

Conservación de plantas de interés forestal

Se han ideado y experimentado diversos métodos de propagación y de conservación de especies vegetales del bosque mediterráneo, en recesión o peligro de extinción

Antonio Troncoso de Arce, Manuel Cantos Barragán,
Juana Liñán Benjumea, Javier Troncoso Mendoza y María García Liñán



1. SISTEMA económico para la propagación de esquejes de vid silvestre.

Los bosques constituyen un nexo imprescindibles en el desarrollo normal de la vida. Influyen en la calidad del aire, en la regulación del clima y en la conservación del suelo, plantas, animales y paisaje. Explotados de una forma racional, se convierten en fuente de riqueza.

La conservación de las especies vegetales es uno de los aspectos principales en el mantenimiento del bosque. A su interés en el ecosistema, las plantas silvestres encierran una importancia capital como banco de genes, que puedan mejorar determinados caracteres de sus parientes domesticadas, en particular en los implicados en su adaptación al medio.

Las plantas de uso agrícola se han ido seleccionando en razón de su productividad en condiciones adecuadas de cultivo. Ello ha repercutido en un menor potencial de resistencia o tolerancia ante situaciones adversas. Por el contrario, las especies forestales se han ido autoseleccionando por su capacidad de adaptación a condiciones de estrés.

Muchas especies silvestres se hallan en clara regresión, si no en peligro de desaparecer. Tal retroceso se debe a causas muy diversas. Citemos las principales: *a*) talas indiscriminadas y abusivas, sobre todo de plantas leñosas; *b*) recolección excesiva de especies de interés práctico —farmacéutico, industrial, cosmético o alimentario tipo—, que suelen llevar en la denominación linneana, por epíteto de especie, el vocablo *officinalis*; *c*) incendios provocados o accidentales; *d*) expansión de las ciudades o nuevos asentamientos humanos; *e*) prácticas silvícolas mal realizadas, como exceso de rozas o aclareos indiscriminados; *f*) carga excesiva de ganado herbívoro silvestre o de pastoreo; y *g*) propagación difícil que impide una regeneración normal.

La declaración de parque nacionales, parques naturales, reservas, parajes naturales, parajes singulares y similares constituye una medida eficaz para la conservación de especies en sus propias áreas de distribución. Más difícil resulta la conservación *in situ* de la vegetación natural fuera de esos espacios naturales. Así ocurre con las poblaciones de vid silvestre, cada vez más escasas. Faltan y son necesarios verdaderos programas de conservación y medidas legales apropiadas.

Otra vía de mantener, o incluso aumentar, las plantas pertenecientes a especies en peligro nos lo ofrece la conservación *ex situ*, es decir, fuera de sus ecosistemas naturales. Se trata de utilizar las colecciones de campo o vivero, los jardines botánicos y los bancos de germoplasma para conservar semillas, esporas, polen, bulbos, estaquillas y demás; y también, promover bancos de células, tejidos o plantitas, que tienen como base el cultivo *in vitro*.

La conservación del germoplasma vegetal *ex situ* entraña tres aspectos principales: localización y caracterización de las poblaciones, propagación de las mismas por métodos que no dañen a las plantas madres y conservación propiamente dicha. Analicémoslos.

Localización

A la localización, cartografiado, caracterización y conocimiento del estado sanitario de poblaciones de plantas de bosque está consagrado el proyecto “Estudio y conservación de las vides silvestres en Andalucía”, que realiza nuestro grupo de investigación, junto con el departamento de fisiología y zoología de la facultad de biología de la Universidad de Sevilla y el departamento de agronomía de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes de Córdoba.

Amén de establecer la localización de poblaciones de vid silvestre y su cartografiado, mediante el sistema universal de ubicación (GPS), nos ocupamos de la descripción ampelográfica (morfología y fenología), determinación de los principales tutores de las parras y flora adyacente. Se estudian también los suelos y se evalúa la incidencia de plagas y enfermedades en raíces y órganos aéreos. Otros

aspectos del trabajo no menos importantes son la recogida de material para su conservación en bancos de germoplasma, la prospección y determinación de enemigos naturales de las plagas presentes y de los principales polinizadores. Al propio tiempo se va creando una base de datos de mapas temáticos sobre cada población cartografiada mediante el Programa Arc/Infos.

