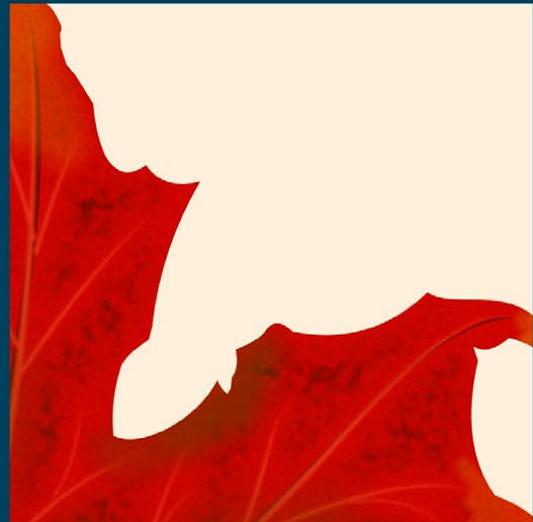
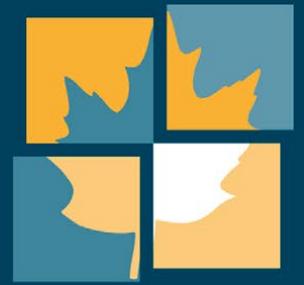


# Cuadernos *de* Biodiversidad



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

# Obtención de material vegetal de reproducción de *Cistus heterophyllus carthaginensis* (Cistaceae), especie catalogada En Peligro de Extinción en la Comunidad Valenciana (España)

## Plant production of *Cistus heterophyllus carthaginensis*, species catalogued as Endangered in the Valencian Community (Spain)

P. P. FERRER-GALLEGO<sup>2\*</sup>, I. FERRANDO<sup>1,2</sup>, F. ALBERT<sup>1,2</sup>, V. MARTÍNEZ<sup>1,2</sup> & E. LAGUNA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SERVICIO DE VIDA SILVESTRE, CENTRO PARA LA INVESTIGACIÓN Y EXPERIMENTACIÓN FORESTAL DE LA GENERALITAT VALENCIANA (CIEF). AV. COMARQUES DEL PAÍS VALENCIÀ 114, 46930 QUART DE POBLET, VALENCIA.

<sup>2</sup> VAERSA. AVDA. CORTES VALENCIANAS Nº 20, 46015 VALENCIA.

\*FLORA.CIEF@GVA.ES

Recibido/Received: 28/03/2017; Aceptado/Accepted: 09/06/2017; Publicado en línea/Published online: 19/06/2017

## RESUMEN

*Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* (Cistaceae) es una especie catalogada como “En peligro de extinción” en la Comunidad Valenciana (España), representada por un único individuo silvestre, localizado en La Pobla de Vallbona (Valencia). Es una especie endémica de la Península Ibérica (Murcia y Valencia), considerando a menudo al ejemplar valenciano como el único individuo puro que existe en todo el mundo para este taxon, ya que el resto de poblaciones, halladas en Cartagena (Murcia), provienen de la hibridación con *Cistus albidus*. Recientemente, se ha publicado el Plan de recuperación para esta especie en la Comunidad Valenciana, que incluye la propagación y producción de nuevas plantas para la conservación a través de translocaciones, entre otras muchas acciones. Desde el punto de vista biológico, se trata de una especie auto-incompatible (aunque en ocasiones se ha registrado una pequeña producción de semillas viables), por lo que su propagación se convierte en un proceso complejo. Además, el uso alternativo de la multiplicación clonal *in vitro* es desaconsejable, debido a los cambios genéticos encontrados en las plantas producidas mediante esta técnica. En el Centro para la Investigación y Experimentación Forestal (CIEF-Servicio de Vida Silvestre) de la Generalitat Valenciana se han llevado a cabo trabajos experimentales de polinización manual para el cultivo y producción de semillas, así como para la multiplicación vegetativa por esquejes, lo que ha dado como resultado nuevos materiales de reproducción (semillas y plantas) de gran importancia para la conservación de esta especie.

**Palabras clave:** Especies amenazadas, endemismo, conservación *ex situ*, jara de Cartagena, producción de planta, semillas.

## ABSTRACT

*Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* (Cistaceae) is an endangered species in the Valencian Community (Spain), represented by only one wild individual located in La Pobla de Vallbona (province of Valencia). It is an endemic species to the Iberian

Peninsula (Murcia and Valencia), and the Valencian plant is often considered as the unique pure individual found worldwide. The remainder populations, found in Cartagena (Murcia) are thought to come from hybridization. Recently a recovery plan for this species has been approved, which includes the propagation and the production of new plants for conservation translocations, among other recovery actions. It deals with a self-incompatible species (although a small production of viable seeds has been recorded sometimes), so its propagation becomes a complex process. In addition, alternative use of *in vitro* propagation is inadvisable, due to apparent genetic changes found in the clones. The Centre for Forestry Research and Experimentation (CIEF, Valencian Wildlife Service) of the Generalitat Valenciana, has carried out experimental hand-pollination works for breeding and seed production, as well as vegetative propagation multiplication by cuttings that have successfully resulted in new reproductive material (seeds and plants) able to save this endangered species.

