7.8 Nuevas técnicas empleadas

Para finalizar este apartado sobre la germinación conviene indicar que en los últimos años se han introducido novedosas metodologías que se encuentran aún en fase experimental, y que en algunos casos se han empezado a ensayar en las instalaciones del CIEF. Entre ellas pueden destacarse la técnica de cloruro de litio (LiCl), que consiste en mantener las semillas en una atmósfera controlada de humedad y temperatura. Este método acelera e incrementa sustancialmente las tasas de germinación en algunas especies (NEWTON *et al.*, 2009).

Ulteriormente, se está ensayando para algunas especies de la flora valenciana la crioconservación de semillas (preservación a muy baja temperatura en torno a -196 °C) (BENSON, 1999; CARDOSO *et al.*, 2000; RAO, 2004; BUNN *et al.*, 2007; ROWNTREE & RAMSAY, 2009; ENGELMANN, 2011).



Placas de Petri verticales con semillas en germinación para evaluar la tasa de crecimiento de las radículas. Arriba: semillas germinadas de *Anarrhinum fruticosum*; abajo: germinación de *Silene cambessedesii*.





8

CULTIVO Y VIVERIZACIÓN



## 8 CULTIVO Y VIVERIZACIÓN

< Cultivo de *Limonium dufourii*.

### 8.1 Precisiones previas sobre el cultivo de especies amenazadas

El cultivo de especies vegetales amenazadas se rige por técnicas muy similares a las que se utilizan en viveros convencionales para la producción de plantas agrícolas, forestales u ornamentales, pero con ciertas particularidades. Adquieren por ello especial relieve algunos aspectos, entre los que debe destacarse la conveniencia de producir plantas suficientemente adaptables a las condiciones ambientales parecidas al lugar de plantación, y con una adecuada probabilidad de supervivencia. A diferencia de la producción de planta forestal, la de vegetales amenazados se centra a menudo en plantas de pequeño tamaño, que parten de semillas usualmente menores. En muchas ocasiones debe desistirse del empleo de sustratos, contenedores, etc. de cultivo habituales para plantas que se producen para otros usos, convergiendo selectivamente con aquéllos que resultan más apropiados en cada caso.

Como norma general, la planta deberá someterse a un proceso de endurecimiento que le permita adquirir las garantías de supervivencia en el medio tras su implantación, y a fases peculiares (p. ej. el autorrepicado aéreo) que en parte condicionan a su vez el tipo de instalaciones a utilizar. Además, la tecnología existente en cada instalación de cultivo determina la posibilidad de permanencia y desarrollo de la planta en cada una de ellas, p. ej. los invernaderos dotados de acondicionamiento automatizado de la temperatura y humedad del aire mediante 'cooling' pueden permitir el cultivo de plantas incluso en pleno ve-

rano, momento en el que en ausencia de tales dotaciones se alcanzarían temperaturas solo aptas para especies particularmente adaptadas al exceso de calor.

Otro aspecto relevante del cultivo y el mantenimiento en vivero de las especies amenazadas es que en muchos ca-



Interior de uno de los invernaderos del CIEF con producción de planta de especies amenazadas.

sos se carece de antecedentes para especies o géneros similares, lo que aconseja que las actividades se desarrollen en lo posible conforme a un diseño experimental, que permita el testado comparado de técnicas de propagación, eficacia de los tipos de sustrato, optimización del tipo de contenedor, etc., así como su posible efecto a medio plazo sobre las plantas cuando éstas se instalen en campo. Quienes se encargan de la producción han de consultar además regularmente trabajos realizados con otras especies autóctonas y con planta forestal en otros territorios, ya que de ellos pueden extraerse orientaciones que son útiles para la puesta en cultivo de una nueva especie aún no ensayada. Entre otros, además de trabajos desarrollados en la Comunitat Valenciana (BRU & DESCALZO, 1998; GARCÍA-FAYOS, 2001), son de especial interés los que pueden aplicarse a dicho territorio por corresponder a áreas cercanas y de clima similar (ALOMAR & GARCÍA-DELGADO, 2000; COSTA & SÁNCHEZ, 2001; NAVARRO & GÁVEZ, 2001; PIOTTO & DI NOI, 2001; SÁNCHEZ & *et al.*, 2003; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ & FRANCO, 2008).

## 8.2 Particularidades para el cultivo de planta acuática

En los siguientes apartados se detallan los elementos y técnicas asociadas al cultivo de las plantas amenazadas, precisando que la mayoría de lo expuesto es de aplicación a las plantas terrestres y a las de ribera. En el caso de los hidrófitos -plantas flotantes o sumergidas- son muchas las particulares características que requiere su cultivo tanto por su forma de vida (BARRAT-SEGRETIAN,

1996; CAFFREY *et al.*, 1999) como por las condiciones a las que habrán de adaptarse en su introducción al medio natural (SMART *et al.*, 1998; CROFTS, 2002). La principal diferencia entre el cultivo de plantas acuáticas y terrestres, reside en que en las primeras gran parte del riego no se realiza por el sistema convencional (aspersión o difusión, de arriba abajo), sino por inundación (de abajo a arriba), simulando en instalaciones adecuadas un régimen similar al que las plantas han de experimentar en el medio natural, pero evitando el estancamiento excesivo del agua (SEBASTIÁN & *et al.*, 2008). En paralelo la inundación diaria hace innecesario el empleo de ahuecantes del sustrato -perlita, vermiculita, fibra de coco, etc., sin los cuales los sustratos para planta terrestre se apelmazarían si no se someten a riego diario.

Para el caso peculiar de los hidrófitos, las plantas han de cultivarse en tanques, acuarios u otros recipientes de gran capacidad. Conviene reseñar también que algunas especies de hábitat terrestre necesitan pasar una fase inicial de vida acuática, como ocurre con los pteridófitos (helechos y colas de caballo), y que en consecuencia puede ser necesaria la combinación de técnicas de ambas formas de cultivo.

Al acometer el trabajo con plantas acuáticas se aconseja la búsqueda y revisión de trabajos especializados, ya que en algunos casos pueden requerir técnicas especiales como el control de los niveles de nutrientes y microorganismos, que no son tan relevantes en el caso de la viverización de plantas terrestres (SMART & DICK, 1999; SMART & *et al.*, 2005).



Cultivo de planta acuática en el CIP de El Palmar.

