

VIDA SILVESTRE



Conservación *ex situ*
de plantas silvestres

Instituciones participantes

Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Italia)



Centro Conservazione Biodiversità e Banca del Germoplasma della Sardegna (Dipartimento di Scienze Botaniche, Università degli Studi di Cagliari, Italia)



Instituto de Recursos Naturales y Ordenación del Territorio (Universidad de Oviedo, España)



Edita

Obra Social La Caixa y Gobierno del Principado de Asturias

Editores

Gianluigi Bacchetta, Álvaro Bueno Sánchez, Giuseppe Fenu, Borja Jiménez-Alfaro, Efisio Mattana, Beti Piotto & Myriam Virevaire.

Autores

Gianluigi Bacchetta, Daniel Ballesteros, Piero Belletti, Salvatore Brullo, Álvaro Bueno, Luisa Cagelli, Miriam Cano Castillo, Valentina Carasso, Elena Carrió, José Luis Casas, Juli Caujapé Castells, Claudio Cervelli, David Draper, M. Carmen Escribà Baeza, Giuseppe Fenu, César Gómez-Campo, Fabio Gorian, Óscar Grillo, Jaime Güemes, Borja Jiménez-Alfaro, Isabel Marques, Efisio Mattana, Paolo Mulè, Massimo Nepi, Ettore Pacini, Pietro Pavone, Beti Piotto, Cristiano Pontecorvo, Aranxta Prada, Francisco Serrano Martínez, Gianfranco Venora, Lorenzo Vietto, Myriam Virevaire.

Traductores

Amparo Alonso Chicano, Eduardo Fernández Pascual, Ana Fernández Rodríguez, Borja Jiménez-Alfaro, Marian Morcillo Benlloch.

© de los textos: Los autores, 2008

© de esta edición: Jardín Botánico Atlántico

Reproducción autorizada citando la fuente

Coordinación editorial: Borja Jiménez-Alfaro

Diseño gráfico y maquetación: Forma

Impresión: Gráficas Naranco

D.L. : As-6443/08

Citación recomendada:

BACCHETTA G., BUENO SÁNCHEZ A., FENU G., JIMÉNEZ-ALFARO B., MATTANA E., PIOTTO B. & VIREVAIRE M. (EDS). 2008. Conservación *ex situ* de plantas silvestres. Principado de Asturias / La Caixa. 378 pp.

Conservación *ex situ* de plantas silvestres



GOBIERNO DEL
PRINCIPADO DE ASTURIAS



Obra Social "la Caixa"

Presentación

La conservación “ex situ” de plantas silvestres es reconocida como un complemento importantísimo de las acciones sobre el terreno, ya que su uso contribuye a proteger y custodiar las especies para evitar su desaparición. En este campo, en los últimos tiempos, se está impulsando el desarrollo de bancos de germoplasma dedicados a la conservación de semillas de plantas silvestres (imprescindibles para la conservación ex situ).

Creemos que esta publicación, sin duda necesaria, llena un importante hueco en la literatura en español relacionada con los bancos de germoplasma y será de gran interés para quienes trabajan dentro del panorama de la conservación de plantas, “ex situ”, en España, pero también para un amplio espectro de técnicos que lo hacen en el mundo hispano-americano.

La publicación, corolario del apoyo del Gobierno del Principado de Asturias al banco de germoplasma del Jardín Botánico Atlántico de Gijón ha sido promovida por el equipo científico del mismo, dependiente de la Universidad de Oviedo, y posible gracias a la colaboración con los centros italianos ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) y CCB (Centro Conservazione Biodiversità e Banca del Germoplasma della Sardegna -Università degli Studi di Cagliari). Para el desarrollo de la misma ha sido imprescindible además el trabajo entusiasta de 33 investigadores de cuatro países (Italia, España, Francia y Portugal), lo que convierte a la obra en todo un reto arriesgado, de larga gestación y de nada fácil coordinación. Llevada a buen puerto, finalmente se ha convertido en un ejemplo singular, de cómo coordinando esfuerzos y con buena voluntad, se puede avanzar y trabajar más rápido en aras de la conservación.

La edición de esta publicación se enmarca en el Convenio de Colaboración entre el Gobierno del Principado de Asturias y la Obra Social “la Caixa” firmado el doce de mayo de dos mil seis, dentro de la serie sobre vida silvestre; es un paso más en el compromiso de Asturias con la biodiversidad, y una pequeña, pero interesante, aportación a los objetivos que estableció la Conferencia de las Partes de la Convención sobre Diversidad Biológica, celebrada en La Haya en 2002, y que sentó las bases para la Estrategia Global de la Conservación Vegetal (a la que está adherida España). Pretende ser también un granito de arena para la consecución harto difícil de ese objetivo que hoy une a todos los conservacionistas del mundo: detener la pérdida de biodiversidad antes de 2010.

Prólogo

JOSÉ MARÍA IRIONDO

Los orígenes de la conservación de la biodiversidad vegetal contemporánea están en gran parte vinculados a la práctica de la recolección, almacenamiento y uso de las semillas en bancos de germoplasma. Así, la constatación en la década de los sesenta de que el mundo estaba sufriendo una importante crisis de diversidad genética en sus cultivos a consecuencia de la sustitución de las variedades tradicionales por cultivares modernos, puso de manifiesto la necesidad de tomar medidas decididas para la conservación de la biodiversidad vegetal y constituyó el catalizador para el establecimiento de los primeros bancos de germoplasma. En el Mediterráneo Occidental el desarrollo de esta práctica se debe en gran parte a la labor pionera del Prof. César Gómez Campo. Mientras se creaban los primeros grandes bancos de germoplasma dedicados a la conservación de especies cultivadas, el establecimiento del Banco de Semillas de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid a finales de la década de los sesenta, supuso el punto de partida para la conservación de semillas de especies silvestres. Desde entonces hasta nuestros días, el Prof. César Gómez Campo impulsó de forma incansable la creación de nuevos bancos de germoplasma, tanto dentro de España como por toda la región Mediterránea. Con el advenimiento del nuevo milenio, los bancos de germoplasma mediterráneos han madurado y se han consolidado, pasando a formar parte de redes de bancos de germoplasma organizadas tanto en el nivel nacional (e.g., REDBAG en España, RIBES en Italia) como en el internacional (e.g., GENMEDA, BANSEMAC, ENSCONET). Todo esto ha contribuido a que en la actualidad nos encontremos en una de las regiones del mundo con mayor densidad de bancos de germoplasma de plantas silvestres.

Desde su concepción inicial la labor de los bancos de semillas se ha desarrollado dentro de un marco conservacionista común pero de forma bastante independiente, de manera que cada uno ha perseguido sus propios fines. No obstante, el desarrollo de las redes de bancos de germoplasma anteriormente citadas, potenciadas en su mayor parte por fuentes de financiación externa, ha permitido conjugar esfuerzos, coordinar objetivos y compartir conocimientos sobre el tema. Este notable avance en materia de integración y coordinación llega en un momento clave en el que la sociedad advierte más que nunca la necesidad de tomar acciones para frenar la pérdida de la biodiversidad en el planeta. En este sentido el alto grado de coordinación que se está logrando entre bancos de germoplasma está permitiendo presentar una respuesta eficaz a los retos derivados de la pérdida de biodiversidad y una contribución notable a los objetivos contemplados para el año 2010 en el marco del Convenio sobre la Diversidad Biológica.

El libro «Conservación *ex situ* de plantas silvestres», que aquí se presenta, constituye un importante producto fruto de la colaboración y coordinación entre bancos de germoplasma anteriormente señalada. Merece la pena destacar en primer lugar el carácter multiparticipativo del mismo, contando con nada menos que la contribución de 33 autores procedentes de

España, Francia, Italia y Portugal. También es digna de mención la génesis de la presente edición, puesto que constituye el resultado de un proceso de revisión y mejora continuada de una versión inicial al que se le han ido incorporando nuevas aportaciones. Este sistema muestra un claro paralelismo con los desarrollos multiparticipativos de código abierto que estamos presenciando en la actualidad en torno a las nuevas tecnologías de la información y el desarrollo de software libre y que tan buenos resultados están dando. En esta nueva manera de desarrollar y mejorar sucesivamente un producto mediante pequeñas aportaciones de muchas personas, debemos apreciar una nueva forma de hacer las cosas y considerar que tal vez la presente edición de este libro no sea más que una etapa en el camino hacia nuevos resultados cada vez más completos y perfeccionados.

La concepción de esta obra posee un claro carácter enciclopédico abarcando todo el rango del espectro de temas técnicos, científicos y hasta de carácter político-legal vinculados a la conservación *ex situ* de la Flora Silvestre. Dada la escasez o incluso la práctica ausencia de textos en castellano en materia de conservación *ex situ* de plantas, este libro cubre una laguna editorial muy patente y no cabe duda de que cumplirá un papel muy importante en la formación de especialistas en esta área. Este tratado aborda con gran detalle numerosos temas vinculados a la recolección, gestión y preservación de semillas, pero incluye además información relativa a la conservación de otros propágulos vegetales menos conocidos como es el caso de las esporas de helechos y el polen. Igualmente, presenta técnicas alternativas a las convencionales como la crioconservación y la conservación *in vitro* que además de preservar semillas u otros propágulos antes citados, abren la puerta a la preservación de órganos y tejidos vegetativos. La gama de posibilidades que encierra la conservación *ex situ* es inmensa y este libro ofrece una buena panorámica de todas ellas. Sin embargo, no debemos olvidar que la conservación *ex situ* no constituye un fin en sí mismo y que todas las actuaciones que se lleven a cabo en su nombre han de realizarse como parte de una estrategia integral de conservación y con absoluto respeto a la integridad de las poblaciones naturales que al fin y al cabo se pretenden conservar. Por ello, estas actividades se deben realizar con un buen conocimiento del marco normativo internacional, abordado en el libro, y el cumplimiento de la legislación nacional y autonómica, en coordinación estrecha con las medidas de gestión y conservación que se estén implementando en el medio natural por parte de las autoridades competentes.

Sobre esta obra

Son muchos los bancos de germoplasma dedicados a la conservación *ex situ* de plantas silvestres, tanto los de nueva creación, como los que han adaptado su actividad hacia ello en los últimos años. Todos ellos requieren, cada vez más, de información básica sobre los procesos elementales de conservación de germoplasma, desde los más generalizados como la preservación de semillas en frío y en seco, hasta los modernos sistemas de crioconservación, conservación *in vitro* o la aplicación de las técnicas moleculares para las actividades de recolección. La creciente demanda de investigadores y técnicos relacionados con la conservación *ex situ* de plantas silvestres en los últimos años se ha visto reflejada, además, en el desarrollo de nuevos proyectos y publicaciones (principalmente en lengua inglesa) sobre conservación *ex situ* a escala nacional o internacional.

En este libro se pretende resumir los procesos básicos relacionados con la conservación de germoplasma de plantas silvestres, enfocados principalmente a la actividad de bancos de germoplasma, jardines botánicos y otras instituciones relacionadas con la conservación vegetal. El trabajo surgió inicialmente como adaptación del manual italiano editado por la *Agenzia per la Protezione dell’Ambiente e per i Servizi Tecnici* (APAT) y por el *Centro Conservazione Biodiversità* (CCB) de la Universidad de Cagliari, bajo el título *Manuale per la raccolta, studio, conservazione e gestione ex situ del germoplasma* (BACCHETTA & al., 2006). La incorporación de nuevos autores y la preparación de una edición revisada y ampliada en lengua castellana permitieron definir un volumen con un enfoque más amplio respecto al original, si bien manteniendo el carácter práctico de su antecesor.

El objetivo principal es ofrecer un compendio de información sobre las principales técnicas de conservación de germoplasma vegetal de plantas silvestres. La información incluida constituye la respuesta adaptativa de un colectivo de profesionales de la conservación de plantas (en su mayor parte ligados a centros de investigación y jardines botánicos del ámbito europeo y mediterráneo), ante la necesidad de establecer metodologías comunes y eficaces para afrontar la conservación *ex situ* en el contexto de la preservación de la diversidad vegetal. Dichas metodologías incluyen algunas de las principales técnicas que todo banco de germoplasma debería tener en cuenta para el desarrollo de su actividad, si bien enfocadas a partir de la experiencia de trabajo de los autores en sus respectivos centros de trabajo, intentando ofrecer un acceso directo y actualizado a la información más relevante en este campo.

Todo ello ha sido posible gracias a la colaboración e implicación de un gran número de instituciones y personas colaboradoras de nuestros centros de trabajo, así como a otros profesionales de la conservación de plantas y la botánica, sin las cuales este volumen no existiría. A todos ellos les agradecemos su implicación en este trabajo, y de un modo especial a Rosanna Augello, Edoardo Biondi, Carlo Blasi, François Boillot, Monica Casanovas, Massimo Cason, Donato Chiatante, Rosaria Congiu, Roberto Crosti, Tomás Emilio Díaz González, Eduardo

Fernández Pascual, José Antonio Fernández Prieto, red GENMEDA, Pep Luis Gradaille, Anna Guglielmo, Raquel Herreros, Jose María Iriondo, Simon Linington, Antoni Marzo, Nuria Membrives, Carlo Murgia, Pietro Perrino, Francesco Maria Raimondo, Alicia Roca, Marco Rossetto, Iván Sanzo Rodríguez, Mathilde Steffann, Costas Thanos, Pilar Ventimilla y Blas Vilches.