**Keywords:** Endangered species, endemic plant, *ex situ* conservation, jara de Cartagena, propagation plants, seeds.

## INTRODUCCIÓN

La jara de Cartagena (*Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis*) representa un reto para el conservacionismo de la flora española. Esta planta es endémica del Levante peninsular ibérico (Murcia y Valencia) (Crespo & Mateo, 1988) y debido al bajo número de individuos en sus dos únicas exiguas poblaciones (La Pobla de Vallbona y Cartagena), está catalogada como “En Peligro de Extinción” tanto en la Comunidad Valenciana (Anónimo, 2009, 2013; Aguilera et al., 2009) como en España (Güemes et al., 2004; Anónimo, 2011). Recientemente se ha aprobado el Plan de Recuperación de la planta en la Comunidad Valenciana (Anónimo, 2015). La presente comunicación se enmarca dentro de las acciones y objetivos marcados por el documento técnico de dicho plan.

La mejora de su estado de conservación pasa ineludiblemente por la propagación, multiplicación y producción de ejemplares para trabajos de restitución de poblaciones. Este principio básico choca con dos realidades que dificultan en extremo su ejecución: un alto grado de hibridación con *Cistus albidus*, proceso observado en la población murciana (Pawluczyk et al., 2012); y que en la Comunidad Valenciana solo existe un ejemplar nativo, considerado genéticamente puro, pero afectado por la auto-incompatibilidad fecundativa propia de las especies del género *Cistus* (Boscaiu, 1999, 2000, Boscaiu & Güemes, 2001).

El Servicio de Vida Silvestre de la Generalitat Valenciana, a través del Centro para la Investigación y Experimentación Forestal (CIEF), lleva a cabo un programa de recuperación para esta planta, profundizando en la capacidad de multiplicación vegetativa del único ejemplar silvestre citado (Fig. 1), y en el conocimiento de su biología reproductiva, principalmente diseñado para obtener material vegetal de reproducción sexual.

La presente comunicación recoge las experiencias realizadas y los resultados obtenidos hasta la actualidad para obtener material vegetal de reproducción de *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* sin presencia

de introgresiones ni hibridaciones con otras especies del género, tanto de origen sexual (semillas) como vegetativo (esquejes), a partir del ejemplar valenciano de esta subespecie.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han aplicado diversas metodologías más abajo detalladas, realizándose las experiencias en las instalaciones de vivero del CIEF, sitas en Quart de Poblet (Valencia), o puntualmente sobre el ejemplar existente en La Pobla de Vallbona en el caso de experiencias de cruzamiento con polen procedente de las plantas mantenidas *ex situ* y recolecciones de frutos.

### *Métodos aplicados para la obtención de material de reproducción por vía vegetativa*

### *Multiplicación in vitro y análisis del material obtenido*

La multiplicación *in vitro* del ejemplar silvestre valenciano fue realizada con éxito en la década de los años 90 por el IVIA (Arregui et al., 1993). No obstante, recientemente, en colaboración con el equipo de Biología Molecular del Jardín Botánico de la Universitat València, se planteó comprobar si



Figura 1. Distribución de *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* y aspecto general del ejemplar silvestre valenciano de La Pobla de Vallbona (Valencia) en junio de 2009, detalle de sus características hojas y variabilidad observada en las flores.

el material de *C. heterophyllus* producido *in vitro* podía exhibir mutaciones del ADN ribosomal nuclear (Rosato et al., 2016), como las ya detectadas en otras plantas -por ejemplo *Limonium perplexum* (véase Ibáñez, 2013)- que habían sido producidas mediante esta misma técnica.

### ***Esquejado***

Se han utilizado vástagos tiernos o semi-leñosos, al menos de 5 cm de longitud y con varios nudos, realizándose su cultivo en los meses de primavera y otoño en mesa de cultivo en condiciones de invernadero con temperaturas entre 10 y 20°C. Se utilizaron hormonas de enraizamiento (ácido indol-3-butírico) para favorecer la rizogénesis. Más información sobre el método de esquejado y cultivo aparece en el trabajo de Ferrer-Gallego et al. (2013).

### ***Métodos aplicados para la obtención de material de reproducción por vía sexual***

#### ***Recolección de frutos/semillas del ejemplar silvestre valenciano***

Desde el año 2009 se han realizado seguimientos exhaustivos de la floración y fructificación del ejemplar de La Pobra de Vallbona, incluyendo asimismo riegos de apoyo en diferentes épocas del año, con el fin de conseguir el desarrollo y maduración de frutos, y poder recolectar material.

#### ***Análisis de la presencia de semillas en muestras de suelos***

En abril de 2012 se recolectaron muestras de suelo a una distancia no superior a 50 cm del ejemplar valenciano y una profundidad de 2 cm. Las muestras fueron tratadas en el laboratorio según protocolos estandarizados y posteriormente sembradas en bandejas-semilleros, realizando un seguimiento semanal de todas las plántulas que iban emergiendo durante 3 años consecutivos.

### ***Cruzamientos entre diferentes ejemplares de C. heterophyllus de origen valenciano y entre ejemplares procedentes de la región de Murcia***

En 2015 y 2016 se realizaron cruzamientos mediante polinización manual, entre el material valenciano (plantas procedentes de esquejes del ejemplar de La Pobra de Vallbona, o bien originadas tras la germinación de semillas recolectadas de tal espécimen) y también entre material valenciano y murciano (plantas procedentes de la germinación de semillas cedidas por la administración ambiental de la Región de Murcia, seleccionando los ejemplares sin trazas de introgresión con *C. albidus*).