### 8.3 Tipos de contenedores de cultivo

El tipo de contenedor utilizado en el cultivo determina en buena medida la calidad de la planta producida (LANDIS *et al.*, 1990). Es importante la elección de un contenedor adecuado según las necesidades de cada especie, teniendo simultáneamente en cuenta las particulares condiciones de destino final de la planta. Por ejemplo, en el caso de plantas rupícolas deberá utilizarse necesariamente contenedores de muy pequeño volumen, apropiados para la posterior implantación de los ejemplares en grietas o huecos de las rocas. Para seleccionar el tipo y tamaño del contenedor de cultivo es necesario tener en cuenta los siguientes factores:

- **el volumen del envase.** La capacidad del envase debe estar acorde con el tamaño, la edad de la planta y las necesidades de crecimiento en vivero de cada especie objeto de trabajo. Un volumen menor del necesario repercute en la calidad de la planta al limitar el crecimiento. Un volumen mayor del necesario genera gastos innecesarios de sustrato, mayor coste de los envases, disponibilidad de espacios mayores y mayor mano de obra y esfuerzo para su manipulación. Conviene aspirar a que la planta tenga una gran producción de raíces respecto al volumen del envase, por lo que el tamaño de éste no debe ser excesivo

- **sistemas de direccionamiento de raíces.** Hay que seleccionar envases con el interior estriado o acanalado, con sistemas de antiespiralización radicular con el fin de evitar que las raíces se enrosquen. Los envases de bordes interiores lisos son además poco aconsejables porque la extracción de la planta suele ser más costosa a la hora de la plantación en campo.



Diferentes tipos de bandejas QP utilizadas en el cultivo de flora amenazada en el CIEF.

- **autorrepicado.** Consiste en evitar que la raíz principal no exceda del fondo del envase, momento en el que de modo natural se enrosca, dando lugar a una peor calidad de planta para su introducción al medio natural. El autorrepicado se consigue cultivando en envases que presentan una abertura en el fondo y suspendidos en el aire, de manera que se permite la salida al exterior de las raíces que se secarán en contacto con el exterior. Para el cultivo se utilizan mesas con fondo de rejilla metálica, o se buscan sistemas para que las raíces no contacten directamente con el suelo o fondos planos (p. ej., disponiendo los contenedores sobre un piso de alvéolos invertidos). El autorrepicado puede tener menor relevancia en las plantas acuáticas, dado que la mayoría de ellas son monocotiledóneas con raíces fasciculadas, o bien plantas bulbosas o rizomatosas que en muchos casos pueden plantarse cuando están en fase de letargo.

Los contenedores más utilizados en el cultivo de las especies que este trabajo recoge son **bandejas QP** de diferentes tamaños. Estas bandejas están hechas de poliestireno (PS), un material sintético ecológico, que se caracteriza por su reciclabilidad. La calidad del material y su buen uso permiten ser utilizadas durante un periodo de 10 años. Las bandejas QP y contenedores más utilizados se indican en la Tabla 1.

### 8.4 Tipos de sustrato

Un medio de cultivo adecuado es de gran importancia para asegurar una buena calidad de la planta producida y su posterior adecuación al medio natural (LANDIS *et al.*, 1990). El sustrato suele estar compuesto por una mezcla de componentes con distintos tamaño y características físico-químicas. Uno o más de ellos hace de base (tierra, turba, arena y/o mezclas entre ellas) y otros se utilizan como componentes para evitar el apelmazamiento y la anoxia radicular (perlita, vermiculita, fibra de coco, etc.). Estos componentes se mezclan en diferentes proporciones para conseguir, en la medida de lo posible, un sustrato similar o que simule al que tienen las especies en su hábitat natural.

Es muy importante que cualquier tipo de sustrato sea poroso y con buen drenaje, y que además estas características se mantengan en función de una frecuencia razonable de riegos en vivero. En el caso de planta terrestre, los sustratos más adelante indicados permiten un ahorro considerable de agua cuando se cultivan plantas en mesas metálicas de rejilla (para facilitar el autorrepicado), permitiendo riegos regulares cada 2-3 días. Los modelos de mezclas de sustrato utilizados en la propagación de las plantas son:

Tabla 1. Características de los diferentes tipos de bandejas y contenedores utilizados en los viveros del CIEF.

BANDEJAS				
Tipo	Nº alveolos	Volumen (cc)	Medida alveolo (mm)	Medida bandeja (mm)
QP 96T	96	75	38 × 38 × 78	335 × 515
QP E 40	40	250	62 × 62 × 90	360 × 560
QP 35T	35	200	50 × 50 × 115	280 × 360
QP 12T / 18-T / 10	12	650 / 430	75 × 77 × 180 / 100	280 × 360
QP 6T / 20-T / 12	6	1.600 / 1.100	110 × 110 × 200 / 120	280 × 360

CONTENEDORES		
Tipo de contenedores	Volumen (litros)	Medidas Ø interior x altura (cm)
CT 12	1,1	12 × 12
CT 18	4,0	18 × 17
CT 40	35,0	40 × 35

- **estándar**: mezcla de turba, fibra de coco y vermiculita con la proporción 3:2:1.

- para **semilleros**: mezcla de turba y fibra de coco con la proporción 1:1.

- para **esquejes**: mezcla de turba (o fibra de coco) y arena con la proporción 1:1.

Los sustratos más empleados son aquellos que llevan incorporados una proporción importante de turba, un material orgánico y fósil formado por restos vegetales en proceso de carbonificación, generada usualmente en sitios pantanosos. La turba se clasifica en dos grupos: rubias y negras. Las **turbas rubias** son de carácter muy ácido (aprox. pH = 3,5) tienen un mayor contenido en materia orgánica y el proceso de descomposición orgánica está menos desarrollado; usualmente proceden de turberas naturales de musgos esfagnales. Por el contrario, las **turbas negras** están más mineralizadas, su contenido en materia orgánica es menor y su pH más elevado.

Entre los componentes adicionales, en su mayoría con función ahuecante que incrementa la porosidad del sustrato, destacan los siguientes:

- **perlita**. Roca volcánica silíceo, estéril, inerte y ligera. Mezclada con los sustratos a razón de un 30% a un 50% mejora la aireación y constituye un buen drenaje.

- **vermiculita**. Mica expandida e hinchada. Se utiliza para cubrir las semillas una vez sembradas en semilleros, de esta manera se consigue mantener la temperatura y la higrometría óptima. Mezclada con los sustratos, incorporándose de un 20% a un



Diferentes tipos de componentes y sustratos. De arriba a abajo:

- perlita.
- vermiculita.
- fibra de coco.
- osmocote. Abono de liberación lenta.
- sustrato de turba: fibra de coco: perlita.