Propagación reproductora

Las especies vegetales superiores se propagan por vía sexual (reproducción) o por vía vegetativa (multiplicación). En el primer caso, la nueva planta se obtiene por germinación de una semilla que se formó de la unión de una célula masculina con una femenina, dotada cada una con su juego de cromosomas propio. La progenie no reproducirá íntegros los caracteres genéticos del padre o de la madre, sino que, salvando la dominancia entre parentales, será una fusión de los caracteres de ambos. A veces, la flor de la que procede la semilla es hermafrodita, es decir, posee órgano femenino y masculino hábiles; por tanto, puede darse autofecundación (fecundación del óvulo con polen de la misma flor). No obstante, y debido a fenómenos de heterocigosis, la planta hija no suele ser idéntica al parental. En consecuencia, por propagación sexual se obtiene una planta hija que difiere de progenitor, lo cual significa un aumento de la diversidad genética, o biodiversidad.

Esta variabilidad constituye una condición importante para la supervivencia de poblaciones forestales, pues un exceso de individuos genéticamente semejantes supone un alto riesgo ante una situación de adversidad. Por ello, la reproducción es el sistema más conveniente en la propagación de plantas de bosque. Con fines de conservación, cuando la semilla germina bien, lo más económico es extraerla del fruto, someterla a un proceso de estratificación o de frío y sembrarla directamente en bandeja o semillero sobre un sustrato de arena y turba.

Multiplicación agámica

Mediante la propagación agámica, o multiplicación, se obtiene una nueva planta a partir de un frag-



2. SISTEMA de contenedores tubulares para la propagación de esquejes de olivo.

mento de un solo progenitor, por autoenraizado o por injerto (utilizando el sistema radical de otra planta). En estas circunstancias, la planta hija reflejará los caracteres del progenitor, al ser su continuación directa. Se consiguen líneas de plantas clónicas.

No podemos prescindir de las técnicas de propagación agámica. Según el tamaño del esqueje a emplear, estas técnicas van desde sistemas que combinan el riego por nebulización, el calor basal y un tratamiento con auxina (para esquejes semiherbáceos de varios centímetros y con hojas) hasta la implantación directa en el terreno o en vivero, de grandes estacas, con reservas suficientes para soportar el período previo a la radicación.

Cuando para la multiplicación se emplea el enraizamiento de esquejes semiherbáceos, se recurre al procedimiento de nebulización, que com-



3. USO DE UN CORTATUBOS para la eliminación de la cubierta de la semilla de olivo (*Olea europaea*).

bina el riego intermitente y micronizado con la aplicación, en la base de la estaquilla, de un tratamiento con auxina y calor. Se requiere un recinto cerrado, que permita la entrada de luz solar (invernadero de nebulización), dotado de mesas con los bordes sobreelevados (unos 20 cm) para contener un sustrato inerte, generalmente perlita, y de un sistema de calefacción. Sobre las mesas, se sitúan aspersores de salida muy fina (nebulizadores) en contacto con una fuente de agua a presión ($\cong 1$ atm), cuyo flujo está regulado por un sistema electrónico o de reoljería. Sobre las mesas, hincadas sus bases en el sustrato inerte, se colocan los esquejes dotados de 2-3 hojas, previamente tratados con auxina (generalmente ácido indolbutírico, AIB) por inmersión basal rápida. La base de la estaquilla den-

tro del sustrato se mantiene próxima a los 25 °C. A través de este procedimiento se obtienen unos porcentajes muy elevados de formación de raíces en los esquejes de algunas especies forestales.