Dado que los trabajos tienen como objetivo principal maximizar la obtención de plantas de origen valenciano, se planteó en 2015 el objetivo de obtener un protocolo óptimo de cruzamiento entre ejemplares nacidos de semilla y los generados a partir de esqueje, utilizando unos y otros como donantes y receptores del polen, dando lugar a cuatro tipologías de cruzamientos: tipo 1 ( $Cs\text{♀} \times Cs\text{♂}$ ), tipo 2 ( $Cs\text{♀} \times Ce\text{♂}$ ), tipo 3 ( $Ce\text{♀} \times Cs\text{♂}$ ) y tipo 4 ( $Ce\text{♀} \times Ce\text{♂}$ ). Asimismo, también se realizaron diferentes cruzamientos entre material valenciano y el murciano: tipo 5 ( $Ce\text{♀} \times M\text{♂}$ ), tipo 6 ( $M\text{♀} \times Ce\text{♂}$ ), tipo 7 ( $Cs\text{♀} \times M\text{♂}$ ) y tipo 8 ( $M\text{♀} \times Cs\text{♂}$ ); y cruces solo entre material de Murcia: tipo 9 ( $M\text{♀} \times M\text{♂}$ ).

Respecto a la caracterización de las dimensiones y pesos de las semillas obtenidas mediante los cruzamientos se ha seguido la metodología expuesta por Navarro-Cano et al. (2017).

En 2016 se han realizado además experiencias de cruzamiento entre el material *ex situ* valenciano y la planta madre de La Pobra de Vallbona. Para ello se han polinizado manualmente flores del ejemplar existente en la citada localidad, con polen procedente de sus descendientes de semilla, recolectado de los ejemplares mantenidos en el vivero del CIEF. La distancia entre el vivero y la parcela de La Pobra de Vallbona donde vive el único ejemplar nativo es de 15,16 km.

### ***Cruzamientos entre ejemplares de C. heterophyllus subsp. cartaginensis con otras especies del mismo género***

En 2011 se realizaron cruzamientos mediante polinización manual entre ejemplares procedentes de material valenciano con ejemplares de *C. creticus* y *C. albidus*, así como con *C. heterophyllus* subsp. *heterophyllus* de origen marroquí, orientados a conocer a medio plazo la trazabilidad concreta de genes mediante distintas técnicas de detección cromosómica y de variabilidad genética, desarrollada por la Unidad de Investigación de Diversidad Genética y Evolución del JBUV. Estos cruzamientos permiten extraer conclusiones sobre el vigor de las plantas, los efectos de la hibridación en previsión de cuando ésta acontezca igualmente en campo, y la posible transmisión de caracteres morfológicos en las correspondientes líneas de nuevos reproductores, entre otra información relevante. Por otro parte, estos trabajos han permitido la obtención de plantas de la combinación *carthaginensis* × *heterophyllus* (= nothosubsp. *marzoi*) (véase Ferrer-Gallego et al., 2013).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### ***Obtención de material de reproducción por vía vegetativa***

Los primeros resultados encontrados en los análisis cromosómicos y moleculares de los clones de *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* indican que se han producido mutaciones (Rosato et al., 2016), siguiendo además un esquema muy parecido al observado en *Limonium perplexum*. Estas mutaciones o variaciones somaclonales, fueron transmitidas a la descendencia mediante los cruzamientos realizados con plantas mutantes y también a la descendencia resultante de los cruzamientos con plantas no mutadas (Rosato et al., 2016). Por lo tanto, el empleo de ejemplares mutantes en acciones de translocación puede generar cambios en las estructuras genéticas de las poblaciones y las especies. Así, ante esta situación se considera desaconsejable la utilización de estos clones producidos *in vitro* para ser utilizados

en la multiplicación y producción de planta *ex situ* para ser introducidas en el medio natural.

En lo que respecta a la multiplicación de planta mediante esquejado, la rizogénesis se obtiene pasadas 4-6 semanas tras el inicio de la prueba de esquejado hormonado. A partir de la multiplicación vegetativa del ejemplar silvestre valenciano por este método se han obtenido varios ejemplares, habiendo florecido en algunos casos durante el primer año. El porcentaje de enraizamiento del esquejado hormonado es del 30-40%, y 10-15% sin hormonas.

### ***Obtención de material de reproducción por vía sexual***

Aunque se había venido visitando regularmente el ejemplar de La Pobra de Vallbona desde el año 1990, no se localizaron frutos con semillas, o a lo sumo se encontraban puntualmente 1-2 semillas inviables. Sin embargo, a partir de 2012 sí se pudieron obtener semillas del ejemplar nativo en tres ocasiones (2012, 2013 y 2015). En la primera de ellas se recolectó un fruto que contenía 3 semillas, siendo tan solo una de ellas viable y con capacidad germinativa, aunque el ejemplar producido ha mostrado caracteres teratológicos y esterilidad (véase Fig. 2). Tal ejemplar dio lugar a lo descrito como *lus.* [*lusus naturae*] *obstinatus* (Ferrer-Gallego et al., 2015).

La segunda recolección, en el año 2013, fue absolutamente excepcional, obteniéndose 5 frutos con 142 semillas, de las cuales una parte se conserva en el banco de germoplasma del CIEF, y el resto ha producido 15 plantas adultas reproductoras. En el año 2014, el ejemplar silvestre valenciano no produjo ningún fruto, y por último en 2015 se ha recolectado un único fruto que contenía 8 semillas.