40%, proporciona aireación e hidratación. Retiene más agua y menos aire que la perlita, al tiempo que su rugosidad permite una mejor adherencia de las raicillas secundarias, manteniendo más unido todo el contenido de la maceta.

- **fibra de coco.** Sustrato compuesto de fibras multicelulares obtenido como subproducto industrial del cultivo de diversas especies de palmeras, y que tienen como principales componentes la celulosa y el leño. Se utiliza mezclada con los sustratos o en determinadas ocasiones como sustituto de la turba. Tiene una alta capacidad de retención de agua.

- **arena.** Su adición favorece el drenaje y la aireación, dotando a menudo al sustrato de una textura franca más acorde con el sitio de plantación definitivo.

- **arcilla.** Favorece la humificación de la materia orgánica, y en algunos casos puede ser recomendable para reducir el exceso de aireado del sustrato.

Lo indicado son componentes estandarizados, en los que existen escasas diferencias en función de los proveedores industriales, y que son usualmente estériles salvo en el caso de la fibra de coco. Dicha fibra es un sustrato de difícil sustitución, pero a menudo no está esterilizado en origen y puede contener como impurezas semillas de especies, que a su vez pueden actuar como nuevas plantas invasoras. Si se van a utilizar cantidades reducidas es recomendable recurrir a algún sistema de esterilización, siempre que no dañe las propiedades físicas del sustrato y no vaya a repercutir posteriormente de modo negativo sobre las plantas a cultivar. Otra opción que puede recomendarse es someterlo a un lavado mediante irrigación por períodos prolongados (p. ej. reservando en el vivero un área con contenedores sin planta, rellenos solo de fibra de coco, que se someten durante meses a las mismas condiciones de riego que los que sí que contienen plantas en crecimiento). De este modo se produce un proceso de hidratación continuada de la fibra de coco y el lavado de sustancias alelopáticas que contiene -aquellas que impiden o retardan la germinación de semillas de plantas anuales-, obligando a germinar a esas semillas alóctonas que contuviera como impurezas, que pueden erradicarse manualmente.

Además de estos componentes básicos de un sustrato, el medio de cultivo puede enriquecerse con diferentes tipos de abonos. Existe una gran gama de productos en el mercado que pueden ser utilizados para mejorar el rendimiento del cultivo; entre ellos, los más utilizados están:

- **abonos orgánicos.** Incluye muchos abonos tra-

dicionales como estiércoles, guano, gallinaza, compost, extractos húmicos, restos de cosechas, pinocha, paja, cascarilla de arroz, triturados de animales, etc.

- **fertilizantes químicos.** Se incluyen aquí los fertilizantes minerales convencionales (fosfatos, nitratos, etc.), organominerales, fertilizantes de lenta liberación, abonos foliares, correctores de carencias, etc.

- **estimulantes.** Aminoácidos, extractos de algas, etc.

- **enmiendas minerales.** Minerales correctores del pH (azufre, calcio, etc.), correctores de salinidad, etc.

En ocasiones es conveniente que el diseño de los sustratos a emplear incluya réplicas en las que se empleen diferentes concentraciones de tierra proveniente de la zona de origen de la especie a cultivar, ya que ésta puede requerir para su desarrollo de la presencia de micorrizas, bacterias simbióticas u otros microorganismos ausentes de los sustratos convencionales. En tales casos debe controlarse la emergencia de plantas cuyas semillas estuvieran ya contenidas en esa tierra empleada para el cultivo.



Especie invasora de *Tamarix* procedente de las impurezas de la fibra de coco en un cultivo de *Juniperus thurifera*.

## 8.5 Tipos de propagación

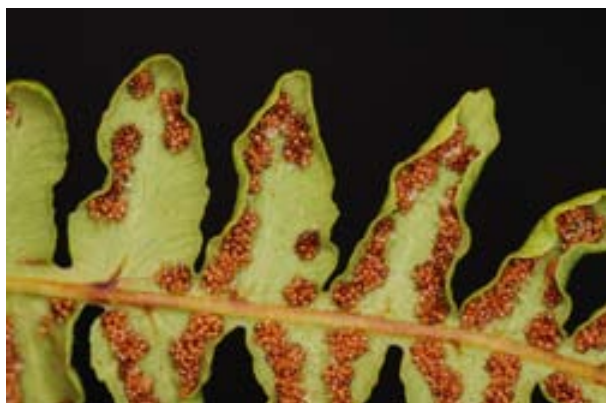
Las especies vegetales pueden propagarse por vía sexual (semillas), asexual (elementos de propagación vegetativa) o una mezcla de ambas. En el caso de los helechos las esporas que se siembran son realmente una fase asexual, que posteriormente durante el cultivo generarán prótalos que producen las verdaderas esporas sexuales y éstas a su vez los verdaderos talos.

En general la forma óptima de propagación de las especies es la sexual, lo que solemos asociar a las semillas o esporas, aunque debe tenerse en cuenta que las semillas de algunas especies se generan sin intervención de los procesos habituales de la reproducción sexual (p. ej. en el caso de las especies apomícticas) y, por tanto, la producción de dichos propágulos no implica necesariamente una diversificación genética de la especie.

### Propagación sexual; inicio del cultivo a partir de semillas

Salvo algunas excepciones, la reproducción sexual es la vía más utilizada por las plantas para la persistencia de las poblaciones y por tanto de la especie a lo largo del tiempo. Simultáneamente, el proceso reproductivo sexual es el que suele asegurar el mantenimiento y diversificación del acervo genético, por lo que siempre que sea posible es recomendable el empleo de semillas frente a otras formas de propagación vegetativa, salvo cuando ésta última es la única vía posible.

Como se ha visto en capítulos precedentes, las pruebas de germinación son una fuente de obtención de nuevas plantas a partir de las semillas, pero su uso se restringe obviamente a una etapa inicial del trabajo con las especies. En la mayoría de los casos, una vez se ha determinado el pretratamiento o tratamiento adecuados para estimular la germinación, lo que se realizan son siembras propiamente dichas, para lo que se utilizan envases **semilleros**



Soros de *Thelypteris palustris*.

o contenedores de cultivo. Los semilleros son utilizados para especies que necesitan un periodo de estratificación (en cámaras frías, germinadoras, fitotrones, etc.) o bien para aquellas que tienen una germinación escalonada, de modo que cada nueva planta se puede trasladar a otro contenedor -'repicado'- a medida que van alcanzando un tamaño óptimo en el semillero. En el caso de especies con semillas de tamaño muy pequeño y/o que presentan una fase de plántula tan delicada que no resiste el repicado, es aconsejable cultivarlas directamente en contenedores, sembrándose directamente en grupos de 1-3 o más semillas por alvéolo.