Los autores

Autores

- 1 Gianluigi BACCHETTA (bacchet@unica.it), profesor de botánica ambiental y aplicada en la Universidad de Cagliari (Cerdeña, Italia) y director del *Centro Conservazione Biodiversità* (CCB) dedicado a la investigación y conservación de especies silvestres. Su actividad se centra principalmente en la taxonomía y ecología de la flora silvestre y de la vegetación de Cerdeña y otras islas mediterráneas.
- 2 Daniel BALLESTEROS (daniel.ballesteros@uv.es), investigador de la Universidad de Valencia, realizó su formación doctoral en el Banco de Germoplasma del *Jardí Botànic de la Universitat de València-ICBiBE* (Comunidad Valenciana, España). Su actividad científica se centra en la conservación *ex situ* y a largo plazo de esporas de pteridófitos.
- 3 Piero BELLETTI (piero.belletti@unito.it), profesor de genética vegetal en la Universidad de Torino (Italia), donde se ocupa principalmente de la conservación de especies forestales y el análisis de su variabilidad genética.
- 4 Salvatore BRULLO (brullo@mbox.dipbot.unict.it), profesor de botánica en la Universidad de Catania, Sicilia. Su actividad personal se centra principalmente en la taxonomía y ecología de la flora silvestre del mediterráneo.
- 5 Álvaro BUENO (abueno@uniovi.es), investigador de la Universidad de Oviedo y conservador del Jardín Botánico Atlántico (España), donde coordina proyectos botánicos relacionados con la diversidad y conservación de plantas silvestres en el norte peninsular. Su actividad investigadora se centra en el estudio de la flora y vegetación cantábrica, principalmente hábitats costeros y de montaña.
- 6 Luisa CAGELLI (LUISA_CAGELLI@REGIONE.LOMBARDIA.IT), se ocupa del control de la comercialización y de la calidad del material forestal de multiplicación en la Región de Lombardia (Italia). Ha trabajado en el mejoramiento genético y la conservación *ex situ* de recursos genéticos de *Populus nigra* en el *Ente Nazionale Cellulosa e Carta* (Casale Monferrato, Italia).
- 7 Miriam CANO CASTILLO (miriam.cano@ua.es), investigadora en el Instituto de Investigación CIBIO de la Universidad de Alicante. Su línea de trabajo se centra en la conservación de especies vegetales raras o amenazadas mediante técnicas de cultivo *in vitro*.
- 8 Valentina CARASSO (valentina.carasso@virgilio.it), colaboradora del Banco de Germoplasma Vegetal de los Alpes sudoccidentales (Chiusa Pesio, Piemonte, Italia). En colaboración con la Universidad de Torino, el *Millenium Seed Bank* (UK) y la Universidad de Virginia (USA), trabaja en la conservación de especies de *Fritillaria* de los Alpes.
- 9 Elena CARRIÓ (elena.carrío@uv.es), investigadora del *Jardí Botànic de la Universitat de València-ICBiBE* (Comunidad Valenciana, España). Su actividad investigadora se centra en la biología reproductiva y las estrategias de conservación de flora amenazada, así como en la sistemática y los procesos evolutivos del género *Antirrhinum*.

- 10 José Luis CASAS (jl.casas@ua.es), Profesor Titular de Fisiología Vegetal en la Universidad de Alicante. Ha trabajado en diversos aspectos de la senescencia de órganos vegetales, particularmente frutos y flores climatéricas y recientemente se ha especializado en el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales aplicados a la conservación de la diversidad vegetal, terreno en el que ha desarrollado diversos proyectos y contratos de investigación para diseñar bancos de tejidos de especies silvestres amenazadas.
- 11 Juli CAUJAPÉ (julicaujape@gmail.com), responsable científico del Departamento de Biodiversidad Molecular y del Banco de ADN de la Flora Canaria del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo” (Islas Canarias, España). Sus investigaciones utilizan la información contenida en la molécula de ADN para ayudar a resolver problemas sobre orígenes filogeográficos, microevolución, conservación e identificación de la flora canaria y macaronésica.
- 12 Claudio CERVELLI (c.cervelli@istflori.it), investigador del *Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura* (Sanremo, Italia), donde participa en el desarrollo del uso ornamental de especies espontáneas o introducidas en el ambiente mediterráneo, en relación con la propagación y técnicas de cultivo, así como en actividades de divulgación de especies mediterráneas.
- 13 David DRAPER (david.draper@upm.es), conservador del Banco de Germoplasma Vegetal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (Universidad Politécnica de Madrid, España) y responsable del rescate de la flora afectada por el mayor embalse construido en Europa (Alqueva, Portugal). Su línea de investigación se centra en la conservación de especies de reducida área de distribución utilizando tanto técnicas de conservación *in situ* como *ex situ*.
- 14 M. Carmen ESCRIBÁ (singular_cief@gva.es), técnico del *Centre de Investigació i Experiències Forestals* (CIEF) de la Comunidad Valenciana, España. Su línea de trabajo se centra en la conservación *ex situ* de flora rara, endémica y amenazada de la Comunidad Valenciana, en relación con la caracterización de germoplasma (viabilidad y protocolos de germinación) y el desarrollo en vivero de planta para la creación de rocallas de flora endémica destinada a la educación ambiental.
- 15 Giuseppe FENU (gfenu@unica.it), investigador colaborador del *Centro Conservazione Biodiversità* (CCB) de la Universidad de Cagliari (Cerdeña, Italia). Su línea de trabajo se desarrolla en el ámbito de la conservación *in situ*, especialmente en la ecología y dinámica de poblaciones de plantas endémicas o de interés para la conservación en la isla de Cerdeña.
- 16 César GÓMEZ-CAMPO (gomezcampo@terra.es, cesar.gomez@upm.es), profesor emérito de la Universidad Politécnica de Madrid (España), donde fundó, en 1966, el primer banco de germoplasma vegetal de semillas silvestres del mundo. En los últimos años ha desarrollado una intensa actividad como asesor del personal científico y técnico de bancos de germoplasma de los cinco continentes, especialmente en los aspectos relacionados con la conservación eficaz de semillas.
- 17 Fabio GORIAN (f.gorian@corpoforestale.it), responsable del *Centro Nazionale per lo Studio e la Conservazione della Biodiversità Forestale* (Verona, Italia), donde se estudian, producen y conservan semillas y plantas forestales de procedencias italianas. Responsable de la red italiana “RENGER” y vicepresidente del grupo técnico de ISTA sobre las semillas de árboles y arbustos (*Forest tree and shrub seed committee-FTS*). Representante ISTA en la OECD (*Organization for economic co-operation and development*).

- 18 Oscar GRILLO (biologia@granicoltura.it), investigador del laboratorio de Biología de la *Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia* (Italia). Aplica la técnica de análisis de imagen en diferentes campos biológicos vegetales, incluyendo la identificación de semillas de plantas cultivadas y silvestres mediante morfo-colorimetría.
- 19 Jaime GÜEMES (jaime.guemes@uv.es), conservador del Jardín Botánico de la Universidad de Valencia y presidente de la Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas. Su línea de trabajo está relacionada con la sistemática (taxonomía, morfología, nomenclatura, filogenia) y con la conservación de flora amenazada (biología reproductiva, diversidad genética, dinámica de poblaciones).
- 20 Borja JIMÉNEZ-ALFARO (jimenezalfaro@uniovi.es), investigador de la Universidad de Oviedo y coordinador científico del programa de conservación vegetal en el Jardín Botánico Atlántico (España), incluyendo el desarrollo del Banco de Germoplasma Vegetal del Principado de Asturias. Su línea de trabajo se centra en la biología de la conservación de plantas de montaña, así como en el estudio de la diversidad y conservación de la flora cantábrica.
- 21 Efsio MATTANA (mattana.ef시오@tiscali.it), estudiante de doctorado de la Universidad de Cagliari (Botánica ambiental y aplicada), ha colaborado en el desarrollo y organización del banco de germoplasma de Cerdeña (BG-SAR). Su línea de trabajo incluye la conservación *ex situ* y la ecofisiología de la germinación de las plantas endémicas de Cerdeña.
- 22 Isabel MARQUES (icmarques@fc.ul.pt), ha participado en diversos proyectos relacionados con la caracterización y rescate de la flora afectada por el embalse de Alqueva (Portugal). Durante los últimos 5 años ha sido responsable de la caracterización del germoplasma del banco de semillas del *Jardim Botânico de la Universidade de Lisboa*. Actualmente su trabajo se centra en la evolución del género *Narcissus*.
- 23 Paolo MULÈ (metecol@hotmail.com), colaborador del *Centro Conservazione Biodiversità* (CCB) de la Universidad de Cagliari (Cerdeña, Italia), en donde se desarrollan actividades de investigación y conservación de plantas silvestres. Su actividad personal se centra principalmente en la germinación y crecimiento de plantas de la flora silvestre y de la vegetación de Cerdeña y las islas mediterráneas.
- 24 Massimo NEPI (nepi@unisi.it), investigador del Departamento de Ciencias Ambientales de la Universidad de Siena (Italia). Su línea de trabajo abarca la biología reproductiva de plantas superiores, en particular la ecofisiología de la polinización y su implicación para la conservación, así como los mecanismos de polinización de las gimnospermas y la longevidad y conservación del polen.
- 25 Ettore PACINI (pacini@unisi.it), profesor de Botánica en la Universidad de Siena (Italia). Su línea de trabajo abarca, desde el punto de vista citológico, varios aspectos de la biología de la reproducción de las angiospermas, así como los aspectos ecofisiológicos de la polinización de gimnospermas y angiospermas y la citofisiología y dispersión de semillas con elaiosomas.
- 26 Pietro PAVONE (pietropavone@yahoo.it), profesor de botánica de la Universidad de Catania (Sicilia, Italia) y responsable científico del Jardín Botánico (*Orto Botanico*) y el Banco de Germoplasma de dicha institución. Su línea de investigación se ha centrado en el ámbito de la geobotánica y la sistemática vegetal. Ha desarrollado estudios sobre el patrimonio histórico y natural

de los parques y jardines de Sicilia oriental, así como análisis etnobotánicos sobre el uso de plantas medicinales en el sur de Sicilia y sobre plantas silvestres comestibles mediterráneas.

- 27 Beti PIOTTO (beti.piotto@apat.it), responsable de la protección de la biodiversidad de los ecosistemas en el Departamento Defensa de la Naturaleza del Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA). Ha trabajado también en Argentina, Honduras y Libano, ocupándose (casi!) siempre de propagación de árboles y arbustos, así como de la recolección, conservación y pretratamiento de las semillas. Miembro del grupo técnico sobre semillas de árboles y arbustos del International Seed Testing Association.
- 28 Cristiano PONTECORVO (cristiano.pontecorvo@gmail.com), investigador del *Centro Conservazione Biodiversità* (CCB) de la Universidad de Cagliari (Cerdeña, Italia) y responsable de las rocallas de Biodiversidad del *Orto Botanico di Cagliari*, así como de las actividades de divulgación relacionadas con la botánica de conservación. Su línea de trabajo se centra principalmente en la flora de Cerdeña, y de un modo especial en su componente endémico.
- 29 Aranxa PRADA (gis_banco@gva.com), técnico del *Banc de Llavors Forestals* de la Generalitat Valenciana (Comunidad Valenciana, España). Trabaja en diferentes aspectos relacionados con la conservación *in situ* y *ex situ* de recursos genéticos de taxones arbóreos y arbustivos propios del ámbito mediterráneo.
- 30 Francisco SERRANO MARTÍNEZ (F.SERRANO@UA.ES), investigador del Instituto de Investigación CIBIO de la Universidad de Alicante. Su línea de trabajo se centra en la conservación de especies vegetales amenazadas o de interés mediante técnicas de cultivo *in vitro*.
- 31 Gianfranco VENORA (venora@granicoltura.it), responsable del laboratorio de Biología de la *Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia* (Sicilia, Italia), donde aplica técnicas de análisis de imagen en diferentes campos: estudios de las relaciones filéticas mediante análisis de cromosomas; análisis de las estructuras anatómicas vegetales en relación a la tolerancia a la aridez; morfo-colorimetría de semillas de plantas; y estimación de la calidad de materia vegetal alimentario.
- 32 Lorenzo VIETTO (lorenzo.vietto@entecra.it), investigador del *Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura* (Casale Monferrato, Italia). Responsable de la protección de la biodiversidad de Salicáceas (constitución, conservación y evaluación de los recursos genéticos de sauces y álamos) y de programas de mejoramiento genético y de selección clonal, además de aspectos sobre recalificación fluvial, gestión forestal sostenible y ecocertificación.
- 33 Myriam VIREVAIRE (m.virevaire@cbnmed.org), responsable científico del departamento de conservación del *Conservatoire Botanique National Méditerranéen* (Porquerolles, Francia), colaborando en el desarrollo del banco de semillas mediterráneo. Sus líneas de investigación se centran en la conservación *ex situ* de las semillas y en el desarrollo de la germinación y técnicas de cultivo de especies espontáneas, en relación con la conservación *in situ* de los hábitats naturales.