Respecto a los análisis de las muestras de suelo, sólo se observó un hipotético ejemplar de *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* que germinó en el año 2014, pero no superó la fase de plántula.

En el año 2015 se realizaron 368 cruces entre el material valenciano y el murciano (tipos de cruza-

mientos del 1 al 9) (Tabla 1). Se obtuvieron 172 frutos, siendo el porcentaje de éxito de los cruzamientos -formación de fruto y semillas viables- del 55,3%. El número total de semillas recolectadas fue 5.316. El cruzamiento entre material valenciano (233 cruces) produjo 43 frutos y 1.087 semillas (Tablas 1 y 2, cruces 1 al 4). Los cruces entre plantas valencianas y murcianas (129 cruzamientos) produjeron 128 frutos y 4.225 semillas (cruces 5 al 8, Tabla 1). La viabilidad observada en las semillas procedentes de los cruzamientos entre plantas obtenidas de material valenciano (cruces 1 al 4) es del 78,7% (Tabla 2). Es necesario remarcar que los resultados expuestos en este trabajo sobre la viabilidad responden a un análisis *de visu* del estado de las semillas y no a un test destructivo ni a un test de germinación. El mayor rendimiento en términos de fructificación en relación al número de flores polinizadas es el tipo 2 en la Tabla 1 (Cs♀×Ce♂) en el que actúa como receptoras de polen las plantas procedentes de la germinación de semillas, obteniendo un porcentaje de éxito en

los cruces realizados del 43,4%; y el cruce inverso obtuvo un bajo cuajado de los frutos (9,2%) aunque el número total de semillas producidas es similar al cruzamiento de tipo 2.

El cruzamiento entre plantas procedentes exclusivamente de esquejes de material valenciano obtuvo un valor de fructificación del 17,7% y 57 semillas (Tabla 1, cruce nº 4). Este dato es concordante con la baja producción de semillas del ejemplar silvestre valenciano, pero revela cierta fertilidad y asegura la producción de material sexual de reproducción necesario para los trabajos de restitución.

Otros cruzamientos realizados con otras especie del género para conocer la fertilidad del material valenciano han resultado positivos y se han obtenido semillas híbridas (véase Tabla 3). Siendo los cruces entre *C. albidus* y *C. heterophyllus* subsp. *heterophyllus* donde mayor éxito se ha obtenido en la fructificación, con 100% y 98,1%, respectivamente.

Cruzamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TOTAL (X ± S.D.)
Tipo cruzamiento	Cs♀×Cs♂	Cs♀×Ce♂	Ce♀×Cs♂	Ce♀×Ce♂	Ce♀×M♂	M♀×Ce♂	Cs♀×M♂	M♀×Cs♂	M♀×M♂	9
Número cruzamientos	32	53	131	17	10	85	17	17	6	368
Frutos recolectados	5	23	12	3	10	85	16	17	1	172
Éxito de los cruzamientos (%)	15,6	43,4	9,2	17,6	100,0	100,0	94,1	100,0	16,7	55,3 ± 42,1
Número de semillas	128	459	443	57	1.020	2.183	326	696	4	5.316
Rendimiento (nº semillas por fruto)	25,6	19,9	36,9	19,0	102,0	25,7	20,4	40,9	4	32,7 ± 28,1
*Viabilidad (%)	78	84	81	72	89	91	92	94	95	86,2 ± 7,3

Tabla 1. Resultados obtenidos de los cruzamientos realizados entre plantas de *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* a partir de material valenciano (producido de esqueje y germinación de semillas) y murciano. Cs: Plantas valencianas procedentes de la germinación de semillas; Ce: Plantas valencianas procedentes de multiplicación vegetativa por esqueje del ejemplar valenciano; M: Planta de procedencia murciana, obtenidas a partir de semilla. (\*) Porcentaje de semillas viables, morfológicamente bien formadas y que no presentan signos de predación, deformaciones o se encuentren vacía o inmaduras.

Método de reproducción	Número frutos / semillas	Rendimiento medio (nº semillas/fruto) (X ± S.D.)	Viabilidad semillas (%) (X ± S.D.)	Número plantas producidas
Multiplicación vegetativa	-	-	-	5
Sexual (ejemplar silvestre)	7 / 153	4,3 ± 1,2	53,5 ± 17,6	15 + 1*
Sexual (**)	43 / 1.087	25,3 ± 8,2	78,7 ± 5,1	35

Tabla 2. Resultados obtenidos desde el año 2012 hasta 2016 en la obtención de material de reproducción de *C. heterophyllum* subsp. *carthaginensis* puro. \*Ejemplar teratológico (estéril); \*\*Cruzamientos entre ejemplares de origen valenciano excluyendo los clones (cruces 1 al 4, ver Tabla 1).



Figura 2. Producción de planta de *C. heterophyllum* subsp. *carthaginensis* a través de esquejes (arriba izquierda); cruces entre ejemplares (arriba derecha); ejemplares utilizados en los ensayos de cruzamiento (abajo izquierda) y ejemplar teratológico estéril (abajo derecha).