La relativa escasez de producción de semillas de la mayoría de especies amenazadas, y el hecho de que convenga realizar sus plantaciones siguiendo marcos de diseño experimental previo, obliga a prever la cantidad de planta en potencia a partir de un lote de semilla. Dicha cantidad depende sobre todo de:

- la **pureza** del lote (P): fracción neta del peso de semillas viables respecto del total, medida en tanto por uno.
- **número de semillas** del lote (N): expresado generalmente como el número de semillas que hay en un gramo. Para obtener este valor se calcula el peso medio de 4 grupos de 100 semillas cada uno.
- **porcentaje de germinación** (G): capacidad de germinar que presentan las semillas que contienen un lote bajo determinadas condiciones ambientales.
- **factores externos** previsibles derivados de las instalaciones y de la propia experiencia de cultivo (p. ej. densidad con la que se siembran en el semillero, resistencia de las plántulas al repicado, época en que se inicia el cultivo, etc). Otros imprevisibles de origen externo, cambios climáticos bruscos, fallos en programadores u otros elementos mecanizados del vivero, etc.



Bandeja semillero de *Silene hifacensis*.

El **éxito de producción** es la relación entre el número de plantas finalmente producidas frente al número plántulas que comenzaron inicialmente el desarrollo, y normalmente es difícil de prever incluso desestimando el efecto de factores adversos estocásticos. Es por ello que habitualmente, cuando el lote lo permite, se tiende a sembrar un número de semillas superior al que teóricamente sería necesario por la mera combinación de los valores P, N y G.

La época óptima de siembra está determinada por las condiciones biológicas y fenológicas de la especie, el tipo de letargo de las semillas, sus exigencias de condiciones ambientales para la germinación y el lugar elegido para realizar el cultivo. La mayoría de las especies del territorio valenciano, sobre todo en media y baja montaña, suelen germinar en sus hábitats naturales durante el otoño, presentando a veces una segunda fase de germinación primaveral. Muchas de estas condiciones pueden suplirse

por las de laboratorio y vivero germinando las semillas en otros momentos, pero en tal caso debe preverse el desacoplamiento del ritmo de desarrollo de la planta respecto a factores negativos como podredumbres, mayor labilidad al ataque de insectos, etc., que también suelen seguir un ciclo estacional.

La profundidad de siembra varía con la clase y tamaño de las semillas y en menor medida con el tipo de sustrato empleado en el cultivo. Cuando la semilla requiere condiciones de luminosidad para su germinación, éstas se deben sembrar a poca profundidad. No obstante, como regla general las siembra se suele realizar a una profundidad de aproximadamente 2-3 veces el diámetro seminal. Debe calibrarse de antemano el efecto del sistema de riego, ya que se corre el riesgo de que las semillas sembradas muy cerca de la superficie sean removidas y desplazadas por el impacto de las gotas de agua, malogrando el esfuerzo de la siembra.



Repicado de plántulas de *Gypsophila bermejoi* de bandeja semillero a alveolo.

En cuanto a la densidad de siembra, si ésta se realiza de manera uniforme por la bandeja semillero o alveolo disminuye la incidencia de ahogamiento de las plántulas por competencia y aumenta el vigor y tamaño de las mismas, evitando al tiempo la obtención de plantas etioladas -con tallos demasiado alargados e inconsistentes- y con sistemas radiculares pequeños. En general valores diarios entre 15 y 25 °C resultan óptimos para la germinación e inicio del desarrollo en mayoría de especies que requieren temperaturas cálidas, y se aconseja entre 10 y 20 °C, para aquellas especies que requieren temperaturas más bajas.

Tras la germinación, el repicado de las plántulas se realiza a partir de la emergencia de los cotiledones y una vez que las plántulas han desarrollado las primeras 3-4 hojas. El trasplante se realiza a contenedores escogidos según las necesidades del cultivo y el destino final que tendrá la planta (plantaciones en campo, ajardinamiento ecoeducativo, colecciones o huertos productores, etc.). El proceso de repicado es una fase crítica en el cultivo y es necesario hacerlo cuidadosamente ya que una mala manipulación puede dañar las raíces y/o retardar el crecimiento de las plantas.

Las condiciones ambientales (luminosidad, exposición al sol, humedad, etc.) bajo las que deben crecer los plantones dependen de cada especie (LANDIS *et al.*, 1989, 1998), lo que obliga a sectorizar los invernaderos, agrupando las plantas en función de condiciones específicas susceptibles de regulación (p. ej. zonas de luz o sombra, mayor o menor apertura de los difusores de riego, etc.). Cuando el destino de la planta producida es su implantación en el medio natural, siempre que el tamaño alcanzado por las



plantas sea el adecuado -usualmente tras varios meses de desarrollo- se trasladan los ejemplares a condiciones de aclimatación inicial. En ese momento, si el cultivo se estaba desarrollando en invernadero (moderada temperatura y riego controlado), debe procederse a su traslado a umbráculos para comenzar la fase de **endurecimiento**. Esta nueva fase implica cierta ralentización en el crecimiento de los ejemplares y, en consecuencia, una acumulación de carbohidratos, preparando a la planta para resistir futuras condiciones adversas. Posteriormente, es probable que muchas especies deban cultivarse un tiempo en exterior, o trasladarse a instalaciones en sitios más cercanos a los de plantación definitiva.