Índice

CONSERVACION *EX SITU* Y DIVERSIDAD VEGETAL

I La conservación <i>ex situ</i> de germoplasma vegetal	23
I.I ¿Qué es el germoplasma?	23
I.II La actividad de los bancos de germoplasma de plantas	26
I.III Los bancos de germoplasma en el marco de la conservación de biodiversidad	28
I.IV El papel de los jardines botánicos	30
Cuadro I	32
II Marco normativo y convenios para la protección de la biodiversidad	35
II.I Normativas y convenios internacionales	35
II.II Estrategias internacionales	38
II.III Acceso a los recursos genéticos	42
Cuadro II	44
III Redes de bancos de germoplasma	47
III.I Redes nacionales	47
III.II Redes europeas	53
Cuadro III	57

TECNICAS DE CONSERVACION *EX SITU*

1. Selección de prioridades	61
1.1 Marco general	63
1.2 Definición de objetivos en el ámbito geográfico y administrativo	65
1.3 Métodos de selección de prioridades florísticas	67
1.3.1 Clasificación de prioridades	67
1.3.2 Criterios de selección	68
1.3.3 Sistemas de valoración	72
1.4 Aplicaciones en la planificación de bancos de germoplasma	75
Cuadro 1	76
2. Muestreo de poblaciones	81
2.1 Pautas generales	83
2.2 Criterios geográficos	86
2.2.1 Información preliminar necesaria	87
2.2.2 Selección de las poblaciones	88
2.2.3 Herramientas	90
Cuadro 2a	95
2.3 Criterios genéticos	99

2.3.1 Técnicas de muestreo en la captura de diversidad genética	100
2.3.2 Consistencia de las subdivisiones <i>a priori</i> con los parámetros genéticos	102
2.3.3 Selección de los individuos a muestrear	107
2.3.4 Cantidad y tipo de material vegetal por planta	107
2.3.5 Consideraciones generales durante la recolección	108
Cuadro 2b	111
3. Biología reproductiva	117
3.1 Implicaciones de la biología reproductiva en la conservación <i>ex situ</i>	119
3.1.1 El sistema reproductivo	120
3.1.2 Conservación de la diversidad genética	121
3.1.3 Desarrollo de estrategias de regeneración de semillas	121
3.1.4 Fenómenos que afectan a la cantidad y calidad del material de recolección	122
3.1.5 Protocolos para la valoración de la estrategia reproductiva	123
3.2 Los procesos de dispersión	127
3.2.1 Influencia del vector y la forma	127
3.2.2 Eleosomas y dispersión de semillas en las plantas mediterráneas	130
3.3 El estudio de los bancos de semillas del suelo	133
Cuadro 3	135
4. Recolección y gestión	139
4.1 Recolección de semillas	141
4.1.1 Recolección en campo	141
4.1.2 Momento idóneo para la recolección	143
4.1.3 La prueba del corte	144
4.1.4 Protocolo de recolección	145
4.1.5 Procedimiento tipo para la recolección de semillas	145
4.2 Recopilación de datos en el campo y cumplimentación de fichas	147
4.2.1 Equipamiento para la recolección de germoplasma y datos asociados	147
4.3 Procedimientos para casos particulares	149
4.3.1 Recolección fallida de germoplasma	149
4.3.2 Poblaciones de dimensiones extremadamente reducidas	149
4.3.3 Daños biológicos en la población	149
4.3.4 Condiciones meteorológicas desfavorables	149
4.3.5 Recolección de pliegos de herbario y/o material vivo	149
4.3.6 Recolección de muestras de suelo	149
4.4 Recolección de polen	153
4.4.1 Introducción	153
4.4.2 Categorías de granos de polen	153
4.4.3 Necesidad de recoger polen	155
4.4.4 Control de la viabilidad	155

4.4.5 Métodos de recolección.....	157
4.5 Recolección de esporas.....	159
4.5.1 Introducción	159
4.5.2 Recolección de frondes de pteridófitos para la obtención de esporas.....	159
4.5.3 Elección de frondes adecuadas	160
4.5.4 Obtención de las esporas.....	160
4.5.5 Esterilización	161
4.6 Conservación preliminar de germoplasma.....	162
4.6.1 Conservación de las accesiones recolectadas en el campo	162
4.6.2 Extracción de semillas de los frutos.....	162
4.7 Entrega al Banco.....	163
4.7.1 Aceptación de las accesiones.....	163
4.7.2 Documentación adjunta a las accesiones.....	163
4.7.3 Estado fitosanitario del material recogido	163
4.7.4 Modalidades para el envío de las accesiones.....	164
4.7.5 Gestión de accesiones provenientes de otros centros	165
4.8 Gestión general del material.....	166
4.8.1 Gestión de datos y muestras.....	166
4.8.2 Gestión del material vegetativo	168
Cuadro 4	169
5. Tratamiento del germoplasma antes de su conservación	171
5.1 Ingreso del germoplasma en el banco	173
5.2 Cuarentena	175
5.3 Pruebas iniciales para la valoración de los lotes de entrada	176
5.4 Frutos carnosos.....	177
5.5 Post-maduración	178
5.6 Limpieza y manejo del germoplasma.....	179
5.6.1 Extracción manual.....	179
5.6.2 Extracción en frío	179
5.6.3 Extracción con calor.....	180
5.6.4 Métodos mecánicos	181
5.6.5 Métodos manuales o mixtos	182
5.7 Cuantificación de las accesiones y análisis del germoplasma.....	183
5.8 Caracterización del germoplasma	185
5.8.1 Capacidad germinativa	185
5.8.2 Pruebas de vigor germinativo	185
5.8.3 Viabilidad.....	186
5.8.4 Análisis de imagen.....	189
5.9 Desecado.....	194
5.9.1. Tolerancia a la deshidratación y categorías de conservación.....	194

5.9.2 Cámaras de desecado.....	197
5.9.3 Desecantes artificiales	198
Cuadro 5	200
6. Conservación y almacenamiento	205
6.1 Conservación <i>ex situ</i> de semillas	207
6.1.1 Introducción.....	207
6.1.2 Selección de envases.....	208
6.1.3 Ultradeseccación	211
6.1.4 El factor baja temperatura.....	214
6.1.5 La práctica de la conservación de semillas a largo plazo	214
6.1.6 Semillas recalcitrantes.....	219
6.2 Conservación <i>ex situ</i> de esporas de pteridófitos.....	221
6.2.1 Introducción	221
6.2.2 Contenido en agua y conservación de esporas de helechos	221
6.2.3 Conservación húmeda	222
6.2.4 Conservación seca a 4°C y -25°C.....	223
6.2.5 Ultrapreservación (-80°C y nitrógeno líquido).....	223
6.3 Conservación <i>ex situ</i> de polen.....	225
Cuadro 6	227
7. Conservación <i>in vitro</i> y criopreservación.....	229
7.1 La necesidad de nuevas herramientas de conservación.....	231
7.2 La tecnología del cultivo de células y tejidos vegetales: micropropagación	233
7.2.1 Fundamentos morfogénéticos de la micropropagación	233
7.2.2 Estructura de un protocolo de micropropagación.....	234
7.2.3 La conservación <i>in vitro</i> en el mundo.....	240
7.3 La tecnología de la criopreservación.....	242
7.3.1 Introducción.....	242
7.3.2 Bases teórico-prácticas de la crioconservación	242
7.3.3 Protocolos de criopreservación	244
7.3.4 Criopreservación de semillas.....	247
7.3.5 Criopreservación de otro material vegetal	250
Cuadro 7	252
8. Germinación.....	257
8.1 Definición de germinación	259
8.2 Factores ambientales y germinación.....	261
8.2.1 Humedad.....	261
8.2.2 Temperatura	261
8.2.3 Oxígeno	262

8.2.4 Luz.....	262
8.3 Impedimentos para la germinación: dormición	265
8.3.1 Método práctico para determinar el tipo de dormición en semillas no deshidratadas	267
8.4 Pretratamientos para romper la dormición	272
8.4.1 Estratificación fría o vernalización	272
8.4.2 Estratificación cálida o estivación.....	273
8.4.3 Ahumado.....	273
8.4.4 Escarificación.....	273
8.4.5 Aplicación de hormonas	275
8.4.6 Eliminación de las sustancias inhibitoras de la germinación	275
8.5 Consejos prácticos	276
8.5.1 Humedad.....	276
8.5.2 Temperatura.....	276
8.5.3 Luz.....	277
8.5.4 Hormonas.....	277
8.5.5 Empleo de productos fitosanitarios	277
8.5.6. Sustrato.....	277
8.6 Determinación y elaboración de protocolos	278
8.7 Análisis de resultados.....	282
8.7.1 Categorías de valoración	282
8.7.2 Porcentajes de germinación	282
8.7.3 Velocidad de germinación ("T50").....	282
8.7.4 Retardo germinativo	283
8.7.5 Tiempo medio de germinación	283
8.7.6 Valor Pico (VP) y Valor de Germinación (VG)	283
8.7.7 Otros parámetros	284
8.7.8 Curvas de interpretación.....	284
8.7.9 Análisis estadísticos	286
8.8 Ecofisiología de la germinación	287
8.8.1 Herramientas básicas de caracterización	287
8.8.2 Interpretación de los resultados	290
Cuadro 8	292
9. Colección activa y producción de plantas	297
9.1 Colección activa en bancos de germoplasma	299
9.1.1. <i>Index Seminum</i>	299
9.1.2 Duplicación de las accesiones.....	300
9.2 Producción de plantas a partir de semillas	301
9.3 Gestión de material vegetativo para propagación convencional	307
9.4 Producción de materiales de reproducción de árboles y arbustos.....	311

9.4.1 Introducción.....	311
9.4.2 Gestión de semillas de especies forestales.....	311
9.4.3 Propagación de germoplasma del género <i>Populus</i>	315
Cuadro 9	325
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	329
GLOSARIO	353
ENLACES DE INTERÉS	373

I La conservación *ex situ* de germoplasma vegetal

Los últimos 50 años han sido testigos de una evolución sin precedentes en nuestro conocimiento sobre la conservación y sus interrelaciones con el objetivo de alcanzar un desarrollo sostenible. La conservación es, desde luego, más que un concepto. A ella se ha dedicado mucho esfuerzo para resolver las bases científicas, técnicas, sociológicas y económicas implicadas en la implementación eficaz de las acciones de conservación. Esto se ha manifestado principalmente en el surgimiento de una disciplina conocida como *biología de la conservación*, como una respuesta de la comunidad científica a la ola de cambio global que amenaza una gran fracción de la diversidad biológica mundial. El desarrollo del concepto de la biología de la conservación está estrechamente relacionado con el de biodiversidad. Como aquélla, la noción de diversidad biológica, término posteriormente contraído como biodiversidad, fue desarrollada en los años 80, aunque sus orígenes se remontan a tiempo atrás (HEYWOOD & IRIONDO, 2003).

La biodiversidad mundial está disminuyendo a una velocidad sin precedentes. Durante el periodo 1996-2004, un total de 8321 especies vegetales fueron incorporadas a la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). El principal propósito de esta Lista Roja es catalogar los taxones que se enfrentan a un mayor riesgo de extinción global (ej. aquellos considerados de *en peligro crítico*, *en peligro* y *vulnerables*). Durante ese periodo ha habido también un aumento de más del 60% en el número de plantas consideradas en peligro crítico. Estos datos resultan sin duda alarmantes y requieren medidas inmediatas de conservación para salvaguardar muchas de estas especies.

Aunque la conservación de especies se aborda de un modo mucho más eficaz a través del manejo de las poblaciones silvestres y sus hábitat naturales (conservación *in situ*), las técnicas *ex situ* constituyen herramientas esenciales de conservación, cuya relevancia ha ganado reconocimiento internacional con su inclusión en el artículo 9 del Convenio sobre Diversidad Biológica y en el objetivo 8 de la Estrategia Global para la Conservación Vegetal (SARASAN & *al.*, 2006).

I.1 ¿Qué es el germoplasma?

De manera sintética, el *germoplasma* puede ser definido como cualquier material capaz de transmitir los caracteres hereditarios de una generación a otra (WITT, 1985). Se puede afirmar que el germoplasma representa la base física de la transmisión genética, o bien la suma de los genes y de los factores citoplasmáticos que rigen la herencia.

Al hablar de germoplasma vegetal, puede aludirse a distintas estructuras vegetales (esporas, tejidos o partes de plantas), incluyendo sus células y compuestos con información genética (ADN, ARN, etc.) y, de especial modo, las semillas. Éstas constituyen la estructura más representativa y evolucionada de las plantas superiores para su perpetuación, siendo además el agente de dispersión más frecuente, eficaz y con mayor capacidad de regenerar una planta vascular completa a largo plazo.

El término *germoplasma* está formado por la raíz *germen* (“inicio” u “origen”) y *plasma* (“formación”), definiéndose como todo “material genético capaz de regenerar otra materia viva igual o similar a la original” (PERRINO & TERZI, 2003). El término *germoplasma* hace referencia a cualquier forma de vida, pudiendo referirse, en virtud de diferentes rangos taxonómicos, a un género (ej. germoplasma de *Olea*), a una especie (ej. germoplasma de *Olea europaea* L.) o a alguna categoría taxonómica de rango inferior, como subespecie o variedad (ej. *O. europaea* L. var. *sylvestris* Brot.). La expresión *recursos genéticos* sustituye a menudo el concepto de germoplasma, refiriéndose contextualmente a un conjunto de especies o géneros (recursos genéticos vegetales, recursos genéticos microbianos, etc.) que ofrecen una utilidad económica, ambiental o de otro tipo.

Desde el momento en que las sociedades humanas desarrollaron la agricultura, la conservación de semillas se convirtió en una actividad necesaria para mantener los ciclos de recolección y siembra. La idea de preservar semillas de diferentes especies de todo el mundo en infraestructuras capaces de garantizar su viabilidad a largo plazo surgió en los años 20 y 30 del siglo XX, destacando la propuesta del científico ruso Nicolai Ivanovitch Vavilov (Koo & al., 2004). Una nación tan grande y en aquel momento tan pobre como Rusia, solicitó de Vavilov aumentar los suministros de germoplasma de las especies de uso alimenticio e industrial, y a la par proceder a su mejoramiento genético. Para lograr este objetivo, en casi treinta años se crearon y ordenaron enormes colecciones biológicas, conservado de este modo germoplasma vegetal *ex situ* (fuera de su lugar de origen) de forma sistemática, y definiendo algunos de los procedimientos básicos para la preservación de semillas.

Los centros encargados de la conservación de la biodiversidad contenida en el germoplasma suelen denominarse *bancos de germoplasma* o bien *bancos de semillas*, si el material conservado se basa principalmente en semillas. En la literatura anglosajona suele utilizarse el término *seedbanks* (bancos de semillas) o también en sentido amplio *genebanks* (bancos de genes), pudiendo incluir colecciones vivas, cultivos *in vitro* o bancos de ADN. Las muestras de material recolectado que se introducen en los bancos de germoplasma para su conservación suelen recibir el nombre de *accesiones* (también, aunque menos generalizado, *muestras o entradas*). Cada accesión representa la entrada en el banco de un lote de germoplasma relativo a una única recolección, para una unidad taxonómica determinada y una población biológica definida, identificada así de modo inequívoco.

Es importante subrayar que hasta hace pocos años los bancos de germoplasma centraban su interés casi exclusivamente en la conservación de las variedades agronómicas y de sus antecesores silvestres. De hecho, el 90% de todas las accesiones actualmente presentes en bancos de semillas está representado por especies de interés alimentario, muchas de ellas variedades de alimentos básicos (trigo, maíz, arroz, alubias, sorgo, etc.), que a una escala mundial se cultivan de forma intensiva, y que en conjunto tienen gran importancia económica. La actual profusión de bancos de semillas con vocación de preservar plantas silvestres raras o en riesgo de extinción es consecuencia de los acuerdos y obligaciones adoptados tras la Cumbre de la Tierra, celebrada en Río de Janeiro en 1992 para evitar la pérdida de diversidad biológica, y que quedó materializado en el Convenio de Diversidad Biológica (CDB).