Cruzamientos	Número cruzamientos	Número frutos	Fructificación (%)	Número semillas	Rendimiento (n° semillas/fruto)	Viabilidad semillas (%)
<i>C. b. carthagenensis</i> × <i>C. b. heterophyllus</i> *	620	608	98,1	45.059	74	90
<i>C. b. carthagenensis</i> × <i>C. creticus</i>	15	10	66,7	758	76	96
<i>C. b. carthagenensis</i> × <i>C. albidus</i>	15	15	100	1.183	76	98

Tabla 3. Resultados de los cruzamientos con otras especies realizados para conocer la fertilidad del material valenciano. \**C. heterophyllus* subsp. *carthagenensis* (material procedente de multiplicación *in vitro*) × *C. heterophyllus* subsp. *heterophyllus* (material procedente de la localidad marroquí de Alhucemas).

En base a los resultados obtenidos en 2015, se abordaron nuevas experiencias de cruzamiento en 2016, teniendo solo en cuenta los cruces tipo 2 y 3, los que consideraban polinizaciones cruzadas entre el material de esqueje y el originado por germinación de semillas. Se realizaron 1.655 cruces mediante polinización manual durante los meses de floración (abril y mayo) (Fig. 3). El cruce que alcanzó mayor rendimiento en términos de cantidad y calidad de las semillas fue el que consideró como receptores de polen las plantas procedentes de la germinación de las semillas (Tabla 4), resultados que corroboran lo obtenido en 2015.

Analizando en mayor detalle los resultados de 2016 del seguimiento del material *ex situ* y de los cruces realizados entre los dos tipos de material puro valenciano –de esqueje y de semilla– se observa que las plantas obtenidas de esqueje han florecido en mayor proporción que las de semilla, produciendo un total de 887 flores frente a 768; las ratio obtenidas han sido de 147,8 y 54,8 flores/planta respectivamente (Tabla 4). Sin embargo sólo han cuajado un 8,9% (79 frutos) de las flores en

las plantas procedentes de esqueje frente a 61,3% (471 frutos) en las de semilla (Fig. 3). En total de las 1.655 polinizaciones realizadas han madurado 643, dando lugar a 550 frutos maduros y bien conformados (Tabla 4). Se han recolectado 20.673 semillas, el 95,4% (19.729) de las cuales proceden de los ejemplares obtenidos de semilla y el 4,6% (944) de los procedentes de esqueje, lo que presumiblemente asegura un aumento de la variabilidad genética para esta especie (Tabla 5). Este incremento se produce por el entrecruzamiento entre las cromátidas, donde los alelos se recombinan produciendo nuevas combinaciones genéticas aunque con los mismos genes –pues no ha habido intercambio génico al tratarse de un solo ejemplar–, a no ser que se hayan producido de modo natural nuevas mutaciones.

La tasa de fructificación, número de frutos obtenidos por flores polinizadas, es de 61,3%, en el caso de plantas de semilla receptoras de polen (cruce tipo 2), frente a 8,9 % en el caso de plantas de esqueje (tipo 3) (Tabla 4), un dato que corrobora los valores obtenidos en 2015 para los mismos cruces, 43,4% y 9,2% , respectivamente (Tabla 1).

Cruzamientos	Número plantas	Número flores	Flores/planta	Número frutos	Éxito fructificación (%)	Frutos/planta
<i>C. h. carthagenensis</i> ♀ (semilla) × <i>C. h. carthagenensis</i> ♂ (esqueje) Tipo 2	14	768	54,8	471	61,3	33,6
<i>C. h. carthagenensis</i> ♀ (esqueje) × <i>C. h. carthagenensis</i> ♂ (semilla) Tipo 3	6	887	147,8	79	8,9	13,2

Tabla 4. Resultados de los cruzamientos de *C. heterophyllus* subsp. *carthagenensis* realizados en 2016 entre plantas procedentes de multiplicación vegetativa (esquejes) y sexual (germinación de semillas).