### **Extensión de conceptos para la micropropagación, mediante germinación y cultivo *in vitro***

Con las adecuadas diferencias tecnológicas, los procesos aquí explicados para las fases iniciales de desarrollo pueden aplicarse al caso de las técnicas de cultivo *in vitro*. Aunque genéricamente asociemos la micropropagación a la producción clonal, la tecnología del cultivo en tubos de vidrio con sustratos gelificados se puede aplicar sin recurrir a la clonación, de modo que cada tubo de ensayo haga la función de una maceta para un único ejemplar, conservando la diversidad genética entre las plantas. Esta



Plantones de *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* producidos *in vitro* y repicados en macetas.

técnica se emplea en semillas de especies que poseen dimensiones tan reducidas que resultan imposibles de manejar por métodos convencionales, y sobre todo en el caso de las orquídeas. En este último caso, las semillas carecen de endospermo y necesitan asociarse en su germinación a micorrizas, problemas que son suplidos por el medio de cultivo utilizado por las técnicas *in vitro*. Una vez germinadas y alcanzada una fase adecuada de desarrollo, los ejemplares deberán pasar progresivamente a invernadero y umbráculo, pero las primeras fases de aclimatación son más complejas, ya que la planta debe enfrentarse a un cambio mucho más severo que las producidas por métodos convencionales. Usualmente los plantones producidos *in vitro* se trasladan a macetas de turba prensada 'jiffy pots', aislándose en el invernadero con bolsas de plástico que mantienen una atmósfera cerrada. Posteriormente debe procederse a la apertura progresiva de la bolsa durante varios días y, en último término, a la plantación de los contenedores de turba en macetas convencionales o alvéolos de tamaño superior. Un ejemplo de todo este proceso puede verse en el trabajo de ARREGUI et al. (1993) sobre la micropropagación de una de las principales plantas amenazadas valencianas: *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis*.

### **Propagación asexual.**

Al menos en teoría, cada una de las células de un vegetal posee la capacidad de multiplicarse, de diferenciarse y generar un nuevo individuo idéntico al original, carácter conocido como 'totipotencia celular', tal y como formularon en 1838 Schwann y Schleiden. La multiplicación se produce sobre todo a partir de meristemos o partes vegetativas de la planta, como yemas, raíces o tallos. Las yemas pueden alojarse o quedar protegidas por estructuras de resistencia (bulbos, rizomas, etc.) que en muchas especies entran en una fase de letargo durante parte del año.

En el trabajo con especies amenazadas conviene recordar que, siempre que sea factible, debe aspirarse a obtener la máxima diversidad genética en el 'pool' de plantas de cultivo y esta máxima también es de aplicación a la propagación vegetativa. Ello implica un esfuerzo adicional a la hora de la recolección y preparación del material ya que lo óptimo es reunir una o pocas muestras de cada planta donante, del máximo número posible de ejemplares de la población original.

Los principales métodos de propagación vegetativa son:

- **división de mata.** Consiste en separar la mata o cepellón de plantas cespitosas o con numerosas ye-

mas basales -p. ej. plantas pulvulares- en varios grupos de manera que cada uno de ellos contenga al menos un futuro vástago y sus propias raíces. Este método suele acometerse cuando la planta inicia su desarrollo vegetativo. En el caso de plantas acuáticas, el hecho de que el sustrato esté continuamente empapado favorece que la división de mata pueda realizarse también fácilmente en las plantas adultas.

- **esquejes**. Los esquejes son fragmentos de planta que se obtienen principalmente a partir de los tallos con sus respectivas yemas, las hojas o las raíces. La mayoría de los esquejes se toman del tallo y se clasifican en **internodales** -si proceden de las uniones de las hojas o nudos,- y esquejes **nodales** -si se toman a partir de la parte inferior de un nudo-. Los esquejes también pueden diferenciarse según el grado de desarrollo del tallo en:

- **tiernos**: se obtienen a partir de los nuevos brotes que desarrolla la planta, normalmente en primavera. Poseen el potencial de enraizamiento más elevado, aunque el promedio de supervivencia es más bajo, porque pueden perder agua y secarse más rápidamente. Se recomienda mantenerlos en un ambiente muy húmedo y aireado.

- **semimaduros**: los tallos son más robustos y presentan yemas desarrolladas. Se obtienen cuando se ralentiza el crecimiento de la planta, normalmente desde mediados del verano hasta el otoño-invierno.

- **leñosos**: se toman de tallos lignificados de al menos 1 año de edad. Este tipo de esqueje tarda más en enraizar, pero al ser robustos tienen la ventaja de que su pérdida de agua es inferior. A menudo se prefiere utilizar un tipo mixto, el esqueje semileñoso, donde la parte basal está ya lignificada, pero en su extremo corresponde ya a un esqueje tierno o semimaduro.

- **de yema foliar**: se preparan a partir de una pequeña porción de tallo tierno del año que porta al menos un nudo y una hoja. En este caso la hoja proporciona la energía para el enraizamiento. Este modelo es muy empleado en el cultivo de algunos tipos de plantas como las clemátides.

Para realizar con éxito el esquejado hay que seleccionar ejemplares sanos y libres de enfermedades

o efectos de plagas, y si es posible de las plantas más vigorosas y jóvenes. Una vez separados los esquejes de la planta donante se deben preparar para su cultivo rápidamente con el fin de reducir la pérdida de humedad por transpiración. Es recomendable procurarles un ambiente con temperatura controlada entre 15-20 °C, con adecuada humedad tanto ambiental como en el sustrato de cultivo. Esto se consigue en invernaderos con nebulizadores o bien cubriendo los contenedores con bolsas de plástico transparentes con el objeto de conseguir un efecto invernadero. Para favorecer el enraizamiento en plantas leñosas, se suele realizar una incisión en la parte que se introduce en el sustrato, o bien se puede aplicar hormonas de enraizamiento. Se recomienda también eliminar el ápice en desarrollo con el fin de distribuir las hormonas naturales (auxinas) hacia el resto del tallo, facilitando la formación del callo basal y a continuación la rizogénesis. En especies de enraizamiento difícil la emisión de raíces mejora si se mantiene el sustrato húmedo aireado y caliente (15-20 °C) para lo que se utilizan mesas de cultivo con resistencias térmicas, complementadas con cubiertas que evitan la disipación del calor y la humedad. El tiempo que tarda un esqueje en enraizar depende de la especie, del tipo de esqueje, de la edad de la planta donante, de la forma en la que éste se preparó y de las condiciones de humedad y temperatura de cultivo. Por lo general el tiempo necesario para enraizar y comenzar la nueva brotación vegetativa va desde 3-4 semanas en esquejes foliares hasta 5 meses en esquejes leñosos.



Esquejes de *Commicarpus africanus* semimaduros.



Cultivo de esquejes de *Frangula alnus* subsp. *baetica* bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. De arriba a abajo:

- corte realizado en la parte inferior del esqueje para facilitar la rizogénesis.
- esquejes en mesa de cultivo.
- brotación de los esquejes.
- tipo de rizogénesis obtenido.