Aprovechando la buena respuesta de la estaquilla de vid silvestre al enraizamiento, hemos ideado un procedimiento muy sencillo de propagación basado en los mismos principios de la nebulización. Se sustituye el invernadero de nebulización por una simple maceta de polietileno, donde se pone el sustrato (perlita) bien regado. Se hinca en el sustrato la base de la estaquilla tratada o no con AIB (3000 ppm); el conjunto se cubre con una bolsa de plástico invertida, cuya boca se ajusta a los bordes de la maceta. Previamente se rocía el interior con agua finamente micronizada. La eva-

poración del agua del sustrato y la añadida mantienen la humedad relativa próxima al 100 % en el interior de la bolsa. Con este procedimiento, se logran enraizamientos de los esquejes de vid silvestre hasta en un 80 % de los implantados. Patente nuestra fue también el sistema de contenedores tubulares, de particular éxito en la propagación de olivo.

Especies refractarias

Sin embargo, muchas plantas forestales no responden a las técnicas de propagación por reproducción ni agámica. En cuanto a la primera, existen semillas que germinan muy mal e incluso no lo hacen. Malformaciones, fenómenos de dormancia o desequilibrios entre la maduración del fruto y el embrión pueden impedir la germinación. Frecuentemente, la cubierta seminal (testa o endocarpo) es la responsable, debido a su dureza excesiva e impermeabilidad, que bloquean la salida del embrión y al intercambio de gases y agua con el exterior, o a la acumulación, en la misma, de inhibidores de tipo hormonal.

Para disminuir los efectos de esta dormición, se recurre a diversos procedimientos: ingestión por animales, tratamientos con ácidos, bases, auxinas, giberelinas, frío, y otros. Si los inhibidores se acumulan en el endospermo que rodea al embrión, cuesta más superar esas dificultades. Por otra parte, también se puede producir un desfase entre el grado de maduración del embrión y los tejidos que lo protegen, lo que retrasa la germinación. Cuando el problema de la germinación radica en la cubierta seminal el foco de la dormición no queda más remedio que eliminar dicha estructura.

Las especies leñosas en general y las forestales en particular suelen ser recalcitrantes a su propagación mediante estaquillado. Ello guarda relación con la dificultad para la inducción de rejuvenecimiento, imprescindible para que se desarrollen nuevos tejidos.



4. EXTRACCIÓN de embrión de enebro (*Juniperus oxycedrus*).

Cultivo *in vitro*

Para la germinación del embrión aislado o para la regeneración de plantas de escaso material juvenil o rejuvenecido (yemas, ápices, meristemas apicales y otros) hay que acudir al cultivo *in vitro*. Consiste éste en el desarrollo, sobre un medio nutritivo y en condiciones estériles y aisladas (dentro de un contenedor transparente), de células o tejidos vegetales.

El cultivo *in vitro* se basa en los principios de autonomía (capacidad de vivir aislada) y totipotencia (capacidad de regenerar una planta) de la célula. Esta técnica, que no infiere daño alguno a la planta madre, permite la obtención de un número elevado de individuos en poco tiempo, a partir de muy poca cantidad de material inicial. Podemos escalonarlo en varias fases.

Una primera de preparación del material a cultivar. Abarca la germinación de semillas completas, en semillas desnudas o en embriones. Para obtener individuos haploides, puede procederse al cultivo de óvulos, anteras o microesporas. Si interesa la micropropagación, nos serviremos de trozos de tallos uninodales o de fragmentos de plantas con yemas preexistentes. Habrá que eliminar las posibles virosis mediante cultivo de meristemas (grupo de células en división pertenecientes a la punta del brote apical).

Otras formas son el cultivo de embriones somáticos (embrión asexual, obtenido de una célula o grupo de células), de callos (masa desorganizada de células de tipo parenquimático) o de suspensiones celulares (células independientes, no organizadas en tejidos mantenidas en un medio líquido) y protoplastos obtenidos por digestión enzimática de la pared de la célula.