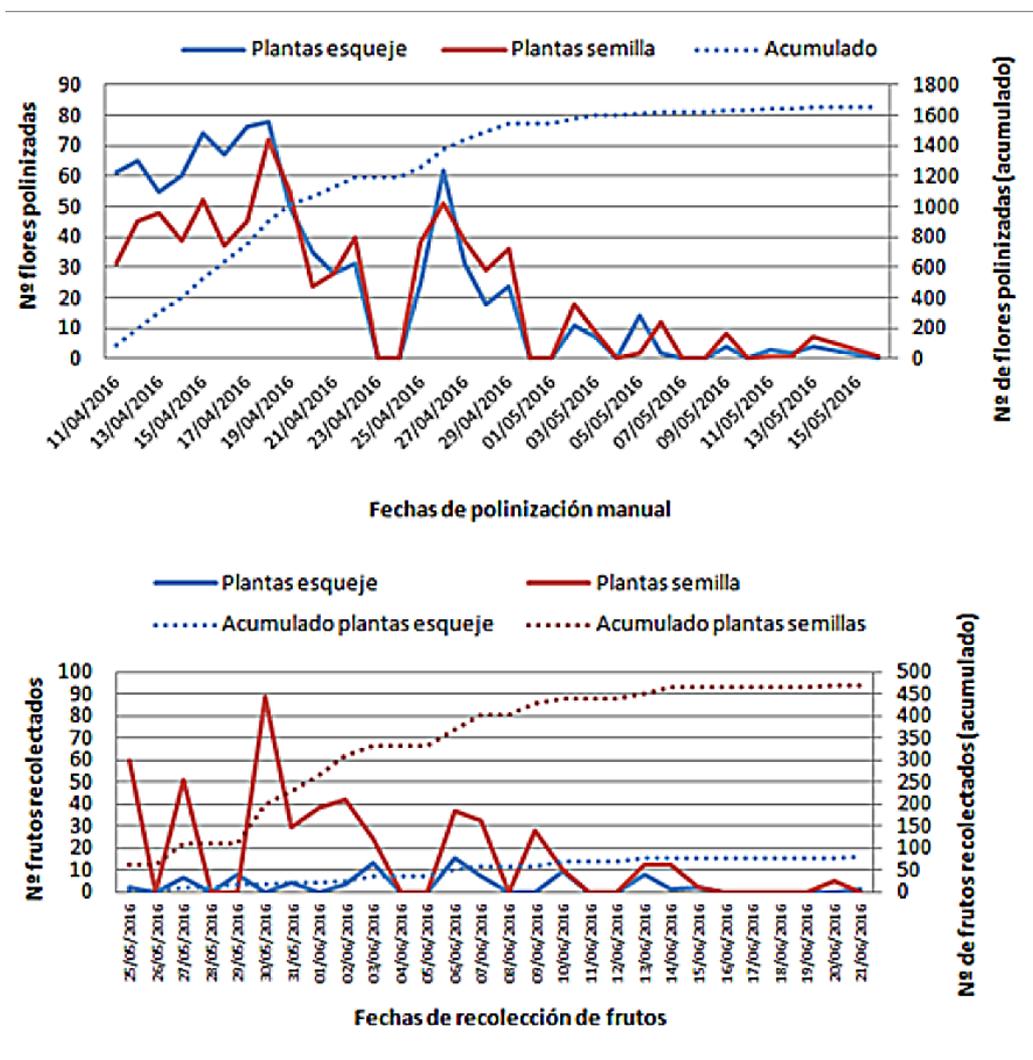


Figura 3. Cruzamientos realizados en 2016 para la obtención de material vegetal de reproducción sexual entre líneas de plantas madre cultivadas en el CIEF (arriba) y recolección de frutos (abajo).

Cruzamientos	Número semillas	Rendimiento (semillas/fruto)	*Viabilidad semillas (%)	Peso total (g)	Peso 100 semillas (g) X ± S.D.	Dimensiones X ± S.D.
<i>C. b. carthaginensis</i> ♀ (semilla) × <i>C. b. carthaginensis</i> ♂ (esqueje) Tipo 2	19.729	37,64	92	16,81	0,08 ± 0,01	0,96 ± 0,13 × 1,21 ± 0,14
<i>C. b. carthaginensis</i> ♀ (esqueje) × <i>C. b. carthaginensis</i> ♂ (semilla) Tipo 3	944	11,94	94	0,99	0,10 ± 0,01	1,05 ± 0,13 × 1,36 ± 0,14

Tabla 5. Resultados de la caracterización de los lotes de semillas recolectados en 2016 a partir de los cruzamientos *ex situ* de material valenciano. (\*) Porcentaje de semillas viables, morfológicamente bien formadas y que no presentan signos de predación, deformaciones o se encuentren vacía o inmaduras.

Se ha observado que las semillas recolectadas en 2015 procedentes de plantas de esqueje (cruce tipo 4) tienen dimensiones y peso ligeramente mayores que las procedentes de semilla (tipos 1 y 2) y de esqueje (tipo 3) (Fig. 4 y Tabla 6). Estas ligeras diferencias podrían deberse a que las plantas de esqueje

tienen menos frutos que madurar, lo que permite canalizar más recursos a las pocas producidas, con el consiguiente incremento de dimensiones, aunque es necesario profundizar en estos resultados y realizar más experiencias para poder demostrar esta hipótesis.



Figura 4. Semillas de *C. heterophyllum* subsp. *carthaginensis* procedentes de los cruzamientos realizados en 2015 recolectados de plantas originadas a partir de semilla (izquierda), de esquejado (centro) y ambas juntas (derecha, obsérvese la diferencia de tamaño según el origen, siendo las más pequeñas las de semilla).

Tipo	1	2	3	4
Cruce	Cs♀×Cs♂	Cs♀×Ce♂	Ce♀×Cs♂	Ce♀×Ce♂
Ancho (mm)	1,185 ± 0,152	1,086 ± 0,170	1,14 ± 0,070	1,357 ± 0,180
Largo (mm)	0,912 ± 0,086	0,821 ± 0,109	0,868 ± 0,139	1,003 ± 0,189
Peso (mg)	0,710 ± 0,199	0,660 ± 0,127	0,570 ± 0,152	0,950 ± 0,176

Tabla 6. Dimensiones de las semillas procedentes de los diferentes cruzamientos realizados en 2015 entre las progenies. Tamaño muestral para cada cruce = 30 semillas.

### Experiencia de polinización asistida in situ de la planta de La Pobra de Vallbona

Los cruces asistidos en los que se ha utilizado el ejemplar silvestre valenciano como receptor de polen, haciendo de donantes ejemplares cultivados en el CIEF procedentes de semillas, han sido en todos infructuosos. Se polinizaron un total de 13 flores en tres momentos diferentes, pero la producción de frutos ha sido nula. Aparentemente ello podría deberse a que la mayoría de las flores que ha producido en 2016 el ejemplar silvestre mostraban el estigma -y también los estambres- con malformaciones, con aspecto de necrosamiento o resección prematura (Fig. 5).