- **separación de estolones.** Los estolones son tallos horizontales usualmente epigeos, delgados y diferentes del tallo principal, con nudos enraizantes, que pueden ser cortados e independizados de la planta madre para ser cultivados por separado -p. ej. como ocurre en diversas especies de fresas y violetas cultivadas-.

- **fragmentación de rizomas.** Los rizomas son tallos -o a veces formas particulares de raíces o cuellos de la raíz- subterráneos, a menudo horizontales, que portan yemas caulinares, y que al fragmentarse pueden dar lugar a nuevas plantas. A veces cada rizoma se ramifica dando lugar casi directamente a los nuevos fragmentos, mientras en otros casos deben separarse mediante corte, conteniendo al menos una yema.

- **acodos.** Son tallos con capacidad de emitir raíces cuando coinciden con un sustrato adecuado. De modo natural es frecuente en plantas con raíces adventicias o en las que tienen tallos principales enraizantes en los nudos -p. ej. en muchas especies de tomillos silvestres-, pero en otras especies pueden realizarse artificialmente haciendo que las ramas toquen el suelo y permanezcan en contacto con éste, o incluso procurándose mediante el embolsado de tierra alrededor de los nudos -acodo aéreo-. A menudo la emisión de raíces se puede estimular con pequeñas incisiones del tallo en el punto del acodo a las que se añade desinfectante y hormonas de enraizamiento.

- **separación de bulbos, tubérculos y cormos.** Las formas citadas son estructuras naturales de reserva y resistencia de fases desfavorables, que en muchas especies también tienen función reproductiva -dando lugar entonces a diversas nuevas unidades por cada planta madre-. La nomenclatura que se emplea para ellos es muy variable según las obras consultadas, y a menudo también se emplean nombres como tuberobulbos, pseudotubérculos, etc. En su mayoría son estructuras subterráneas, pero algunas especies también las producen en forma de bulbillos aéreos, ya sean foliares, caulinares, o sustituyendo o acompañando a las semillas -p. ej. en el caso de algunas especies de *Allium*-. Para producir nuevos ejemplares se separa cada nueva unidad reproductiva y se entierra a una profundidad de aproximadamente dos veces su diámetro. En general pueden almacenarse por periodos cortos, en oscuridad, con escasa humedad ambiental y en ausencia de fuentes de calor. Los tubérculos y las



De arriba a abajo:

- propagación vegetativa por estolones de *Ajuga pyramidalis* subsp. *meoanatha*.
- separación de bulbos de *Narcissus perez-larae*.
- bulbo de *Sternbergia colchiciflora*.

diversas formas de 'cormos' suelen constituir estructuras conjuntas de raíces con yemas durmientes y pueden fragmentarse para dar lugar a nuevos ejemplares, siempre que cada fragmento conserve al menos una yema sana.

- **injerto.** Método de propagación artificial mediante el cual una porción de la planta -el "injerto" propiamente dicho- entra en contacto y se une a otra de otra planta -"patrón o portainjerto"- de tal modo que ambas se desarrollen como un solo organismo. Existen muchos tipos de injerto (por aproximación, de púa, de hendidura, de yema, etc.). Su uso en conservación de flora amenazada es bastante restringido, ya que en muchas especies es frecuente el rechazo de injerto por el patrón, y la técnica solo puede aplicarse fácilmente en plantas leñosas.

- **cultivo *in vitro*.** Esta técnica consiste en el forzado de la proliferación celular y la posterior diferenciación de los tejidos y órganos de las plantas a partir de un fragmento -'explanto' o 'explante'- al que se proporciona en condiciones asépticas un medio de cultivo formado por macronutrientes, micronutrientes, gelificantes y diversos compuestos orgánicos -hidratos de carbono, vitaminas, aminoácidos y reguladores del crecimiento-, manteniéndose en cámaras con condiciones reguladas de luz y temperatura.

## Riego

Las condiciones de riego varían según la especie que se cultiva, y su influencia es decisiva en todo el proceso de viverización (LANDIS *et al.*, 1989). En las primeras fases de crecimiento de un vegetal, cuando todavía no se ha desarrollado el sistema radicular, el riego puede realizarse por inundación; dicho método es además el usual en el resto de fases de crecimiento para las plantas acuáticas. A partir de ese momento el riego debe realizarse de manera que se evite la desecación de la parte inferior del contenedor. Un factor importante respecto al riego es la dureza o reacción -valor de pH- del agua, ya que los niveles usuales en la mayoría del territorio valenciano se sitúan por encima del valor neutro pH = 7, generando problemas en el cultivo de especies acidófilas, que pueden exigir condiciones adicionales de drenaje en el sustrato, o la adición de quelatos de hierro. Habitualmente existe un solape entre las bandas de pH óptimas para la absorción del calcio y el hierro, de modo que la abundancia del primero bloquea la absorción del segundo, aun cuando éste sea abundante en el sustrato.

Invernadero en riego. >





**9**

**COLECCIONES DE PLANTA VIVA: HUERTOS-SEMILLERO  
Y BANCOS CLONALES**



**9 COLECCIONES DE PLANTA VIVA: HUERTOS-SEMILLERO Y BANCOS CLONALES**

< Huerto-semillero de *Silene hifacensis*.

En muchos casos, los programas de recuperación y conservación de las especies vegetales han de contemplar la posibilidad de la producción de germoplasma *ex situ* a través del cultivo y confección de colecciones mantenidas bajo condiciones controladas. A diferencia de las colecciones de exhibición, como las que suelen existir en instalaciones ecoeducativas y jardines botánicos, las aquí indicadas han de estar formadas por un amplio número de ejemplares, suficiente para recoger el máximo posible de diversidad genética original de la población o poblaciones de origen. Usualmente se recurre al establecimiento de **huertos-semillero**, formados por plantas cuya finalidad será la producción de nuevas semillas. Los modelos más típicos son los denominados **huertos de progenies**, donde el material representativo de cada población original se cultiva en lo posible por separado. Cuando se trata de material que ya ha sido obtenido en campo por vía vegetativa, al no ser posible a partir de semilla o resultar ésta

excesivamente compleja y costosa para rendir en último término resultados similares, se habla a menudo de **bancos de clones o huertos clonales** (PARDOS & GIL, 1986). En las instalaciones del SENB-CIEF se mantienen diversos huertos-semillero y bancos clonales para especies cuya producción natural de semilla es nula (p. ej. *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis*, *Narcissus perez-larae*) o muy escasa y/o baja viabilidad (*Frangula alnus* subsp. *baetica*, *Boerhavia repens*, *Kernera saxatilis* subsp. *boissieri*, *Aristolochia clematidis*, *Ajuga pyramidalis* subsp. *meonantha*, etc.), pero también para aquellas cuya recuperación puede exigir la producción de cantidades muy elevadas de semilla que no pueden obtenerse fácilmente del medio natural, como ocurre con *Silene hifacensis*, para la que deben producirse millones de unidades a fin de abastecer las siembras en roca -ya que las plantaciones están fuertemente restringidas por la escasez de hábitat disponible y la escasa viabilidad de plántulas en grietas muy estrechas.