En el caso de la micropropagación, la planta original debe presentar características varietales bien definidas y buen estado sanitario y de desarrollo. Para la germinación, los frutos se recogen maduros, se les elimina la pulpa; las semillas limpias se guardan a 4 grados C hasta el momento de la siembra. Se prefiere la semilla completa cuando la germinación no es muy complicada o su tamaño es tan pequeño,



5. CULTIVO *in vitro* y planta de atropa (*Atropa baetica*) trasplantada a condiciones *ex vitro*.

que dificultaría su manipulación. De este modo, nuestro grupo ha obtenido buenos resultados con las especies *Atropa baetica*, *Echinopartum algibicum*, *Lavatera maritima*, *Rhododendron ponticum* ssp. *baeticum*. Cuando se necesita cultivar la semilla desnuda, sin testa, se elimina dicha cubierta, según su consistencia: por cortes laterales con un cortaúñas (acebo), por presión (enebro) o con la ayuda de un cortatubos (acebuche).

Para el aislamiento del embrión, la semilla sin cubierta se incuba en agua destilada y estéril durante 48 horas a 25 grados, lo que provoca

hinchazón del endospermo, que facilita la realización de cortes laterales con el bisturí (normalmente bajo lupa binocular), hasta dejar visible el embrión sin dañarlo para su extracción.

Cuando la propagación *in vitro* se hace con material no sexual (ápice, yema o explanto), conviene tomar un trozo de ramo joven de la planta madre, eliminarle las hojas y dejar sólo las yemas. Tras una limpieza enérgica, se trata con fungicida y se coloca en un contenedor con solución Hoagland (20%) y sacarosa 2% a 25 grados y luz, para provocarle la emisión de nuevos brotes.



6. CULTIVO *in vitro* y *ex vitro* de plántula de acebo (*Ilex aquifolium*).

COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO

MACRONUTRIENTES			
		mg/l	mM
Nitrato potásico	KNO ₃	800	7,91
Nitrato cálcico	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	300	1,27
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	800	10,00
Fosfato ácido de potasio	KH ₂ PO ₄	170	1,25
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	1,50
Sulfato de hierro	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,1	0,097
EDTA Na ₂ EDTA		37,3	0,10
MICRONUTRIENTES			
		mg/l	μM
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ · H ₂ O	0,85	5,0
Acido bórico	H ₃ BO ₃	6,2	100,0
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	30,0
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	1,03
Sulfato de cobre	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,100
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,105
VITAMINAS			
		mg/l	μM
Tiamina		1	2,96
Mioinositol		100	555,00
REGULADORES			
		mg/l	μM
BAP		0,072	0,32
ANA		0,024	0,13
	Agar		0,6%
	pH		5,7

VID, Troncoso et al., 1990

A partir de esos brotes se prepara el material a cultivar.

Después de esta primera fase de preparación del material a cultivar se procede a la de esterilización. El cultivo *in vitro* ha de hacerse en condiciones adecuadas de nutrición (minerales, azúcares, hormonas y vitaminas) y ambientales (temperatura, luz, fotoperíodo) para que el

material vegetal sedesarrolle hasta regenerar una nueva planta.

Esas condiciones idóneas lo son también para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos) que provocan infecciones en el contenedor. En consecuencia, todos los elementos que intervienen en el proceso (material de vidrio, utensilios, medio de cultivo, material vegetal)

han de ser debidamente esterilizados y todas las operaciones realizarse en ambiente aséptico (cámara de flujo).

Para desinfectar el material vegetal hemos de conocer su capacidad de soportar el tratamiento y su grado de contaminación. En general, tras una primera inmersión rápida, de 10 segundos, en etanol 70 %, sigue otra más larga (≅15-20 minutos) en hipoclorito de sodio; esta última inmersión puede ir acompañada de agitación y, cuando el material lo permite, a temperatura de 35-40 °C. Por último, el material vegetal se lava repetidamente con agua destilada estéril.

Vayamos con la tercera fase, la de establecimiento del cultivo. Se trabaja en las condiciones asépticas de la cabina de flujo; el material vegetal desinfectado se coloca en el interior del contenedor transparente sobre medio nutritivo, generalmente solidificado, con agar 0,6 % a pH 5,6. Cada especie o cada tipo de material requiere su propio medio nutritivo, si bien comparten la misma base (elementos minerales completos, azúcares, vitaminas, reguladores de crecimiento). Una vez sembrado el material vegetal en el contenedor y cerrado éste con un tapón, se introduce en una cámara con temperatura de 25 grados, iluminación de 30 microeinstein (?) y fotoperíodo controlado (en general 16 horas), hasta la formación de la nueva planta.