Figura 5. Momento de la polinización de flores del ejemplar silvestre de La Pobra de Vallbona con polen de ejemplares producidos de semilla en el CIEF (izquierda) e imagen donde se aprecia la atrofia en los estambres de una flor del mismo ejemplar (derecha).

### Producción de planta en vivero y trabajos de introducción de ejemplares en el medio natural

Parte de las semillas producidas en las experiencias de 2015 se han utilizado para producir planta que corresponde ya por tanto a una nueva generación íntegramente procedente de condiciones *ex situ* (Fig. 6). Las semillas germinaron durante el primer trimestre de 2016, desarrollando plantas vigorosas que mostraban todos los caracteres morfológicos propios de la especie. A finales de 2016 se introdujeron 25 ejemplares en el Parque Natural Serra Calderona, en el municipio de Serra (LIC, Lugar de Importancia Comunitaria, red Natura 2000) (Fig. 7). Se trata de la primera plantación de ejemplares íntegramente procedentes de semilla de *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis*. Con antelación se hicieron varias plantaciones entre 1997 y 2010 (Servicio de Vida Silvestre, 2015), pero todas ellas utilizando material obtenido *in vitro*, y que han ido desapareciendo progresivamente; de ellas sólo sobreviven 6 ejemplares en la realizada en la Microrreserva de Flora Tancat de Portaceli (Serra). En la actualidad (2017) hay un stock de plantones (Fig. 8) generados a partir de la germinación de semillas que serán incorporados al medio en futuros trabajos de translocaciones.

Es importante mencionar que en las plantaciones realizadas entre 1997 y 2010 aparecieron algunos ejemplares híbridos entre las plantas procedentes de la clonación *in vitro* y *C. albidus* (véase Navarro-Cano et al., 2009), lo que pone de manifiesto el riesgo de este proceso en los trabajos de introducción de planta y creación de nuevas poblaciones de la jara de Cartagena, sobre todo en lugares donde existe una elevada densidad de *C. albidus* (véanse los trabajos en los que se trata la hibridación entre estas dos especies: Jiménez et al., 2007; Pawluczyk et al., 2012). En este sentido, uno de los criterios elegidos para los trabajos de implantación de ejemplares en campo es la ausencia de *C. albidus*, o el control de su densidad en lugares que representan territorios de gran importancia para la presencia de la jara de Cartagena en el territorio valenciano.

## CONSIDERACIONES FINALES

El caso de la planta valenciana de *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* es excepcional y extremo en el ámbito de la conservación vegetal en España, ya que no existen otros táxones de los que sólo se conserve un único ejemplar silvestre, para el que no existan sospechas de introgresión genética. Dada la baja producción de semillas de la planta valenciana, no podía augurarse hasta ahora una salida suficientemente viable para la regeneración del taxon, que quedaba abocada a la multiplicación *in vitro*, para la que a su vez se ha probado la existencia de riesgos de alteraciones genéticas puntuales, aparentemente no codificantes pero de efectos desconocidos.

El trabajo aquí expuesto demuestra que, a pesar de la importante barrera fecundativa habitual en el género *Cistus* y claramente presente en el ejemplar remanente de La Pobla de Vallbona, se ha podido obtener una cantidad notable de semillas viables, abriendo un nuevo campo de acción en la recuperación de la especie. En ello han influido un factor aleatorio –la producción excepcional de semillas registrada en el ejemplar silvestre en 2013- y un trabajo diseñado para obtener la máxima producción posible de semillas combinando técnicas propias de los huertos-semillero. A partir de él, se ha seleccionado un protocolo de polinización que maximiza la obtención de germoplasma y que permite albergar la esperanza de futuras implantaciones viables de la especie en el medio natural.



**Unión Europea**

Fondo Europeo Agrícola  
de Desarrollo Rural

*Europa invierte en las zonas rurales*



Figura 6. Planta de *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* producida a principios de 2016 a partir de la germinación de semillas de procedencia valenciana.



Figura 7. Plantación de ejemplares en el Parque Natural Serra Calderona (Valencia) realizada en 2016.



Figura 8. Planta de *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* producida a principios de 2017 a partir de la germinación de semillas de procedencia valenciana.

## AGRADECIMIENTOS

La producción de planta se beneficia del soporte financiero del Fondo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER).

Agradecemos a los compañeros del CIEF del Servicio de Vida Silvestre de la Generalitat Valenciana, y a los diversos equipos que colaboran en la conservación de esta especie. Al Ayuntamiento de La Pobla de Vallbona, a la Universitat de València (Dr. Josep Antoni Rosselló y Dra. Marcela Rosato), a la Unidad de Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrícolas (IVIA) y la colaboración de los diferentes colaboradores que han contribuido al desarrollo de estas actividades: Roberto Fernández García, Fabian Campestre Mezquida, Sara Serra y Ludovica Dessì (Università degli Studi di Cagliari, Sardegna, Italia).