Mucho antes del CDB, la primera iniciativa para la creación de un banco de semillas dedicado a plantas silvestres se desarrolló en 1966 en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos



Edificio de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM), donde se ubica el más antiguo banco de semillas dedicado a plantas silvestres del mundo.

de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM)¹. Como primer banco de germoplasma del mundo especializado en la conservación de plantas silvestres, este banco se centró primeramente en la conservación de especies de crucíferas silvestres, iniciando, a comienzos de los setenta, proyectos de conservación *ex situ* de plantas endémicas de la Península Ibérica y de la región Macaronésica.

Nadie discute hoy en día la importancia de conservar la diversidad. Basta considerar que la vida de todos depende, de forma directa o indirecta, de la diversidad biológica, ya que ésta garantiza la existencia y persistencia de condiciones idóneas para el ambiente y la evolución de la propia vida (PERRINO & TERZI, 2003). Gracias a las iniciativas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (www.fao.org), hoy en día existen millones de accesiones vegetales conservadas gracias a la actividad de 1.300 bancos de semillas. Ello representa, sin embargo, tan solo una pequeña fracción de la biodiversidad mundial, ya que numerosas regiones del planeta no han desarrollado aún acciones de este tipo, o se han dedicado principalmente a especies cultivadas. Los bancos dedicados a plantas silvestres utilizan los conceptos de rareza, amenaza, vulnerabilidad o endemidad como criterios orientativos para la selección de material a ser conservado (ver capítulo 1), sin por ello dejar de lado otras especies, cultivares o variedades igualmente importantes por su contribución a la biodiversidad.

I.II La actividad de los bancos de germoplasma de plantas

Desde hace 10.000 años, el germoplasma, y de manera específica las semillas, han sido conservadas de formas muy dispares, a través de su propagación continua o almacenamiento a corto plazo, con objeto de poder renovar los cultivos, obtener nuevas cosechas año tras año y trasladar nuevos cultivos a las tierras ganadas para la agricultura.

El primer banco de semillas del mundo moderno fue fundado en Rusia (San Petersburgo) en el año 1894, en el ámbito del Ministerio de Agricultura ruso, constituido en un inicio como una colección de semillas de plantas cultivadas. De 1921 a 1940 fue dirigido por Nicolai Ivanovitch Vavilov, quien enriqueció la colección gracias a las numerosas expediciones que realizó por todo el mundo, y que le sirvieron para desarrollar su teoría sobre los centros de origen de plantas cultivadas. Tras sufrir muchas vicisitudes y salvarse del cerco al que fue sometida la ciudad (entonces Leningrado) durante la Segunda Guerra Mundial, el banco de semillas continúa hoy funcionando bajo el nombre de Instituto Vavilov de Plantas Industriales. Terminada la guerra, los años 50 vieron la creación de nuevos centros en Europa del Este y en los Estados Unidos, en el marco de universidades y centros de investigación, con el objetivo principal de conservar germoplasma de plantas cultivadas de interés para la alimentación. Una de las primeras instituciones de este tipo fue constituida en Alemania del Este (Gasterleben) donde el Instituto Leibniz de Investigación de Recursos Genéticos de Plantas Cultivadas funciona desde hace más de 60 años. En Estados Unidos surgió también, en 1958, uno de los centros de conservación más ambiciosos del mundo, en el Campus de la Universidad estatal del Colorado (Fort Collins), a través del laboratorio nacional de conservación de semillas (HARTMANN & KESTER, 1990), dependiente del USDA (*United States Department of Agriculture*).

Algunos años después comienzan a aparecer bancos dedicados a conservar semillas de plantas silvestres, siguiendo el ejemplo pionero del de la UPM de Madrid, citado con anterioridad. En los años 80 del siglo XX, y tras ser consciente la comunidad científica internacional del problema creciente de pérdida de biodiversidad de las plantas silvestres, comienzan a generalizarse las instalaciones especializadas en conservar semillas de plantas amenazadas, principalmente en los países más desarrollados de Europa y América del Norte. Gran parte de estas instalaciones nacen en el seno de los jardines botánicos, cuya actividad también se reorienta, principalmente a partir de la década de los 70, a jugar un papel destacado en la conservación de las plantas, y de un modo especial a la conservación *ex situ*.

Hasta hace algunos años, la actividad de los bancos de germoplasma con accesiones de plantas silvestres se organizaba con base a la regeneración y conservación del mayor número de muestras de flora rara o amenazada, generalmente en el ámbito de los territorios de origen. El aumento del número de accesiones de estas colecciones derivó en problemas de gestión de espacio y de planificación de la actividad, prestando poca atención a la representatividad genética (intrapoblacional e interpoblacional) de cada taxón conservado. En los últimos años se ha demostrado la importancia de los controles genéticos y la necesidad de conservar poblaciones representativas, por lo que las actividades de recolección modernas se basan en una planificación rigurosa que permita conservar el mayor número de representatividad genética en el menor número posible de accesiones (ver capítulo 2).

En los últimos años también ha sido necesario corregir los mecanismos de conservación para los grupos taxonómicos que presentan dificultades derivadas de sus características biológicas (ej. *Orchidaceae*). En ocasiones algunos de los bancos nacidos en el seno de los jardines botánicos se preocuparon más en la conservación de especies exóticas u ornamentales, a menudo resultado de los tradicionales intercambios de *Index seminum* u otras colaboraciones, descuidando la conservación de especies autóctonas. En la actualidad, la situación ha dado un giro de 180 grados, y la función principal de los bancos de germoplasma nacidos y sustentados en los jardines botánicos se centra en la conservación de las plantas silvestres endémicas, raras y amenazadas, tomando como área primordial de trabajo las regiones geográficas en donde están ubicados.

Los bancos de germoplasma, en su concepción actual, constituyen sistemas esenciales para prevenir la pérdida de biodiversidad genética y garantizar así un futuro a las especies en peligro de extinción. Gran parte de las infraestructuras para la conservación de la biodiversidad nacen con el objetivo de contrarrestar la pérdida exponencial de especies, debida en parte a fenómenos naturales, y principalmente a las actividades antrópicas sobre los ambientes naturales (destrucción, contaminación, etc.). Su función no es sólo salvaguardar las semillas de las especies en peligro, sino también conservar, mediante técnicas de preservación a largo plazo, esporas, esquejes, tejidos o cualquier otro material que constituya parte de la biodiversidad genética del planeta (ver capítulos 6 y 7). En muchos centros de conservación de germoplasma especializados en flora silvestre se estudian además estrategias de actuación adecuadas para la conservación *in situ* de especies en peligro, disponiendo de la información necesaria sobre biología reproductiva (ver capítulo 3), germinación (ver capítulo 8) o métodos de producción vegetal (ver capítulo 9) que permitan desarrollar con éxito proyectos de recuperación. De este modo, la filosofía de la conservación converge, especialmente para los taxones con mayor riesgo de extinción, hacia las actividades de conservación *in situ*, con el fin de preservar las plantas directamente en su ambiente natural. Por este motivo, los centros de conservación de plantas han intensificado, junto a la conservación *ex situ*, los estudios sobre biología de la conservación, colaborando también en acciones administrativas para la conservación (ej. redes de espacios protegidos, redes ecológicas de conectividad territorial, etc.). En este sentido, la conservación *ex situ* debe considerarse como un instrumento de gran utilidad, indispensable para las intervenciones *in situ*, y de modo especial en casos extremos de extinción inminente de poblaciones naturales, como única vía posible para su preservación.

La actividad de conservación *ex situ*, tal y como se entiende actualmente, se dirige hacia la creación de colecciones ordenadas y organizadas en función de los hábitats presentes en un territorio, siendo imprescindible adquirir a la vez conocimiento de cómo cultivar las plantas amenazadas (ver capítulo 9) y cuáles son sus requerimientos ecológicos, con objeto de aplicarlos a la restauración de las poblaciones naturales. La conciencia de la necesidad de colaborar en la conservación del patrimonio vegetal ha crecido de tal modo que, en algunos casos, existen ejemplos en que los propietarios de los terrenos donde viven plantas silvestres raras o amenazadas colaboran directamente con las administraciones locales para la conservación de las mismas, involucrados directamente en los trabajos de campo, seguimiento y difusión de conocimientos adquiridos. Un ejemplo revelador lo representa el éxito de la experiencia desarrolla-

da en la Comunidad Valenciana (España), con el programa de microreservas de flora, y que se está exportando como modelo a otras regiones de Europa (LAGUNA & *al.*, 2004).

Los bancos de germoplasma actúan también como importantes centros de estudio en relación con los taxones representativos de hábitats de interés, o de especial importancia para la reconstrucción de áreas degradadas o amenazadas. En este contexto, las especies pioneras, estructurales o más adaptables pueden ser también analizadas, conservadas y regeneradas (ver capítulo 1). La pretensión no es, por lo tanto, conservar únicamente en el banco un gran número de semillas de plantas raras, sino también conocer y caracterizar el germoplasma bajo diferentes aspectos, con el fin de garantizar la conservación de la biodiversidad y posibilitar usos futuros.

El material vegetal conservado *ex situ* debe utilizarse para incrementar el conocimiento sobre la biología y ecología de plantas y, de modo particular, su ciclo reproductivo, con el fin de individualizar las etapas más sensibles, activando estrategias de tipo *ex situ* para la experimentación sucesiva en el terreno donde se pretende reconstruir o reforzar las poblaciones *in situ*. Resulta también fundamental la elaboración de técnicas de propagación, por vía sexual o vegetativa, con el fin de asegurar la efectiva conservación *ex situ* y la sucesiva regeneración. Con especial cuidado debe considerarse la utilización de semillas para la realización de los ensayos de germinación o de viabilidad, así como para las tipologías de estudios y análisis que contemplen la destrucción de semillas u otro germoplasma.

En resumen, conservar germoplasma en los bancos de semillas no es como conservar libros en los estantes de una biblioteca. Es algo vivo y dinámico, quizás más próximo a la gestión de animales en un parque zoológico o al cuidado de las colecciones de plantas vivas en un jardín botánico (actividad que por otro lado contribuye a la conservación *ex situ*), ya que las semillas son también entidades vivas que requieren, para conservarse bien y a largo plazo, cuidados y técnicas específicas de mantenimiento o verificación (KOO & *al.*, 2004).

I.III Los bancos de germoplasma en el marco de la conservación de biodiversidad

Los bancos de germoplasma especializados en la conservación de plantas silvestres juegan un papel clave y fundamental en las políticas de conservación de la biodiversidad. En función de las necesidades de conservación, cada vez es más frecuente que los técnicos e investigadores de los centros de conservación *ex situ* participen activamente en el diseño, desarrollo y ejecución de programas de conservación *in situ*, destinados a que todas las acciones de conservación permitan la preservación de plantas silvestres en sus biotopos y hábitats naturales.

En un mundo globalizado como el actual, en el que las desigualdades entre países son cada vez mayores, y los países pobres son los que mayor biodiversidad poseen y menos recursos disponen para conservarla, es imprescindible establecer acciones conjuntas de cooperación. Los modelos decimonónicos de almacenamiento de especies en museos metropolitanos de historia natural o en grandiosos jardines botánicos han quedado obsoletos, por lo que la conservación de la diversidad biológica mundial es una responsabilidad de todos. En la actualidad, y

especialmente tras la Segunda Guerra Mundial, los centros de conservación de biodiversidad deben ser escrupulosamente respetuosos con la propiedad de los recursos genéticos, y crear sistemas de participación y corresponsabilidad con terceros países (ver capítulo II). La tendencia actual va dirigida a la creación de pequeños centros que funcionan coordinados en redes nacionales o plurinacionales (ver capítulo III), y que se dedican a trabajar en la conservación de las plantas que viven en su ámbito geográfico más cercano. De manera complementaria, los centros con mayores recursos colaboran en la conservación de la diversidad de los territorios lejanos con necesidades urgentes, intentando siempre que la propiedad de la biodiversidad y su riqueza no abandonen los países de origen de la misma (ver cuadro II).

La delimitación del área geográfica de competencia constituye un aspecto fundamental para la determinación de los programas y las políticas de intervención de los bancos de germoplasma actuales. Para una correcta gestión del territorio y una coherente labor de conservación y defensa de la biodiversidad, es necesario delimitar el área geográfica de origen de las accesiones, activándose una red de contactos y un intercambio de información bidireccional con otros organismos involucrados en la protección de la naturaleza y su valoración (administraciones locales, espacios protegidos, universidades, jardines o estaciones botánicas, laboratorios de investigación, asociaciones, aficionados privados, etc.). Es en este contexto en el que se hace posible la colaboración y el intercambio de germoplasma, recursos económicos y conocimientos. Siguiendo este objetivo, cada banco de germoplasma debe estructurarse en modo tal que pueda garantizar que la recolección de material se realice con total respeto a las normativas vigentes en el ámbito local, nacional, y regional, cumpliendo de igual modo los convenios internacionales que regulan estas actividades, principalmente derivados del Convenio de Diversidad Biológica (CDB). Con ese fin, cada banco de germoplasma debe cuidar con especial atención la obtención y actualización de permisos y autorizaciones correspondientes, evaluando la preparación científica y técnica de sus colaboradores, y garantizando prácticas respetuosas frente a terceros.

El papel de los bancos de germoplasma incluye, además, tareas de divulgación pública de sus iniciativas, de concienciación social del problema de crisis de extinción, y de creación y colaboración en las redes de conservación, generando un continuo cambio de conocimientos y actualización del desarrollo de los trabajos realizados. La participación de los recolectores, en muchas ocasiones voluntarios, implica una comunicación periódica sobre los planes de gestión desarrollados para el material recogido, haciéndoles partícipes de los objetivos del proyecto, y motivándoles para la continuación de su colaboración.

El reto de intentar detener la pérdida de biodiversidad vegetal es enorme, y si ya son costosas e insuficientes las medidas que se están adoptando en los países ricos, hay que buscar medidas imaginativas y de cooperación con los países pobres y/o mega diversos, sometidos al torbellino de destrucción y extinción de los recursos naturales del que todos somos responsables.