La cuarta fase concierne a la adaptación a las condiciones externas. Por ser todavía muy endeble el sistema radicular formado *in vitro*, y teniendo en cuenta que la hoja no regula bien la apertura y cierre de estomas, se corre el peligro de deshidratación de la planta, de su muerte, en el proceso del trasplante de *in vitro* a *ex vitro*. Para prevenir la fatalidad, se crea un ambiente de adaptación gradual a las condiciones externas.

La planta *in vitro* se traslada a un contenedor de unos 300 centímetros cúbicos de capacidad con un sustrato suelto (una mezcla de perlita y turba) que se satura de humedad. El conjunto se cubre con una bolsa de plástico transparente también impregnada de agua en su interior; se coloca en un lugar fresco

Resultados obtenidos en pruebas de germinación *in vitro* de acebo

Semillas completas		Semillas sin cubierta		1/2 semilla sin cubierta		Embrión (inmaduro)	
Días de cultivo	Germinación (%)	Días de cultivo	Germinación (%)	Días de cultivo	Germinación (%)	Días de cultivo	Germinación (%)
300	0	300	0	150	25	150	66

Germinación de semillas y embriones de la especie *Juniperus oxycedrus*

Germinación en bandejas		Germinación <i>in vitro</i>					
Semillas con testa		Semillas con testa		Semillas sin testa		Embriones	
Días de cultivo	Germinación (%)	Días de cultivo	Germinación (%)	Días de cultivo	Germinación (%)	Días de cultivo	Germinación (%)
500	0 (0%)	300	0 (0%)	300	37 (12,3%)	200	100 (50%)

7. GERMINACION DEL EMBRION

in vitro y cultivo en condiciones externas de plántula de enebro (*Juniperus oxycedrus*).

y luz mortecina. Tras varios días en esas condiciones, se comienzan a cortar pequeños trozos de la envuelta de plástico hasta que, poco a poco, en el intervalo de días, se halle en pleno contacto con el ambiente. La planta puede ahora pasar a invernadero o vivero. ¿Qué resultados se obtienen? Veámoslo en algunas especies de interés forestal en Andalucía.

La belladona

La belladona (*Atropa baetica* Wilk.) es una especie endémica de Andalucía. En riesgo de extinción, quedan exiguas poblaciones confinadas en la sierra de Cazorla y en la sierra de Grazalema. Para el estudio de su germinación se emplearon frutos maduros de una planta del Parque Natural de Grazalema. Se abrieron las bayas y se extrajeron las semillas, que se almacenaron a 4 grados. En las pruebas de bandejas se obtuvo un 30 % de plántulas a los 40 días de la siembra. En las pruebas de germinación *in vitro* se alcanzó un 100% de plántulas a los 30 días de cultivo.

Acebo

El acebo (*Ilex aquifolium* L.) medra en la mayoría de los sistemas montañosos españoles. En el Sur abunda menos, con alguna representación en la sierra de Cazorla, Sierra Nevada y en la Penibética. Su escaso número, lento crecimiento y mala germinación convierten a esta planta en una especie vulnerable en Andalucía.

Para los experimentos de germinación, se recolectaron frutos maduros en el Parque Natural de Los Alcornocales (Cádiz-Málaga), que se almacenaron a 4 grados. Dado el mucho tiempo necesario para la germinación de la semilla por métodos tradicionales (2-3 años), no se realizaron pruebas de germinación en bandejas. Se ensayaron *in vitro* semillas completas, semillas sin cubierta, medias semillas sin cubierta que contenían el embrión y embriones sueltos.



No se logró germinación alguna cuando se utilizaron la semilla completa o la semilla entera sin cubierta tras 300 días de siembra. Se produjo, pues, un fuerte efecto de latencia en estas semillas, que no había roto ni el almacenamiento previo de frío (180 días a 4 grados), ni las condiciones de cultivo *in vitro*, con la presencia de zeatina en el medio.