Huerto clonal de *Frangula alnus* subsp. *baetica*.



Cultivo en exterior de *Ajuga pyramidalis* subsp. *meonantha*.

El establecimiento de huertos productores de semilla o material vegetativo con planta madre constituye un paso adicional de la viverización, para el que suele carecerse de bibliografía o antecedentes de referencia. El gestor de este tipo de colecciones de planta viva ha de tener en cuenta que las condiciones en las que se localizan los ejemplares de una especie amenazada en el medio natural a menudo no son necesariamente las más idóneas para su supervivencia, sino aquellas en las que han quedado sus últimos reductos, tras haber desaparecido en muchos casos de

hábitats óptimos. Por ello, es probable que los requerimientos de las plantas adultas en campo no sean precisamente los más adecuados para emular *ex situ*, o que incluso las plantas cultivadas muestren comportamientos que sólo aparecen cuando las plantas tienen unas condiciones inhabituales en la naturaleza -p. ej., las formas cultivadas de *Ajuga pyramidalis* subsp. *meonantha* en el CIEF muestran un vigor y un desarrollo rizomatífero muy superior al que exhiben en el medio natural-.



Huerto-semillero de *Silene hifacensis* en el CIEF.

En los proyectos de conservación *ex situ* a través de colecciones vivas, las muestras deben someterse a un modelo de continua renovación, favoreciendo la constante mezcla entre los diferentes ejemplares que formen parte de la misma población y si es posible incluyendo periódicamente nuevas plantas generadas tras nuevas germinaciones de material recolectado en campo. Ello asegura que se pierda el menor número posible de alelos, y reduce los riesgos genéticos de retrocruzamiento. En algunos casos se deben realizar por ello polinizaciones cruzadas artificiales.

### El modelo de huerto semillero para *Silene hifacensis*

*Silene hifacensis* (Caryophyllaceae) es una especie endémica íbero-balear, presente en los acantilados litorales del norte de Ibiza y cuadrante nororiental de Alicante -ver datos en la ficha correspondiente en este libro-. En el territorio valenciano la especie está catalogada en peligro de extinción y existen solo cuatro núcleos poblacionales nativos actuales, con bajo número de efectivos y separados en su mayoría por grandes distancias que impiden el flujo genético. Se trata de la única especie vegetal valenciana que dispone hasta el momento de un plan de recuperación legalmente aprobado (ANÓNIMO, 2008). El citado plan contempla entre otras acciones el establecimiento de una colección de planta viva para el abastecimiento y la producción masiva de semillas. En 2009 se inició la recolección de semillas de los ejemplares accesibles de las citadas poblaciones y el posterior cultivo bajo condiciones controladas, con un número inicial entre 25 y 75 nuevos ejemplares obtenidos de semilla de cada una de las 4 poblaciones. Cada uno de los huertos-semillero se han mantenido en ubicaciones diferentes repartidos por los viveros de los parques naturales de El Montgó (Denia, Alicante), Peñón de Ifac (Calpe, Alicante) y los viveros forestales de Santa Faç (Alicante) y del CIEF (Quart de Poblet, Valencia). La renovación de cada uno de los 4 huertos-semillero se realiza mediante una mezcla de los propios descendientes de las plantas mantenidos en vivero con otras obtenidas mediante nuevas recolecciones de semilla en las poblaciones originales. En 2011 se superó la cifra de 1,5 millones de semillas producidas que servirán para editar las siembras en acantilados cercanos al litoral en toda su área de distribución natural.

PRODUCCIÓN DE LOS HUERTOS-SEMILLEROS DE <i>SILENE HIFACENSIS</i>					
Población /Huerto	Año	Número individuos	Peso semillas (g)	Número semillas	% Germinación
Illot de la Mona	2010	4	21,693	25.501	74,5 ± 7,69
	2011		66,396	78.116	60 ± 3,27
Pessebret	2010	11	74,930	87.138	98 ± 2,3
	2011		499,707	587.892	95 ± 1,98
Cova Cendres	2010	33	3,693	4.345	74 ± 8,327
	2011		636,443	748.757	86 ± 10,07
Morro de Toix	2010	9	0,434	510	91 ± 5,03
	2011		64,733	76.157	17 ± 5,03
<b>TOTAL</b>		<b>57</b>	<b>1.368,029</b>	<b>1.608.416</b>	





**10**

**FICHAS SOBRE GERMINACIÓN Y CULTIVO DE PLANTAS AMENAZADAS**



## 10 FICHAS SOBRE GERMINACIÓN Y CULTIVO DE PLANTAS AMENAZADAS

< *Boerhavia repens*.

La información sobre resultados de germinación y cultivo de especies catalogadas valencianas se expone a continuación siguiendo un modelo de ficha para cada taxon, que se ha modificado en algunos casos particulares por el alto volumen de datos, bibliografía, etc., y que se acompaña en lo posible de una cantidad suficiente de ilustraciones. Entre las imágenes, se aporta una o más fotos de las semillas realizadas con microscopio electrónico de barrido. Los apartados que contiene cada ficha son, al menos, los siguientes.

### Información general

El nombre científico de cada especie viene acompañado, siempre en el caso de que se conozcan, de los vernáculos más estandarizados o usuales en valenciano y en castella-

no. A la hora de describir cada especie se ha considerado oportuno, más que hacer una descripción morfológica exhaustiva de la planta, aportar aquellos datos que pueden ser relevantes para el reconocimiento de la planta en campo, tipo de fruto y semillas, además de aquéllos útiles para el estudio de la germinación, tales como la ecología y la corología. Se incluye además el estado de amenaza según el Catálogo Valenciano de Especies de Flora Amenazadas y una foto descriptiva del vegetal. Se recuerda a los lectores que, para todas estas especies, existe una información general (descripción, estatus de la poblaciones, riesgos en el medio natural, etc.) de publicación reciente, el texto de AGUILELLA *et al.* (2009), con el que pueden complementar ampliamente la información de las fichas para cada taxon.