I.IV El papel de los jardines botánicos

Los jardines botánicos, como lugar de cultivo de plantas con una finalidad distinta de la ornamental, son muy antiguos. Seguramente tan antiguos como el interés del hombre por conocer las plantas y sus usos, por lo que algunos autores los identifican ya en las antiguas culturas mesopotámica, egipcia, oriental o precolombina. Los jardines históricos reunían plantas para su estudio, aclimatación o generación de conocimiento, ya que tanto la ciencia (la ampliación del conocimiento) como la docencia (la transmisión del saber) fueron motivos fundamentales por los que se instauraron jardines botánicos.

Sin embargo, interpretaciones más restrictivas del concepto de jardín botánico fijan su origen en la Europa renacentista y siempre al amparo de las universidades, lugar dónde investigación y academia se reunían. Los jardines botánicos más antiguos surgieron en Italia (Pisa -1544, Padova y Florencia-1545-, Boloña -1567-), España (Valencia -1567-), Países Bajos (Leiden -1590-), Francia (Montpellier -1593-) y Alemania (Heidelberg -1597-) como consecuencia de la necesidad de las facultades de medicina para poder explicar a sus alumnos qué plantas eran medicinales y cuáles eran sus usos. Desde entonces los jardines botánicos han ido cambiando su orientación y su finalidad, como consecuencia de los cambios producidos en el interés de la sociedad (y con ellos de la universidad) por las plantas. Los siglos XVIII y XIX se caracterizan por el cultivo de las plantas procedentes de expediciones científicas a los lugares más remotos. En los jardines botánicos se cultivan las semillas colectadas por los expedicionarios, mientras que las plantas vivas que surgen de ellas sirven para describir infinidad de especies nuevas. Linneo (Jardín Botánico de Uppsala), Lamarck (Jardín del Rey de París) o Cavanilles (Real Jardín Botánico de Madrid) son algunos protagonistas de esta relación entre jardines botánicos y ampliación de los conocimientos botánicos. También se hacen ensayos de aclimatación y, desde los botánicos, numerosas especies se trasladan a la agricultura, por su capacidad productiva, o a los jardines, por su interés ornamental.

El final del siglo XX trae consigo la crisis de la biodiversidad y la pérdida alarmante de especies silvestres, muchas de las cuales son vegetales. Los jardines botánicos, lugares con gran experiencia en el manejo de semillas y con personal capacitado para el cultivo de plantas, se convierten en los centros apropiados para desarrollar estrategias de conservación *ex situ* de las especies amenazadas. Los jardines botánicos son hoy lugares con una elevada concentración de especies de plantas vasculares procedentes de poblaciones naturales de origen conocido y cultivadas o conservadas en condiciones controladas. Gran parte de estas especies se encuentran amenazadas en sus hábitats naturales y los jardines botánicos se convierten así en centros clave para el desarrollo de estrategias de conservación *ex situ* desarrollada a escala mundial.

En la actualidad hay unos 2000 jardines botánicos distribuidos por todos los países del mundo. En ellos se cultivan casi un tercio de las especies de plantas vasculares conocidas, lo que supone unas 100.000 especies diferentes, representadas por unos 4.000.000 de accesiones. También se cultivan en ellos decenas de miles de variedades de especies cultivadas de importancia económica (WYSE JACKSON & SUTHERLAND, 2000). En algunos casos se ha podido documentar la desaparición de especies en la naturaleza a la vez que se mantenían en cultivo en algún jardín botánico. Algunos ejemplos clásicos son los de *Encephalartos woodii* Sander, *Sophora toromiro*



(Foto A. Späni).

Entrada al Jardín Botánico Atlántico (Gijón, España), institución creada en el año 2003, y en cuyos objetivos prioritarios figura el desarrollo de las estrategias de conservación estipuladas en el CDB.

Skottsbo. o *Lysimachia minoricensis* J.J.Rodr. (ver cuadro I). En algunos casos se han hecho intentos por devolver a la naturaleza estas especies “refugiadas” en los jardines botánicos, en la mayor parte de los casos infructuosos.

Por la labor desempeñada hasta ahora, y de manera especial por su capacidad actual y potencial, el papel de los jardines botánicos en la conservación de la biodiversidad vegetal aparece en todos los documentos y tratados relacionados con el CDB. Desde el punto de vista del manejo y producción de plantas, la posibilidad de desarrollar estrategias de conservación *ex situ* en los jardines botánicos pasa principalmente por el desarrollo de colecciones de plantas vivas y por la creación de bancos de germoplasma, entendiendo como tales aquellas instalaciones donde se conservan a largo plazo semillas, esporas, granos de polen o tejidos con capacidad para regenerar una planta completa.

La conservación *ex situ* frente a la extinción de especies

Recuperación de *Diplotaxis siettiana* en la Isla de Alborán

Diplotaxis siettiana Maire (*Brassicaceae*) es una planta endémica de la pequeña isla de Alborán, en realidad la cumbre emergida de una plataforma volcánica situada a 50 km. de la costa, entre España y Marruecos. La planta fue vista por última vez en 1974, momento en que se recolectaron semillas antes de que la reducida población se extinguiese, debido a la alteración de su área de ocupación, derivada de la construcción de una plataforma de helicópteros militares construida por el ejército español. *Diplotaxis siettiana* se comportaba como una especie ruderal y oportunista, por lo que su tamaño poblacional y situación original es difícil de estimar. Las semillas recogidas fueron conservadas en el Banco de Germoplasma de la Universidad Politécnica de Madrid durante más de 20 años, y repartidas por diferentes jardines botánicos. Después de dos intentos infructuosos, en 1999 se llevó a cabo una reintroducción en la Isla, permitiendo que actualmente sobreviva una población de 48 plantas, cuya viabilidad futura es un misterio. Sin embargo, la reintroducción llevada a cabo ha permitido que la planta pase a considerarse como En Peligro Crítico según las categorías de la UICN, en lugar de “Extinguida en estado silvestre” (MORENO SAIZ & al., 2006).

Recuperación de *Lysimachia minoricensis* en Menorca

Lysimachia minoricensis J.J. Rodr. (*Primulaceae*) es una especie endémica de la isla de Menorca, donde fue descubierta a finales del siglo XIX en el fondo de los barrancos calizos del sur. Apenas medio siglo después se dio por extinguida en estado silvestre, quizá por causas naturales, al no encontrarse ningún ejemplar en las localidades naturales. La recolección de semillas que había realizado el Jardín Botánico de Barcelona en la población original, a principios del siglo XX, salvó la planta de la desaparición definitiva. Desde el Jardín de Barcelona se repartieron semillas a varios jardines botánicos europeos y en todos ellos se pudo cultivar la planta y aún se mantienen colecciones vivas. A partir de estas semillas se ha intentado en diversas ocasiones la reintroducción de la especie en su hábitat natural (GALICIA HERBADA, 2004). Finalmente, la reintroducción llevada a cabo en 1997 por el Jardín Botánico de Sóller ha conseguido la formación de una población reproductiva estable. Todo ello se debió, en parte, a la capacidad reproductiva que mantenía la especie, por lo que cree que su extinción se debió a factores extrínsecos (ROSELLÓ & MAYOL, 2002). *Lysimachia minoricensis* está actualmente protegida legalmente en Europa por el Convenio Europeo sobre la conservación de especies y hábitats naturales. En España está protegida por el Real Decreto que recoge el catálogo nacional de especies amenazadas.

Reintroducción de *Sophora toromino* en la isla de Pascua

Sophora toromino Skottsb. (*Fabaceae*) es la única especie arbórea de la Isla de Pascua. Fue descrita en 1774, y considerada como extinguida en estado silvestre en los años 60 del siglo XX, como consecuencia de la alteración del hábitat producida por siglos de intervención humana en la isla. Sin embargo, en 1988 se encontró un ejemplar cultivado en el Jardín Botánico de Bonn y se pudo saber que también se cultivaba en otros jardines botánicos europeos como el de Gothenburg (LOBIN & BARTHLOTT, 1988). A partir del descubrimiento se inició un programa de propagación de la especie con la finalidad de reintroducirlo de nuevo en la naturaleza. En 1996 se plantaron en la Isla de Pascua 180 ejemplares cultivados en los jardines botánicos de Bonn y Gothenburg. Sin embargo, la introducción fracasó y más del 80% de los individuos desaparecieron en poco tiempo y el resto algo más tarde. Los tests genéticos realizados sobre el material introducido demostraron que la diversidad genética era mínima y que el programa de propagación se había basado en individuos genéticamente idénticos (BARTHLOTT & *al.*, 2000). Debido a ello, es posible que la especie no pueda volver a formar poblaciones estables en estado silvestre, aunque queda el consuelo de tener aún ejemplares vivos de la planta. Si en lugar de individuos aislados, la conservación *ex situ* se hubiese desarrollado según los cánones actuales, el éxito de la reintroducción hubiese sido mayor.

Cultivo *ex situ* de *Biarum dispar* en Cerdeña

Biarum dispar (Schott) Talavera (*Araceae*) es una planta endémica de Cerdeña y África del norte, cuya única población conocida se encontraba en las proximidades del complejo histórico de Su Nuraxi (Samatzai, Cagliari), yacimiento arqueológico de restos de la cultura nurágica prerromana en Cerdeña. La necesidad de realizar excavaciones hizo necesaria una actuación del *Orto Botanico di Cagliari*, para la translocación completa de la población en el año 2005. Los cerca de 200 individuos de la población fueron transplantados en el sector destinado a la familia *Araceae* del *Orto Botanico*, área que resultó apropiada por su semejanza microclimática y edáfica con el hábitat original de la población. La ubicación de las plantas favoreció además la reproducción natural entre ellas, por lo que durante los años sucesivos ha sido posible recolectar semillas para su conservación en el banco de semillas BG-SAR. El éxito de la traslocación se traduce en dos aspectos: la alta viabilidad de las plantas transplantadas (incluso aumentando el número original) y la disponibilidad de semillas representativas de la población. Ambas actuaciones permitirán, en el futuro, realizar campañas de reintroducción de *Biarum dispar* en el área arqueológica o en sus inmediaciones.



Preparación de parcelas para la translocación de bulbos de *Narcissus cavallinesii*

Translocación de *Narcissus cavanillesii* en Portugal

Narcissus cavanillesii A.Barra & G.López (*Amaryllidaceae*) es un geófito de floración otoñal, endémico del sur de la Península Ibérica y Norte de África (Argelia y Marruecos) y protegido por los Anexos II y IV de la Directiva Habitat 92/43/CEE. Una de dos únicas poblaciones conocidas en Portugal (Montes Juntos) iba a ser inundada por el embalse del Alqueva, de no haberse realizado una difícil y costosa operación de translocación, novedosa en el ámbito de la conservación de plantas en la Península Ibérica. Entre los años 2001- 2004 un equipo hispano-luso (ROSSELLÓ-GRAELL & *al.*, 2002) desarrolló la compleja operación de salvar esta población de las aguas del embalse, llevándola a una nueva localidad. Para ello se translocó el 95 % de la población afectada, después de una serie de análisis enfocados a localizar el biotopo más adecuado para ubicar la población (a través de análisis SIG, modelos climáticos, modelización de habitats, análisis de suelos, etc.). Tras la translocación sólo floreció un 24.57% de los individuos que habían florecido en la época anterior. Este bajo porcentaje se atribuyó a que el tipo de sustrato en donde vivía la planta presentó grandes problemas técnicos: su heterogeneidad impedía un ataque en profundidad obligando a una gran manipulación y con una mayor alteración del suelo. Aún es pronto para conocer el éxito a largo plazo de la translocación realizada, aunque los próximos años permitirán una evaluación de los resultados, tras el seguimiento de la población en su nueva ubicación.

II Marco normativo y convenios para la protección de la biodiversidad

II.I Normativas y convenios internacionales

La protección de la biodiversidad vegetal está regulada por tratados y convenios internacionales, por directivas y reglamentos comunitarios, y por leyes de carácter nacional y regional; a continuación se enumeran, de manera cronológica, las principales normativas que han sido aprobadas hasta este momento, a diferentes niveles.

Convenio de Washington – CITES

El convenio CITES, de 1973, sobre el “Comercio Internacional de Especies Amenazadas”, fue adoptado con el Reglamento CE n. 338/1997 de la Unión Europea y posteriormente ratificado en la mayor parte de los países europeos. La normativa de aplicación del reglamento está incluida en el Reg. (CE) n. 1808 del 30 agosto 2001 (COMUNIDAD EUROPEA, 2001). En el Anexo I del convenio se enumeran las especies en peligro de extinción que están dañadas o pueden estarlo con su comercio; en el Anexo II se indican las especies que, aunque en la actualidad no se encuentran en peligro de extinción, podrían estarlo en un futuro si su comercio no se somete a una rígida reglamentación; mientras que en el Anexo III se encuentran las especies identificadas por las partes cuyo comercio debe ser reglamentado.

Para la importación, exportación y/o introducción de las especies incluidas en dichos anexos, es necesario obtener, para cada envío y siguiendo las disposiciones de los artículos 3, 4 y 5 del Convenio, un certificado conforme a las disposiciones del artículo 6 y siguiendo el esquema del Anexo IV. Este permiso, que debe de ser emitido por una Autoridad Administrativa del Estado, tendrá una validez de seis meses a partir de su fecha de emisión. Las disposiciones de estos artículos no serán aplicables a intercambios de germoplasma o *exsiccata*, que estén acompañados de un informe conforme el Anexo IV del Reglamento (CE) 1808/2001, entre centros de investigación o instituciones científicas registradas.

Con el Reglamento (CE) n. 349/2003 del 25 febrero 2003, la Comisión Europea suspendió la introducción, dentro del territorio de la UE, de ejemplares de las especies de fauna y flora silvestre incluidas en los Anexos. Dichos anexos fueron actualizados el 23 de junio de 2005, y están disponibles para su descarga en la dirección <http://www.cites.org>.

Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB)

El Convenio sobre la Diversidad Biológica, firmado por 150 naciones en la Conferencia de las Naciones Unidas “Sobre el Ambiente y el Desarrollo”, en Río de Janeiro del 3 al 14 de junio de 1992, representa la primera iniciativa a escala planetaria para la conservación de la biodiversidad y define las líneas directrices para la elaboración de estrategias comunes para la protección de animales, vegetales y hábitats, introduciendo de un modo implícito los conceptos de conservación *in situ* y *ex situ* (WILLIAMS & *al.*, 2003).



Gentiana lutea L. subsp. *lutea*, planta protegida por CITES (foto: R. Guarino)

Convenio de Berna

El Convenio de Berna sobre la “Protección de la Vida Silvestre y del Ambiente Natural en Europa”, firmado por los estados miembros en 1979, presenta en el Anexo I una relación de las especies de flora silvestre rigurosamente protegidas, cuya recolección, colección, corte o erradicación intencionada está prohibida (COMUNIDAD ECONÓMICA EUROPEA, 1982). El artículo 9 del Convenio prevé que cada parte contratante pueda conceder derogaciones al artículo 5, “(...) *en el interés por la protección de la flora y de la fauna; para prevenir importantes daños a cultivos, animales, zonas de bosque, reservas de pesca, aguas y otras formas de propiedad; en interés por la salud y seguridad pública, la seguridad aérea, o de otros intereses públicos prioritarios; para fines educativos o de investigación, para la repoblación, la reintroducción y para el mantenimiento necesario; para permitir, bajo estricto control, de forma selectiva y dentro de límites precisos, la captura, la detención u otros aprovechamientos juiciosos de pocos ejemplares de algunos animales o plantas silvestres.*”

Primera conferencia ministerial sobre protección de bosques en Europa (MCPFE)

En el ámbito de los recursos genéticos forestales, la Primera Conferencia Interministerial para la Protección de los Bosques en Europa, desarrollada en Estrasburgo en 1990, afrontó la conservación de dichos recursos estimulando de este modo la toma de decisiones conjuntas a nivel de toda Europa. Se busca establecer estrategias comunes, dado el carácter transfronterizo de los recursos genéticos, la responsabilidad que necesariamente debe de ser compartida y la mayor eficacia en la conservación de la variabilidad intraespecífica que se obtiene con esta filosofía. De esta manera, se ha propuesto una cooperación técnico-científica a través de una serie de acciones y resoluciones. En particular, la resolución n. 2 sobre la conservación de los recursos genéticos forestales se basa en los siguientes principios:

- Aplicación de acciones inmediatas en base a los recursos disponibles.
- Primar el empleo de métodos simples y asegurar su aplicación a largo plazo.
- Conservar la variabilidad genotípica a todos los niveles.
- Subrayar la aplicación de métodos *in situ* integrados en la gestión forestal, complementados, cuando sea necesario, con la conservación *ex situ*.
- Conservar tanto especies como ecosistemas forestales raros.
- Implementar a nivel nacional medidas específicas para la conservación de los recursos genéticos en base a los principios anteriormente mencionados, en particular en lo referente a técnicas de silvicultura y al movimiento y gestión del material forestal de multiplicación.

Directiva 92/43/CEE relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la flora y fauna silvestre

Representa el principal instrumento para la protección de las especies de interés comunitario, considerando en su artículo II “*las especies animales y vegetales de interés comunitario cuya conservación requiere la designación de Zonas Especiales de Conservación*”; en el artículo IV “*las especies animales y vegetales de interés comunitario que requieren de una rigurosa protección*” y en el artículo V “*las especies animales y vegetales de interés comunitario cuya extracción de la*

naturaleza y su aprovechamiento podrían ser objeto de medidas de gestión”. Los listados de esta directiva fueron posteriormente actualizados mediante los anexos de la Directiva 97/62/CEE, (...) *por la que se adapta al progreso científico y técnico la directiva 92/43/CEE, (...)*.

Directiva 1999/105/CE sobre comercialización de materiales forestales de reproducción

La Directiva 1999/105/CE pretende fomentar la transparencia en el mercado de los frutos, semillas, partes de plantas y plantas de las principales especies empleadas en las forestaciones y restauraciones, a través del establecimiento de unos mecanismos de caracterización y control a lo largo de los procesos de producción y comercialización. Una de las novedades introducidas en esta normativa es el concepto de “región de procedencia”, que se define para cada especie o subespecie como *«la zona o el grupo de zonas sujetas a condiciones ecológicas suficientemente uniformes en las que se encuentran fuentes semilleras o rodales que presentan características fenotípicas o genéticas semejantes, teniendo en cuenta límites de altitud, cuando proceda»*. Así, los Estados Miembros de la Unión Europea están obligados a establecer dichas regiones y publicar sus respectivos mapas.

Aunque esta normativa tiene su aplicación en las fases de producción y comercialización, y no en la utilización que se haga de los materiales de reproducción, resulta una herramienta interesante para la promoción de la conservación de los recursos genéticos de numerosas especies forestales. Así, la directiva aconseja de manera explícita el uso de las procedencias locales, bien adaptadas, en el caso de especies autóctonas. Por otra parte, la delimitación de las regiones de procedencia y la trazabilidad del material permiten a los técnicos que redactan los proyectos la inclusión de requisitos específicos en relación con el origen y las características del material a emplear en las restauraciones.

II.II Estrategias internacionales

Listas Rojas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN)

Aunque no representan una forma de protección, la elaboración de las Listas Rojas y Azules siguiendo las categorías de la UICN, constituyen un elemento fundamental para la protección de la flora. Además, la inclusión de un determinado taxón en una lista suele proporcionar una gran cantidad de datos relevantes para establecer las medidas de protección más adecuadas. En función de los datos disponibles, un taxón puede ser incluido en alguna de las siguientes categorías (IUCN, 1994, 2001):

- Extinto (EX).
- Extinto en estado silvestre (EW).
- En peligro crítico (CR).
- En peligro (EN).
- Vulnerable (VU).
- Casi amenazado (NT).
- Preocupación menor (LC).
- Datos insuficientes (DD).
- No evaluado (NE).



Aquilegia barbaricina Arrigoni & Nardi, planta en peligro crítico (CR) incluida por la UICN en el "TOP 50 Mediterranean Island Plants". (foto E. Mattana).

Los criterios para la inclusión de los taxones en las diferentes categorías están establecidos tanto a nivel nacional como regional, siguiendo los estándares internacionales de la UICN (IUCN 2003A, 2003B). En algunos casos se aplican perspectivas geográficas más amplias para la elaboración de categorías de amenaza, como la checklist de las 50 especies de las Islas del Mediterráneo en mayor peligro (*TOP 50 Mediterranean Island Plants*) (MONTMOLLIN DE & STRAHM, 2005).

Estrategia Global para la Conservación de las Plantas (EGCP)

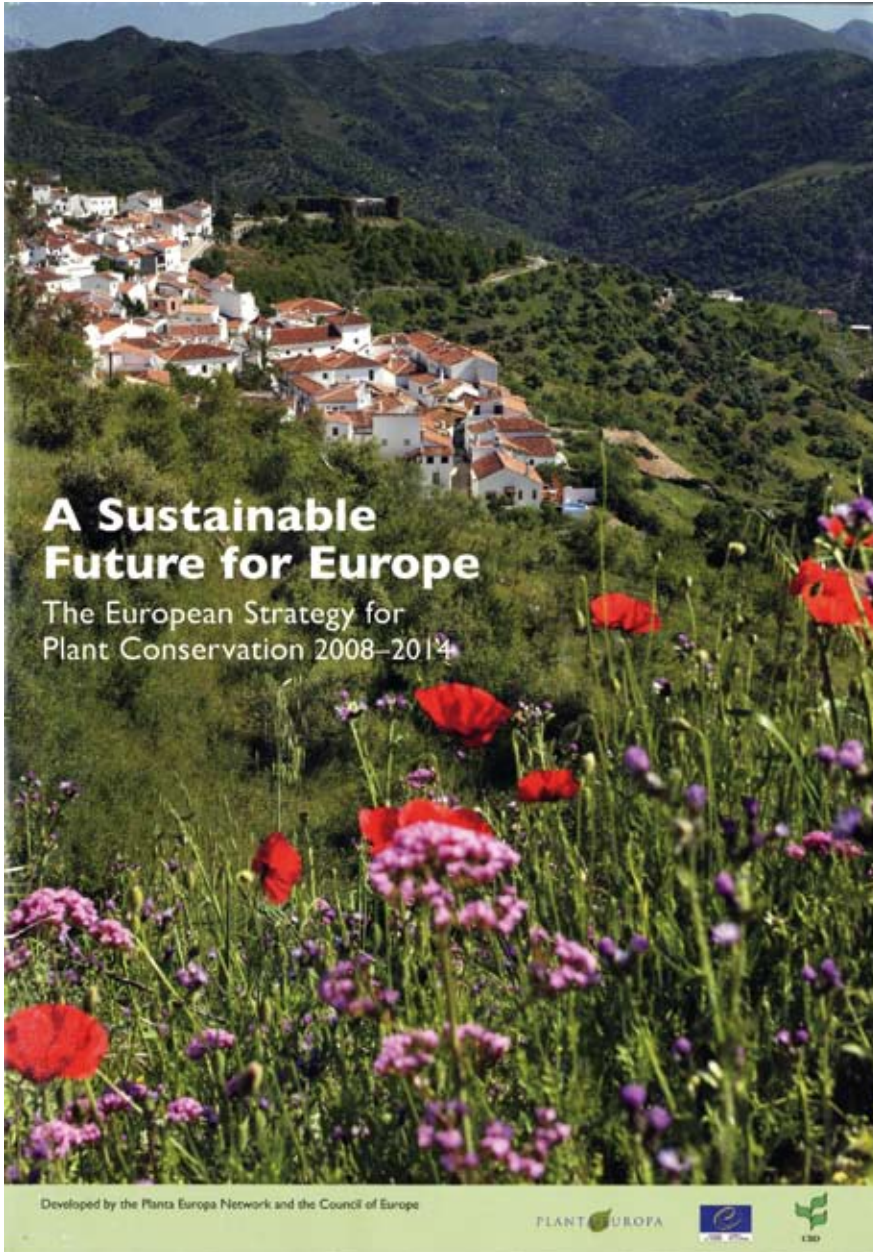
Se trata de un plan estratégico global definido en el año 2002 (Resolución VI/9, como *Global Strategy for Plant Conservation* o GSPC) y promovido por el Secretariado del Convenio de Diversidad Biológica (CDB) de la ONU y *United Nations Environment Programs* (UNEP) en asociación con *Botanic Garden Conservation International* (BGCI). Entre los diferentes objetivos que se establecen, destaca la conservación *ex situ* del 60% de las especies amenazadas, con prioridad en los países de origen de las mismas, y el desarrollo de proyectos para la multiplicación y posterior reintroducción del 10% de estas especies, antes del 2010 (objetivo 8).

La estrategia prevé explícitamente que ninguna planta silvestre deba ser puesta en peligro a causa de su comercio o de su aprovechamiento no sostenible, y que al menos el 30% de los productos de origen vegetal deban proceder de recursos gestionados de forma sostenible. Además, la importancia de la diversidad vegetal y la necesidad de su conservación debe incorporarse en los programas de comunicación y sensibilización de la opinión pública. Con el fin de alcanzar dichos objetivos, la EGCP incentiva la creación y el refuerzo de redes para la conservación de las plantas a escala regional, nacional e internacional.

Global 200

La conservación y gestión del territorio a escala del paisaje y del ecosistema es la base de un proceso denominado “conservación ecorregional” (ERC, *EcoRegional Conservation*) que se está rápidamente confirmando como una estrategia eficaz y necesaria para el mantenimiento de la vida en la Tierra. La campaña de promoción de los contenidos de dicho proceso fue desarrollada por el WWF (*World Wildlife Fund*) en 1996 con el nombre “Global 200”.

La iniciativa tiene como principal objetivo la conservación del mayor número posible de especies, comunidades, hábitats y procesos ecológicos característicos de una determinada ecorregión. En el 2003 se seleccionaron 238 ecorregiones prioritarias entre terrestres, marinas y de agua dulce, denominadas como Global 200. El mantenimiento y la correcta gestión de estas 238 ecorregiones a nivel global puede garantizar la protección de la máxima área posible en base a la superficie mínima exigible. El objetivo es, por tanto, proteger áreas con la mayor extensión posible, que presenten las mejores condiciones ambientales y estado de conservación. En otras palabras, cada una de las ecorregiones de la lista de la Global 200 representa la ecorregión más significativa de cada tipo de hábitat del dominio biogeográfico en el que se encuentra (BULGARINI & al., 2003).



Actualización de la Estrategia Europea para la Conservación de las Plantas para el periodo 2008-2014, resultado de la 5ª conferencia Planta Europa celebrada en Cluj Napoca (Rumanía) en el año 2007. (más información en www.plantaeuropa.org).

Estrategia Europea para la Conservación de las Plantas (EECP)

Adoptada por el Consejo Europeo en abril del 2002 con base a la propuesta de *Planta Europa* (www.plantaeuropa.org) como una contribución europea a la implementación de la EGCP, con el objetivo de establecer objetivos de conservación revisados periódicamente. La estrategia europea (en inglés *European Strategy for Plant Conservation* o ESPC) recomienda, en lo referente a los países de la Unión Europea, la conservación *ex situ* del 80% de las especies en peligro de desaparición antes del año 2010. La estrategia europea prevé, además, la conservación eficaz de al menos el 10% de cada región ecológica del mundo y la protección de al menos el 50% de las áreas más importantes de biodiversidad vegetal. En lo referente a las especies exóticas, se promueve la elaboración de planes de gestión *in situ* para al menos 100 de los principales organismos invasores que amenazan plantas, comunidades vegetales y sus hábitats y ecosistemas.

Para los taxones vegetales y para los hongos se indica la necesidad de elaborar programas nacionales de monitorización y, si es necesario, se regulará su recolección y comercio, con el fin de alcanzar la sostenibilidad. La EECP también subraya que la importancia de la diversidad vegetal y la necesidad de su conservación debe incorporarse en los programas de comunicación y sensibilización de la opinión pública. Por otro lado, se incentiva la creación y el refuerzo de redes para la conservación de plantas a escala regional, nacional e internacional, también a través de fondos económicos para la financiación nacional e internacional de los programas de conservación, ampliación del uso de los fondos *Life*, etc.