Cuando se eliminó la mitad del endospermo, bajó el nivel de dormancia y se alcanzó un 25 % de germinación. No obstante, el mayor porcentaje (66 %) se consiguió con el cultivo *in vitro* de embriones aislados. En este caso, se eliminaron los efectos de dormancia seminal debidos a la cubierta y al endospermo; pero se descubrió otro, debido al propio embrión: su inmadurez. Existía un desfase entre el grado de maduración del fruto y del endospermo y del embrión. Por ello, antes de germinar, hubo que acelerar artificialmente la maduración el embrión *in vitro*. Las plántulas germinadas se desarrollaron *in vitro* durante 60 días hasta alcanzar un tamaño adecuado.

Enebro

Los enebros (*Juniperus oxycedrus* L. ssp. *macrocarpa* y *oxycedrus*) pre-

vienen la erosión y promueven la estructuración de los suelos. En Andalucía está declarada especie en peligro de extinción. Las urbanizaciones, talas incontroladas, fuegos, enfermedades y una regeneración negativa (dificultad de propagación y desarrollo muy lento) han conducido a su estado de precariedad.

Para las pruebas de germinación se recolectaron gálbulos de la subespecie *oxycedrus* en las riberas



8. CULTIVO *in vitro* y en condiciones externas de plántulas de acebuche germinadas a partir de embrión.

del río Viar y de la subespecie *macrocarpa* en la costa del cabo Roche. Ambas subespecies muestran un comportamiento similar. Se abrieron los gálbulos y se sacaron las semillas, que se lavaron con xilol 98 % para eliminarles los restos de resina y se almacenaron a 4 grados. Para la germinación en bandejas, las semillas se sembraron en sustrato del propio suelo donde vive la planta y turba.

A las pruebas de germinación precedió un estudio sobre la viabilidad de la semilla. Se usaron 5989 semillas de las dos subespecies; de ellas, 2717 (45,4 %) fueron normales y 3272 (54,6 %) no viables (vanas o malformadas). Este hecho ex-

plica parcialmente las bajas tasas de germinación del enebro. Tras un año desde la siembra, no se produjo germinación, ni en bandejas ni *in vitro*, con las semillas completas; aun cuando se trataran con calor, GA3, ácido, etcétera. Nos hallábamos, pues, ante una fuerte latencia seminal.

La eliminación de la testa y el cultivo *in vitro* en presencia de GA3 permitió la germinación de una proporción baja de semillas. Pero los mejores resultados se consiguieron con embriones aislados (50 %), sin que fuese necesaria la adición de GA3 al medio. El trasplante *in vitro-ex vitro* de la plántula no entrañó ningún problema. El cultivo *in vitro* del embrión de enebro constituye, en definitiva, un medio eficaz para su reproducción.

Acebuché

El acebuché (*Olea europea sylvestris* Miller) es el olivo silvestre. Dejando de lado las pruebas de germinación tradicional, bien conocidas, acometimos el ensayo *in vitro* de embriones con resultados reseñables. Las semillas sin endocarpo alcanzaron un 60 % de germinación en 40 días; mientras que con el em-

brión aislado se logró un 100 % de germinación en sólo 10 días desde la siembra. En ambos casos, se obtuvieron plántulas trasplantables al exterior en sólo 60 días de cultivo *in vitro* adicional, con pocas pérdidas (4-5 %), y se adaptaron bien a las condiciones externas.

Azalea

El ojaranzo o azalea (*Rhododendron ponticum* ssp. *baeticum* Boiss & Reuter) medra en el Parque de Los Alcornocales, en márgenes de ríos y arroyos encajonados y en sierras litorales con nieblas. Hay muy pocos individuos jóvenes, lo que revela sus dificultades de propagación, explicable en parte por la complejidad de su reproducción (escasa producción de semillas útiles) y hostilidad ambiental para su germinación. También la propagación agámica presenta grandes problemas. La subespecie se encuentra en peligro de extinción.