## REFERENCIAS

- Aguilella, A., Fos, S. & Laguna, E. (eds.), (2009). *Catálogo Valenciano de Especies de Flora Amenazadas*. Colección Biodiversidad, 18. Conselleria de Medi Ambient, Aigua, Urbanisme i Habitatge, Generalitat Valenciana, Valencia, 358 pp.
- Anónimo (2009). Decreto 70/2009, de 22 de mayo, del Consell, por el que se crea y regula el Catálogo Valenciano de Especies de Flora Amenazadas y se regulan medidas adicionales de conservación. *Diari Oficial de la Comunitat Valenciana*, 6021:20143-20162.
- Anónimo (2011). Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino «BOE» núm. 46, de 23 de febrero de 2011 Referencia: BOE-A-2011-3582.
- Anónimo (2013). Orden 6/2013, de 25 de marzo, de la Conselleria de Infraestructuras, Territorio y Medio Ambiente, por la que se modifican los listados valencianos de especies protegidas de flora y fauna. *Diari Oficial de la Comunitat Valenciana*, 6996:8682-8690.

- Anónimo (2015). Orden 1/2015, de 8 de enero, de la Conselleria de Infraestructuras, Territorio y Medio Ambiente, por la que se aprueban los planes de recuperación de las especies de flora en peligro de extinción *Cistus heterophyllus*, *Limonium perplexum* y *Silene hifacensis*. *Diari Oficial de la Comunitat Valenciana*, 7451:1801-1815.
- Arregui, J.M., Juárez, J., Laguna, E., Reyna, S. & Navarro, L. (1993). Micropropagación de *Cistus heterophyllus*. Un ejemplo de la aplicación del cultivo de tejidos a la conservación de especies amenazadas. *Vida Silvestre*, 74:23-29.
- Boscaiu, M. (1999). *Relaciones entre el sistema reproductor y la rareza de Cistus heterophyllus Desf. subsp. carthagenensis (Pau) M.B. Crespo & Mateo*. Informe para la Conselleria de Medio Ambiente de la Generalitat Valenciana, Universitat de València, Valencia.
- Boscaiu, M. (2000). *Regeneración y estudio de la variabilidad morfológica y genética de Cistus heterophyllus subsp. carthagenensis*. Informe para la Conselleria de Medio Ambiente de la Generalitat Valenciana. Universitat de València, València.
- Boscaiu, M. & Güemes, J. (2001). Breeding system and conservation strategy of the extremely endangered *Cistus carthagenensis* Pau (Cistaceae) of Spain. *Israel Journal of Plant Science*, 49:213-220.
- Crespo, M.B. & Mateo, G. (1988). Consideraciones acerca de la presencia de *Cistus heterophyllus* Desf. en la Península Ibérica. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 45(1):165-171.
- Ferrer-Gallego, P.P., Ferrando, I., Campestre-Mezquida & Laguna, E. (2013). *Cistus heterophyllus* nothosubsp. *marzoi*, n. subsp. nov. (Cistaceae). *Bouteloua*, 16:27-33.
- Ferrer-Gallego, P.P., Ferrando, I., Gago, C. & Laguna, E. (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, 246 pp.
- Ferrer-Gallego, P.P., Ferrando, I. & Laguna, E. (2015). *Lusus naturae plantae in Cistus heterophyllus subsp. carthagenensis lus. obstinatus* (Cistaceae) *Bouteloua*, 21:116-122.
- Güemes, J., Jiménez, J.F. & Sánchez-Gómez, P. (2004). *Cistus heterophyllus* subsp. *carthagenensis*. In: Bañares, A., Blanca, G., Güemes, J., Moreno, J.C. & Ortiz, S. (eds.), *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España*. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, pp. 192-193.
- Ibáñez, M.R. (2013). Propagación *in vitro* y estudio con marcadores moleculares y cromosómicos de *Limonium perplexum* L. Sáez & Rosselló. Facultat de Ciències Biològiques. Universitat de València, Burjassot.
- Jiménez, J.F., Sánchez Gómez, P. & Rosselló, J.A. (2007). Evidencia de introgresión en *Cistus heterophyllus* subsp. *carthagenensis* (Cistaceae) a partir de marcadores moleculares RAPD. *Anales de Biología*, 29:95-103.
- Navarro-Cano, J.A., Sánchez Balibrea, J., Barberá, G.G., Ferrández Sempere, M. & El Andalossi, M. (2009). Siguiendo la huella de la hibridación en poblaciones de *Cistus heterophyllus* del RIF marroquí. *Conservación Vegetal*, 13:9-10.
- Navarro-Cano, J.A., Schwienbacher, E., Sánchez, J. & Erschbamer, B. (2017). The role of seed traits as segregation factors of hybrids in wild populations of *Cistus* (Cistaceae). *Plant Biosystems*, 151(3):530-538.
- Pawluczyk, M., Weiss, J., Vicente-Colomer, M. & Egea-Cortines, M. (2012). Two alleles of *rpoB* and *rpoC1* distinguish an endemic European population from *Cistus heterophyllus* and its putative hybrid (*C. × clausonis*) with *C. albidus*. *Plant Systematics Evolution*, 298:409-419.
- Rosato, M., Ferrer-Gallego, P.P., Totta, C., Laguna E. & Rosselló, J.A. (2016). Latent nuclear rDNA instability in *in vitro*-generated plants of *Cistus heterophyllus* is activated after sexual reproduction with conspecific wild individuals *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1):127-137.
- Servicio de Vida Silvestre. (2015). *Plan de recuperación de Cistus heterophyllus*. Documento técnico. Servicio de Vida Silvestre - Conselleria de Infraestructuras, Territorio y Medio Ambiente de la Generalitat Valenciana, Valencia. 24 pp. <http://www.agroambient.gva.es/web/biodiversidad/cistus-heterophyllus>