II.III Acceso a los recursos genéticos

En los últimos años ha tomado una notable relevancia geopolítica todo lo concerniente al acceso a los recursos genéticos, en particular a aquellos con interés económico, tanto actual como potencial, y la difusión de los beneficios derivados de su uso. La importancia de afrontar estas cuestiones ha sido manifestada en numerosos congresos, conferencias y convenios. En el caso de plantas de uso agrícola, el “Tratado Internacional sobre los Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura” constituye un instrumento nacido en el seno de la FAO en el 2001 (FAO, 2001), estableciendo un sistema multilateral que tiene la finalidad de facilitar el acceso a los recursos genéticos de una serie de especies agrícolas y un mecanismo para la distribución de los beneficios que de ello deriven.

En términos más amplios, el Convenio de Diversidad Biológica de 1992 fija como objetivo, además de la conservación y la utilización sostenible, el reparto justo y equitativo de los beneficios que deriven del uso de los recursos genéticos. Este convenio, en su artículo 15, reconoce la soberanía de los estados sobre sus recursos genéticos. Al mismo tiempo recomienda la creación de condiciones que faciliten el acceso a los recursos para usos que sean adecuados desde el punto de vista ambiental, bajo las premisas que hayan sido convenidas entre las partes contratantes, y de este modo asegurar la repartición de los beneficios obtenidos. Además, se estimula a cada parte contratante a que promueva la realización de investigaciones científicas sobre los recursos genéticos en colaboración con el resto de las partes.

En el ámbito del CDB se han elaborado las “Directivas de Bonn sobre el Acceso a los Recursos Genéticos y sobre la Participación Justa y Ecuánime de los Beneficios Obtenidos de

su Utilización”, adoptadas en el 2002. Estas directivas tienen como objetivo la elaboración de estrategias de acceso a los beneficios, mediante la identificación de los pasos a seguir en dichos procesos, de los requisitos fundamentales que deben de cumplir los acuerdos y de la participación y responsabilidad de cada parte. En dichos documentos se tratan, entre otros aspectos, los incentivos y los medios de supervisión, verificación y solución de controversias. Además, las directivas proponen una serie de elementos a tener en consideración en los acuerdos del transporte del material, como una lista de los posibles beneficios económicos.

A pesar de que las Directivas de Bonn son un instrumento voluntario, se considera que su práctica por los centros que gestionan recursos genéticos debe de ser estimulada, puesto que de este modo se establecen relaciones transparentes e igualitarias y se refuerza la credibilidad de dichas instituciones a la vez que se facilita alcanzar los objetivos del CDB. En el caso de los centros de conservación *ex situ* de plantas silvestres, como los bancos de germoplasma y los jardines botánicos, la aplicación de las directrices relativas al acceso a los recursos genéticos deben ser considerada de un modo especial, como mecanismo de regulación de los recursos vegetales de poblaciones naturales (ver cuadro II).

La gestión de germoplasma en el marco del CDB y las pautas de acceso y distribución de beneficios (ADB): procedimientos de la Asociación Ibero Macaronésica de Jardines Botánicos (AIMJB) (a partir de HERNÁNDEZ BERMEJO & HERRERA MOLINA, 2002)

Antecedentes

En el marco del Convenio de Diversidad Biológica (CDB), las instituciones botánicas juegan un papel esencial en relación con la gestión del germoplasma y las disposiciones sobre acceso y distribución de beneficios (WILLIAMS *et al.*, 2003). En respuesta a la necesidad de aplicación de las directrices generales del CDB, la Asociación Ibero-Macaronésica de Jardines Botánicos (AIMJB) encargó a la REDBAG (Red Española de Bancos de Germoplasma) una revisión sobre los procedimientos más aconsejables para el intercambio de semillas inter-nacionales.

El documento resultante (HERNÁNDEZ BERMEJO & HERRERA MOLINA, 2002) definió algunos protocolos aplicables por los Bancos de Germoplasma y Jardines Botánicos, tomando en consideración los términos generales del CDB, y en especial el sistema de acceso y distribución de beneficios en él definido (ADB), así como las Directrices de Bonn (Decisión VI/24 de la sexta conferencia de las partes, La Haya, abril de 2002), la Estrategia Mundial para la Conservación de las Plantas (decisión VI/9) y el Tratado Internacional para los Recursos Fitogenéticos relacionados con la Alimentación y la Agricultura (Resolución 3/2001 de la FAO). A continuación se resumen las principales propuestas reflejadas en el documento de HERNÁNDEZ BERMEJO & HERRERA MOLINA (2002), donde se indican algunas soluciones para la gestión de germoplasma en el marco del CDB.

Entre las principales acciones propuestas para la incorporación de las directrices del CDB al intercambio de germoplasma, figuran las siguientes:

- 1) Sistema ABSS/BGS de la plataforma europea de jardines botánicos (BGCI-JABG *European Consortium of Botanic Gardens*): a través de esta iniciativa, se formalizan las bases para el intercambio de germoplasma vegetal para usos no comerciales, con vocación de ser aplicado a una escala mundial. El sistema parte del control estricto de los pasos establecidos por el CBD, regulando la incorporación de los jardines botánicos que lo deseen y la definición de pautas específicas para los casos en que se establezcan transacciones de germoplasma con fines comerciales, mediante el consentimiento fundamentado del país de origen en el caso de material genético obtenido con posterioridad al año 1993. En el caso de transferencia a terceras partes, se propone un Acuerdo de Transferencia de Material (ATM) que establezca los términos de referencia de la transmisión.
- 2) Experiencia del *Millenium Seed Bank* (MSBP): el modelo de intercambio propuesto por el MSBP (CHEYNE, 2004) se basa estrictamente en el artículo 15 del CDB, referido al derecho soberano de cada país a su biodiversidad, así como el espíritu del convenio CITES (1973) y las leyes regionales y nacionales vigentes en materia de biodiversidad. A través de este acuerdo, los representantes del donante (país o región con responsabilidad administrativa) y del consejo de administración del jardín botánico establecen un contrato de colaboración y

acceso a los recursos genéticos, incluyendo la elaboración de los permisos correspondientes y la implicación de las comunidades locales o indígenas, siguiendo la legislación vigente y el espíritu del artículo 8(j) del CDB. Como herramientas de seguimiento, se propone un protocolo de “Notificación de Transferencia”, por parte del JB a la institución firmante del contrato, y el intercambio del conocimiento obtenido, restringiendo el uso comercial a un acuerdo nuevo basado en el CDB, el cual incluye una cláusula de duración temporal.

- 3) Código de conducta para Jardines Botánicos de la Red Internacional de Intercambio de Plantas (IPEN – *International Plant Exchange Network*) que regula la adquisición, mantenimiento y suministro de material fitogenético: la Red IPEN dispone de un protocolo de intercambio de germoplasma vegetal no procedente de material silvestre, y sin interés en el ámbito comercial, que facilita el intercambio de material “no sensible” sin acudir a los protocolos de acceso de beneficios del CDB. El código de conducta de esta red regula la adquisición, gestión y suministro de material fitogenético, dentro y fuera de la red IPEN. Las normas de intercambio establecen material apto y no apto para su distribución en la red, restringiendo la transferencia en los casos en que los países de origen establezcan pautas de control y seguimiento del material. El objetivo de restringir el material apto o adecuado para su transferencia no es otro que el de facilitar una gestión ágil para material no sensible, el cual constituye el grueso de los intercambios entre jardines botánicos. En todos los casos, el protocolo del IPEN sigue las pautas del CDB y la distribución de beneficios, si bien al tratarse exclusivamente de material sin interés comercial dichos beneficios se basan en apoyo logístico, técnico o editorial.

Intercambio de germoplasma en el seno de los jardines botánicos de la Asociación Iberomacaronésica de Jardines Botánicos (AIMJB)

En el momento actual, la AIMJB requiere, a través de la edición del *Index Seminum*, un acuerdo provisional en función del cual la institución receptora del germoplasma se compromete a seguir unas directrices básicas, en espera de la aplicación de los compromisos internacionales sobre esta materia. El texto actualmente utilizado es el siguiente:

“De forma provisional, a la espera del desarrollo del Convenio Internacional para la Diversidad Biológica, en reconocimiento y aplicación del nuevo marco internacional para el acceso a los recursos fitogenéticos que ese texto establece, y a la espera del resultado final de las negociaciones para la revisión del compromiso internacional sobre los recursos fitogenéticos de la FAO, se suministran semillas de los taxones antes reseñados bajo las siguientes condiciones:

- *Que sean utilizados para el bien público en la investigación, los ensayos, la propagación, la educación o el desarrollo de las colecciones de los jardines botánicos.*
- *Si el corresponsal tratara de comercializar el material genético transferido, sus productos, o la investigación derivada del uso del mismo deberá pedir permiso por escrito al (...). Esta comercialización podrá ser formalizada previo consentimiento y de acuerdo a los criterios del (...), consistentes en ceder una parte de los beneficios netos al país en el que fueron recolectadas las semillas.*

- *Que no sea transferido el material genético, sus productos o la investigación derivada de éstos a una tercera parte para su comercialización, sin el permiso previo y por escrito del (...)*
- *En cualquier publicación resultante del uso de los materiales transferidos deberá reconocerse su procedencia con mención explícita del (...)*
- *La orden del pedido deberá ser firmada bajo estas condiciones.”*

La ratificación de estas normas no tienen en cuenta los derechos legales del material en función de su origen, en especial cuando se trata de material procedente de poblaciones silvestres, el cual debería someterse a los procedimientos de transferencia y gestión derivados del CDB. Debido a ello, HERNÁNDEZ BERMEJO & HERRERA MOLINA (2002) proponen tres sistemas de acuerdo para la gestión y transferencia de germoplasma vegetal en el contexto de la red española de bancos de germoplasma (REDBAG), considerando la ausencia de unas normas de cumplimiento del CDB en el estado español o en las Comunidades Autónomas que lo constituyen (y que ostentan la soberanía sobre la biodiversidad en virtud de las transferencias en medio ambiente del estado español). Debe valorarse, además, la necesidad de abrir un *Consentimiento Fundamentado Previo*, en virtud del cual se reconozca la autoridad competente sobre los recursos genéticos vegetales y el grado de implicación y gestión de diferentes instituciones o agentes sociales implicados en el territorio.

Los protocolos propuestos son:

- 1) Acuerdo de Transferencia de Material (ATM), para ser aplicado en las donaciones de material genético procedentes de colectas en poblaciones naturales, requeridas para la investigación, conservación o educación.
- 2) Acuerdo de Adquisición de Material (AAM), diseñado para la obtención de la autorización de recolecta de material genético vegetal en campañas de recolecta.
- 3) Aplicación del sistema de distribución justa y equitativa de beneficios (ADB) para el intercambio de germoplasma a través del *Index Seminum* o similares, para los casos en que no existan otros requisitos análogos a los modelos anteriores (ATM, AAM), y que representa un modelo actualizado del modelo actualmente vigente en el seno de la AIMJB, anteriormente citado.

III Redes de bancos de germoplasma

El número de bancos de germoplasma actualmente existentes en el mundo se estima en torno a 1400, distribuidos principalmente en los países más desarrollados, y en especial en el ámbito anglosajón. En Europa se localizan cerca de 250 bancos, 180 en los países del centro/norte de Europa y 70 en el área mediterránea. Estos últimos se distribuyen principalmente en Italia, Francia y España, países donde se concentra, además, la mayor densidad de bancos de semillas silvestres a escala mundial.

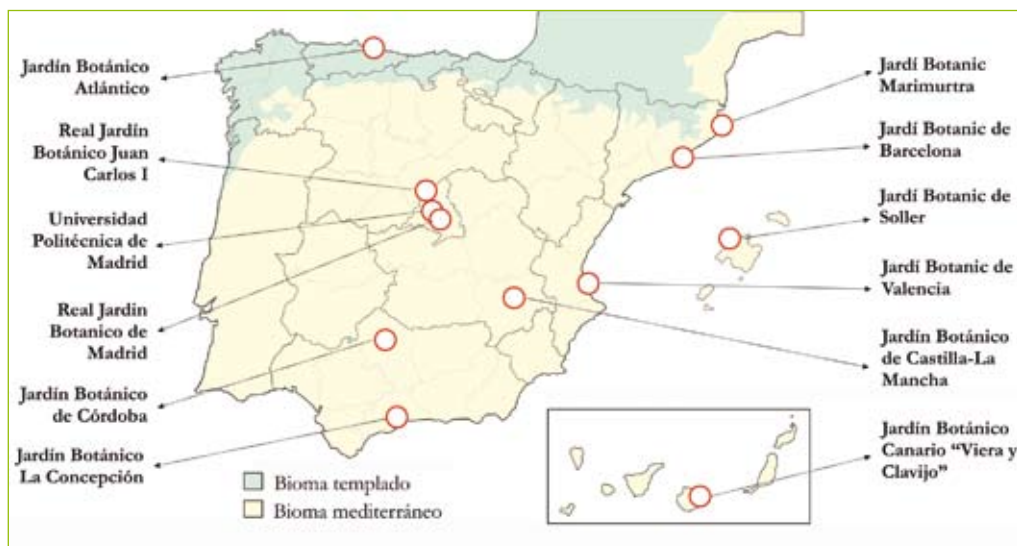
En el campo de la conservación *ex situ* de la diversidad vegetal, cada institución implicada desarrolla una experiencia propia, elaborando protocolos y metodologías diferentes en función de los recursos humanos y económicos disponibles. Sin embargo, el desarrollo paulatino de las temáticas relativas a la conservación y la necesidad de colaboración e intercambio de germoplasma y conocimiento han llevado al establecimiento de redes de información, desarrolladas con profusión a escala nacional e internacional, con el objetivo de coordinar la actividad de los bancos de germoplasma.