En las bandejas se obtuvo un máximo de un 2,5 % de plántulas útiles a los 90 días de la siembra, mientras que en el cultivo *in vitro* se alcanzó el 90 % de nuevas plántulas a los 10 días. Tras 120 días de cultivo, las plántulas se trasplantaron al exterior, lográndose un 63 % de supervivencia. Es decir, el cultivo *in vitro* de la semilla de rododendron mejoró espectacularmente el porcentaje de germinación y acortó el tiempo necesario para ello.

Vid

La vid silvestre (*Vitis vinifera*, L. ssp. *sylvestris* Gmelin) crece en ecosistemas del sur y centro de Europa, norte de África y oeste de Asia, aunque la deforestación y la acción humana (urbanización, remoción de suelos para cultivo) avanzan imparables en su destrucción progresiva. C. Arnold y otros destacan el estado preocupante de las poblaciones en los bosques de Austria, Bulgaria, España, Francia, Hungría, Italia, Rumania, Suiza y la antigua Yugoslavia. En el caso de España las pérdidas de poblaciones de vides silvestres son preocupantes. En Andalucía, las grandes poblaciones descritas por Rojas Clemente cerca de la desembocadura del Guadalquivir, a principios del siglo XIX, hoy se han reducido a 16 individuos.



9. FLOR DE RODODENDRON (*Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*).



10. CULTIVO *in vitro* y en condiciones externas de plántulas de rododendron *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum* germinadas a partir de semilla.

La vid silvestre respondió muy bien a todos los procedimientos de propagación: germinación de semillas, enraizamiento de esquejes, lo mismo en nebulización que en contenedores cubiertos con elevada humedad relativa en su interior, y cultivo de explantos uninodales *in vitro*. Ello permite abrigar esperanzas para su conservación.

Ventajas

Los resultados obtenidos con el uso de métodos de cultivo *in vitro* en la germinación de las especies indicadas definen el valor de estas técnicas en la reproducción de plantas de interés forestal que presenten dificultades de propagación por métodos tradicionales.

Otro aspecto interesante de la germinación *in vitro*, es la posibilidad de realizar propagación agámica (multiplicación) a partir de la plántula obtenida, con lo que se crean líneas clónicas de interés. Al tratarse de un material juvenil, se regenera más fácilmente; al provenir del cultivo *in vitro*, no padece contaminaciones, ni es necesario desinfectarlo.

Por este procedimiento, utilizando explantos uninodales de la plántula, nuestro grupo ha obtenido líneas clónicas de *Atropa baetica*, con un factor de multiplicación (número de yemas por explanto) de 6 en 30 días, *Echinopartum algibicum*, 7,75 (40 días), *Phillyrea latifolia*, 3,07 (40 días), *Rhododendron ponticum* ssp. *baeticum*, 7,9 (30 días) e *Ilex aquifolium*, 2 (50 días).

La conservación propiamente dicha del material vegetal *ex situ* implica, a veces, recurrir a las colecciones de campo o vivero, así como a los jardines botánicos, muy útiles pero costosos y con el riesgo de pérdidas de material. Los bancos de germoplasma para la conservación de semillas son también interesantes para ese material sexual y, por tanto con variabilidad genética; en algunos casos, por períodos de tiempo no demasiado largos, ya que la semilla pierde la capacidad de germinación.

Para la conservación de pequeño material agámico (estable genéticamente) y que ocupe un espacio muy reducido se usa el cultivo *in vitro*. Cuando se utiliza tal cual, el vege-



11. CULTIVO *in vitro* y en condiciones externas de plantas de vid silvestre (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*).

tal se puede conservar cierto tiempo. En un primer cultivo, desde que se implanta el explanto hasta que pueda mantenerse la planta dentro del contenedor, transcurren unos 60 días. A partir de esa planta, se preparan nuevos explantos que se subcultivan para regenerar nuevas plantas. De este modo, se puede llegar a unos 12 subcultivos, número aceptable para que no se produzcan cambios

en el material. Se puede, pues, mantener *in vitro* una línea clónica durante dos años, sin que se produzcan alteraciones. Después, el material se cultiva en condiciones externas (invernadero o campo) donde, con la ayuda de propagaciones periódicas por nebulización o humidificación, se pueden renovar las plantas o regenerar las poblaciones que se desee.