### Fenología

Se incluye una tabla con los datos fenológicos de la especie, especificando los meses de floración y fructificación.

### Descripción de las unidades de conservación

Se incluye una tabla con algunas de las características morfológicas de la unidad de conservación, bien las semillas o de los frutos. La terminología utilizada se fundamenta en las obras de MARTIN (1946), STEARN (1992), WERKER (1997) y MARTIN & BARKLEY (2000).

Para las imágenes de semillas mediante microscopía electrónica de barrido se ha utilizado el microscopio SEM FE S4100 Hitachi 10KV; las muestras se han metalizado en Sputter Coater Polanium Range, 120 segundos con oro y




Maquetación y diseño de las fichas de germinación y cultivo.

COMPOSITAE

*Achillea santolinoides* Lag.

Valencià: milenrama cotonosa  
Castellano: milenrama algodonosa

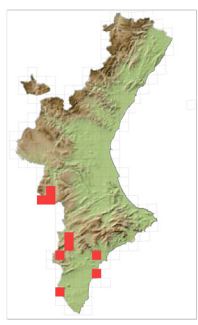


Catàleg Valencià de Espècies de Flora Amenazada

**En peligro de extinción**

**Floración** E F M A M J J A S O N D

**Fructificación** E F M A M J J A S O N D



Especie perenne rizomatosa de hasta 60 cm de altura, de color grisáceo densamente foliosa y fuertemente aromática.

Especie iberooriental que habita en zonas de arcillas o margas yesíferas en suelos temporalmente encharcados. Tolerancia a la salinidad.

En la Comunitat Valenciana queda confinada a escasos puntos de las provincias de Alicante y Valencia.

Para más información: <http://bdb.cma.gva.es/ficha.asp?id=14443>

Descripción de la unidad de conservación	
Unidad de conservación	Fruto
Dimensiones (mm × mm) (X ± S.D.)	0,43 ± 0,11 × 1,06 ± 0,03
Color	Amarillento
Estructuras exteriores	No tiene
Peso de 100 unidades (g) (X ± S.D.)	0,009 ± 0,001



**RECOLECCIÓN**

La maduración de las semillas coincide con la senescencia de la parte aérea de la planta. Se recolectan los capítulos enteros cuando éstos se muestran secos al tacto, quebradizos y se puedan separar de la planta sin apenas resistencia.

Los capítulos maduros tienden a permanecer durante semanas sobre la planta, por lo que la ventana temporal para la recolección es relativamente amplia.



Ejemplo de una de las fichas de germinación y cultivo de plantas amenazadas de este Manual.

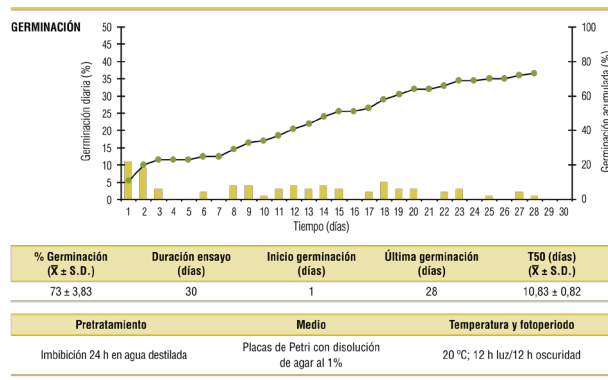
paladio. Se ha utilizado el programa de captura digital de imágenes Espirit 1.8. Tales imágenes se han realizado por técnicos del Departamento de Botánica y de la sección ME.UV del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de Valencia.

## Recolección

Se dan indicaciones y algunas recomendaciones prácticas sobre la recolección de germoplasma en campo así como de su manejo, indicando la época de recolección, método más eficaz, etc. En determinados casos, también se comenta el método de limpieza que permite obtener un mayor rendimiento de semillas o propágulos limpios respecto a la recolección bruta del material.

## Datos de germinación

Se indican datos sobre la germinación de las semillas tales como las condiciones de ensayo del protocolo, pretratamiento, tiempo de imbibición, tipo de escarificación y estratificación (tratamiento químico u hormonal, etc.) y medio de cultivo utilizado y las condiciones de cultivo mediante las cuales se han alcanzado los mejores resultados de germinación. Se muestran los resultados alcanzados en



**CULTIVO**

La propagación puede realizarse mediante semilla, por división de planta y por esquejado, obteniendo en todos los casos buenos resultados. De cada gramo de frutos limpios sembrado se pueden obtener unas 100.000 plántulas. En la producción, el mayor éxito de supervivencia se alcanza con la división de planta. El replicado constituye una fase muy crítica y debe realizarse con cuidado para no dañar las plántulas. Se emplean contenedores de tipo OP 6T/12 de 1.100 cc/alveolo con una mezcla al 50% de sustrato estándar y arcilla.

Tras 16 semanas de crecimiento se recomienda el traslado de los plantones a umbráculos de aclimatación y sin un excesivo riego. Las plantas florecen en cultivo el primer año, pasados 6-7 meses desde su germinación. El porcentaje de mortalidad observado tras un período de 16 semanas de crecimiento es del 10%.



**OBSERVACIONES**

El nombre científico del taxón proviene de su parecido externo con las especies del género Santolina, de las que se diferencia bien por su textura menos leñosa, menor talla, tendencia a la expansión por vía rizomatosa y capítulos florales menores blancos.

el protocolo óptimo (aquél mediante el cual se ha logrado una mayor germinación de las semillas), especificando el porcentaje total de germinación más su desviación típica, la duración del ensayo en días, el inicio de la primera germinación (dato de gran valor para especies con dificultades de germinar debido a diferentes tipos de dormiciones), y la velocidad de germinación expresada mediante el parámetro T50. Se adjunta una gráfica donde aparece la curva de germinación acumulada a lo largo del ensayo y un histograma de barras de la germinación media diaria.

## Cultivo

Se aportan datos sobre el cultivo de la especie, haciendo especial énfasis en las fases de postgerminación, primeros repicados, condiciones ambientales, tipos de sustratos y contenedores. En algunos casos, se indica además el número medio de planta que se puede obtener por una unidad de peso de semilla limpia y la cantidad o rendimiento en semillas por planta.

## Observaciones

Incluye comentarios de interés con datos que complementan algunos de los apartados antes tratados.



*Silene hifacensis.* >