Los autores

Antonio Troncoso de Arce, Manuel Cantos Barragán, Juana Liñán Benjumea, Javier Troncoso Mendoza y María García Liñán pertenecen al grupo de investigación "Propagación y Nutrición vegetal" adscrito al departamento de biología vegetal del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología del CSIC en Sevilla. Se han centrado en la obtención por métodos biotecnológicos de plantas mejor adaptadas a situaciones de estrés ambiental, la propagación y conservación de especies vegetales con interés forestal, y el uso ecológico de la fertirrigación en la nutrición vegetal.

Bibliografía complementaria

- INFORME SOBRE LAS POBLACIONES ESPAÑOLAS DE VID SILVESTRE: UNA LLAMADA DE ATENCIÓN SOBRE UN RECURSO FITOGENÉTICO AMENAZADO. R. Ocete, M. E. Ocete, R. del Tío, M. A. López y M. A. Pérez. II Congreso Internacional de Universidades por el Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente. Granada, 11-14 de diciembre, págs. 81-86; 1997.
- SITUATION DE LA VIGNE SAUVAGE *VITIS VINIFERA* SSP. *SILVESTRIS* EN EUROPE. C. Arnold, F. Gillet y M. Gobat, en *Vitis*, vol. 37, n.º 4, págs. 159-170; 1998.
- LIBRO ROJO DE LA FLORA SILVESTRE AMENAZADA DE ANDALUCÍA. G. Blanca, B. Cabezedo, J. E. Hernández Bermejo, C. M. Herrera, J. Muñoz y B. Valdés. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía; 2000.

El desarrollo de la planta *in vitro* está condicionado por el volumen y la composición de la atmósfera gaseosa del interior del contenedor, en especial por el dióxido de carbono o el etileno. Se está ensayando el uso de contenedores permeables a los gases, para detener el crecimiento de la planta, creando una atmósfera adecuada en toda la cámara de cultivo. El camino más fácil y simple para reducir el desarrollo de la planta *in vitro* es la combinación resultante entre la bajada de la temperatura hasta aproximadamente 4 grados, oscuridad, un medio nutritivo muy pobre en nutrientes y uso de reguladores de crecimiento o sustancias osmóticas hasta niveles de inhibición. De este modo, el tiempo entre dos subcultivos puede superar un año.

La mayor estabilidad del material vegetal *in vitro* y un período de decenios de almacenamiento se logran mediante técnicas criogénicas a temperatura ultrabaja (-196 grados C) en nitrógeno líquido. Pero en el proceso de enfriamiento y posterior descongelación la célula puede sufrir daños por la formación de cristales de hielo o deshidratación; para obviar ese riesgo, se recurre a sustancias crioprotectoras junto con un enfriamiento muy lento o muy rápido (vitrificación). A veces, el material vegetal se protege por una cubierta de arginato (encapsulado).

En resumen, combinando procedimientos de localización y caracterización de poblaciones, su propagación por métodos no destructivos y el mantenimiento *ex situ* del material propagado, podremos conservar especies vegetales en peligro y disponer de plantas que sirvan para regenerar *in situ* la vegetación del bosque.

HA CAMBIADO LA NUMERACION DE LAS ILUSTRACIONES YA QUE SE HAN ELIMINADO ALGUNAS. LA ILUSTRACION N° 15 (FLOR DE RODODENDRO), AHORA N° 9, NO OFRECE UNA RESOLUCION ADECUADA Y SE HA SUSTITUIDO. SI NO ES FACTIBLE, ROGAMOS NOS REMITA OTRA FOTOGRAFIA DE MAS CALIDAD O, EN CASO DE ACEPTAR LA NUEVA, REHAGAN EL EPIGRAFE.

EL PDF ES DE BAJA RESOLUCION, POR LO QUE LE REMITIMOS LA ILUSTRACION APARTE, CON FORMATO JPEG DE ALTA RESOLUCION.