III.1 Redes nacionales

España: Red Española de Bancos de Germoplasma de Plantas Silvestres (REDBAG)

En noviembre del año 1992, los miembros de la Asociación Ibero-Macaronésica de Jardines Botánicos (AIMJB) con bancos de germoplasma dieron vida, junto al departamento de Biología Vegetal de la Universidad Politécnica de Madrid, a la Red Española de Bancos de Germoplasma de Plantas Silvestres (REDBAG), red abierta a todas las instituciones que gestionan germoplasma de especies silvestres y otros recursos genéticos vegetales en España. Los integrantes de REDBAG se dividen en tres categorías (HERNÁNDEZ BERMEJO & HERRERA MOLINA, 2005):

- Miembros estables: instituciones cuyos bancos de germoplasma conservan accesiones de flora silvestre española a medio y largo plazo mediante infraestructuras consolidadas, en el año 2008 representadas por las siguientes instituciones: Departamento de Biología Vegetal UPM, BGVA de Andalucía y Jardín Botánico de Córdoba, Jardín Botánico de la Universitat de València, Real Jardín Botánico de Madrid, Jardín Botánico Viera y Clavijo, Real Jardín Botánico Juan Carlos I, Jardín Botánico La Concepción, Jardín Botánico Marimurtra, Jardín Botánico de Sóller y BGVPA del Jardín Botánico Atlántico.
- Miembros en fase de consolidación: instituciones cuyo banco de germoplasma está aún en fase de desarrollo, bajo la asistencia de uno o varios miembros estables.
- Miembros potenciales: instituciones que están desarrollando bancos de germoplasma o que disponen de un proyecto definido, y que requieren por tanto del apoyo logístico y la experiencia de miembros estables.
- Miembros invitados: instituciones con un banco de germoplasma de plantas silvestres no perteneciente a la AIMJB.



Instituciones que participan en la Red Española de Bancos de Germoplasma (REDBAG).

La REDBAG funciona activamente en el seno de la AIMJB, elaborando proyectos comunes para la conservación *ex situ* de la diversidad vegetal de España y Portugal, y de forma coordinada con las redes internacionales de bancos de germoplasma. Como primer proyecto común, en el año 2008 se inició un contrato con el Ministerio de Medio Ambiente Español para elaborar las primeras líneas de actuación y conservación de semillas de la REDBAG.

España: Banco de germoplasma forestal en red

El Ministerio de Medio Ambiente de España, en colaboración con las Comunidades Autónomas, elaboró la “Estrategia española para la conservación y el uso sostenible de los recursos genéticos forestales” (MIMAM, 2006). En este documento se prevé, junto a otras acciones, la creación de un “banco de germoplasma forestal en red”, al cual pueden incorporarse de forma voluntaria diferentes instituciones dedicadas a la conservación *ex situ*. El objetivo principal es la conservación *ex situ* de los recursos genéticos relativos a especies forestales, creando colecciones de base para diferentes taxones considerados prioritarios, y utilizando diferentes estrategias, como la conservación de semillas, colecciones vivas en campo, u otras que requieran un mayor soporte tecnológico, como el mantenimiento *in vitro* o la crioconservación. Al mismo tiempo, este banco de germoplasma en red permitirá la recolección de material genético para eventuales actividades *in situ*, para el análisis genético y el desarrollo de programas de mejora genética, de acuerdo con los protocolos de acceso a los recursos genéticos. El banco se organiza de modo virtual, incorporando la gestión de los registros de las accesiones, la coordinación y la divulgación de las diferentes iniciativas. La adhesión a esta estructura se concreta mediante la aceptación de un protocolo que prevé una serie de requisitos y obligaciones. También está prevista la creación



Nodos regionales de la *Rete Italiana Banche del Germoplasma per la Conservazione Ex Situ della flora spontanea italiana* (RIBES)

de un laboratorio virtual para la valoración del material forestal de propagación, destinada a su utilización a corto o largo plazo. Dicha caracterización incluye la valoración de la calidad externa de las accesiones de semillas o de plántulas, la caracterización molecular, etc.

Italia: Rete Italiana Banche del germoplasma per la conservazione Ex Situ della flora spontanea italiana (RIBES)

El número de bancos de germoplasma italianos se acerca a la veintena, de los cuales destacan, por su tamaño y capacidad operativa, los incluidos en los jardines botánicos universitarios de Cagliari (BG-SAR), Catania (BGS-CT), Pavia (LSB), Palermo y Roma, además de los bancos de germoplasma de la Provincia Autónoma de Trento (TSB, *Trentino Seed Bank*, *Museo Tridentino de Scienze Naturali*) y del *Istituto del Germoplasma* de Bari (CNR, *Centro Nazionale per le Ricerche*).

El primer banco de germoplasma de Italia nació en los años setenta en Lucca, fruto de la colaboración con la *Azienda Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione del Settore Agricolo*. En dicho banco se conservan especies de interés agrícola, especialmente cultivares y variedades hortícolas y forrajeras. En el banco de germoplasma del CNR de Bari se conserva material de interés agrícola y de forma puntual especies silvestres, mientras que los bancos de germoplasma incluidos en jardines botánicos universitarios conservan a largo plazo y a bajas temperaturas especies autóctonas de la flora italiana. El banco de germoplasma de Pisa está especializado en la flora de Toscana y el archipiélago toscano, mientras que en Palermo se conserva germoplasma de especies espontáneas y cultivadas del área mediterránea. El banco de germoplasma de Cagliari dedica sus esfuerzos principalmente a la conservación de especies del mediterráneo occidental insular (BACCHETTA *et al.*, 2009).

Debido a la ausencia de un acuerdo institucional que coordine la conservación *ex situ* de plantas silvestres en Italia, algunos de los bancos de germoplasma existentes acordaron la constitución de una red nacional de bancos de germoplasma. Como primer paso, se aprobó un protocolo de acuerdo que sirviera de base a la *Rete Italiana di Banche del germoplasma per la conservazione Ex Situ della flora spontanea*, denominada RIBES, la cual se ocupa de proyectos nacionales relacionados con especies en peligro de extinción y útiles para la reintroducción. El protocolo de acuerdo, definido en Pavia el 9 de febrero de 2005, constituyó la base para la definición formal de la red como una institución con personalidad jurídica propia. RIBES representa una asociación científica sin ánimo de lucro, que funciona prioritariamente para la conservación *ex situ* de la diversidad vegetal autóctona italiana. El estatuto de RIBES fue firmado por 18 socios fundadores el 3 de diciembre de 2005 en Trento.

Para la consecución de sus propios objetivos, la red RIBES elaboró un primer plan de acción con el objetivo general de mejorar la calidad y seguridad de las reservas de germoplasma de especies vegetales silvestres en Italia. Dicho plan funciona mediante la constitución de grupos de trabajo dedicados a determinados ámbitos de acción, como la recolección, su posterior tratamiento en los bancos de germoplasma, la gestión de los datos y la actividad de formación, difusión y divulgación. Los grupos de trabajo se constituyeron durante asamblea ordinaria, en Pisa, en marzo de 2006, definiendo las prioridades de acción a nivel nacional, definiendo posibles metodologías de trabajo, e indicando los requisitos mínimos para las estructuras necesarias, sugiriendo las soluciones idóneas en función de la disponibilidad de recursos humanos e infraestructuras (BEDINI *et al.*, 2005).

Italia: Red Nacional de Germoplasma (RENGER) del Cuerpo Forestal del Estado (CFS)

En noviembre del año 2007, el Servicio de Biodiversidad del Cuerpo Forestal del Estado (Ministerio de las Políticas Agrícolas, Alimenticias y Forestales) hizo una reestructuración de sus viveros, instituyendo la Red Nacional de Germoplasma Forestal (RENGER). Su objetivo es la producción de semillas y plantas pertenecientes a las fanerófitas autóctonas italianas (unas 400 especies de árboles y arbustos), incluyendo investigaciones sobre su fenología, distribución y conservación. Se trata de un proyecto a medio plazo (5 años) fruto de la colaboración de dos centros nacionales de conservación de la biodiversidad forestal y cuatro viveros forestales. Inicialmente la red estará compuesta únicamente por estas seis oficinas, si bien posteriormente se podrán añadir otras. La tarea de los centros incluidos en el marco de los viveros nacionales se considera importante en relación con los aspectos productivos, y sobre todo con la investigación, mejora y actualización de técnicas productivas y de conservación, sirviendo como punto de referencia para todos los participantes en este sector, ya sean éstos públicos o privados.

La red está coordinada por el centro nacional de Peri (Verona). Las demás oficinas han sido elegidas por su tradición en cultivo (si anteriormente disponían de viveros) y por su posición geográfica, para que estuvieran implicadas también áreas que tiempo atrás no participaban en la red. La pertenencia a la red se concreta en la armonización de procedimientos operativos y de documentación, consintiendo el diálogo entre oficinas distintas, y la adopción de una única base de datos nacional en la cual se incluyen todos los datos de la actividad de los viveros, con el objetivo común de racionalizar los recursos financieros y desarrollar un plan de producción nacional.



Red de los *Conservatoires* de Francia, y áreas de competencia de cada uno de ellos.

Mientras que en el pasado la colaboración había tenido una naturaleza esporádica y ocasional, el RENGER permitirá la redistribución de las tareas de investigación entre los actores participantes en la red, impidiendo la duplicación innecesaria de tareas y mejorando el uso de los recursos financieros. Toda la plantilla implicada en este proyecto está adecuadamente formada mediante cursos periódicos, para que desde el norte hasta el sur de Italia todos los procedimientos, los documentos y las acciones sean conformes a estándares nacionales de cultivo, transporte, almacenamiento, análisis, conservación, etc.

Francia: Red de Conservatoire - Fédération Conservatoires Botaniques Nationaux Français (FCBN)

El primer *Conservatoire Botanique National* francés se creó en el año 1990. En el año 2004 el número de centros llegó a ocho, cubriendo 78 departamentos del territorio nacional. Actualmente se desarrollan proyectos de creación de nuevos *Conservatoires* para las regiones de Aquitania, Poitou-Charentes, Alsace-Franche-Comté-Lorraine y en Las Antillas. De este modo, el *Ministère de l'écologie et du développement durable* pretende completar la red de *Conservatoires* para todo el territorio nacional. Desde el año 2000, todos los centros constituyen una federación que coordina y armoniza sus métodos de trabajo, estimulan los programas nacionales para el conocimiento y conservación de la flora y los hábitat y aportan su capacidad técnica a la creación de nuevos centros.

Los artículos D 416-1 y siguientes del código del medio ambiente francés precisan el papel y funcionamiento de los *Conservatoires Botaniques Nationaux*, reconocidos como instituciones de carácter científico con los siguientes objetivos:

- a) Conocimiento del estado y la evolución de la flora silvestre y de los hábitat naturales y semi-naturales. Desarrollo de inventarios y gestión de bancos de datos de la flora silvestre

presente en la zona de intervención, con el objetivo de clasificar según un orden jerárquico el patrimonio natural (a nivel regional, nacional e internacional). Esta información es indispensable para el desarrollo de las políticas regionales y nacionales de protección de la naturaleza.

b) Identificación y conservación de los taxones raros o amenazados de la flora silvestre y de los hábitats naturales o seminaturales. Elaboran y difunden las listas de especies a proteger, especialmente a escala regional. Intervienen en la protección *in situ* de las especies, proponiendo medidas apropiadas, jurídicas o contractuales, para la protección de las plantas amenazadas en su medio natural. En el campo de la conservación *ex situ*, desarrollan técnicas de conservación en vivero y de conservación de semillas para su almacenamiento en frío, con el fin de evitar la desaparición de las especies más amenazadas y disponer de reservas de semillas para diferentes actuaciones (investigación, caracterización, reintroducción en su ambiente natural, etc).

c) Soporte técnico y científico al Estado, a las administraciones públicas y las entidades locales, en temáticas relacionadas con la conservación de la flora silvestre y los hábitats naturales y seminaturales.

d) Divulgación y educación con respecto al conocimiento y la protección de la diversidad vegetal. Los *Conservatoires* publican documentos y desarrollan programas de sensibilización y divulgación sobre la conservación de la flora silvestre, dirigidos tanto al público profano como al más especializado (administraciones locales, profesionales, etc).

La certificación de calidad como “*Conservatoire Botanique National*” es adjudicada por el *Ministère de l'écologie et du développement durable*. Las candidaturas son examinadas por la comisión de los *Conservatoires*. La cualificación se designa por decreto ministerial, con una duración de 5 años renovables, en función de la aprobación de un programa específico que la institución admitida debe respetar. La certificación da el derecho a la denominación de *Conservatoire Botanique National* como marca de calidad registrada, y es válida para territorios formados por diferentes departamentos, pero que presentan unas características biológicas o geográficas comunes.

La cualificación puede ser anulada si la actividad o el funcionamiento de la institución no desarrolla los objetivos fijados. El control se realiza mediante la valoración de un informe anual sobre la actividad desarrollada y el programa de actividades, presentado durante la reunión del consejo científico. Los *Conservatoires* tienen un conocimiento detallado y profundo de la distribución de las plantas silvestres, de su biología y sus exigencias ecológicas. La especificidad de su acción y la responsabilidad que deriva de su certificación son el asegurar, en todo lo posible, la transferencia de dicho conocimiento a todos aquellos que intervienen en la gestión del medio natural: ayuntamientos, entidades privadas, servicios administrativos de los departamentos o regiones, organismos de gestión forestal, etc. El objetivo último es poner en evidencia la importancia de la presencia de las plantas amenazadas en las operaciones de gestión y planificación del medio natural.

III.II Redes europeas

GENMEDOC

El proyecto GENMEDOC (*Création d'un réseau de centres de conservation du matériel génétique de la flore des régions méditerranéennes de l'espace MEDOCC*), forma parte de las acciones comunes en materia ambiental de la Unión Europea para la conservación de la biodiversidad y la conservación de las especies y los hábitats. Tales objetivos incluyen el intercambio de información técnica, la adopción de estrategias y protocolos de trabajo comunes para la conservación de los recursos genéticos de los taxones mediterráneos, principalmente de aquellos prioritarios o presentes en los hábitats de la directiva europea 92/43/CEE.

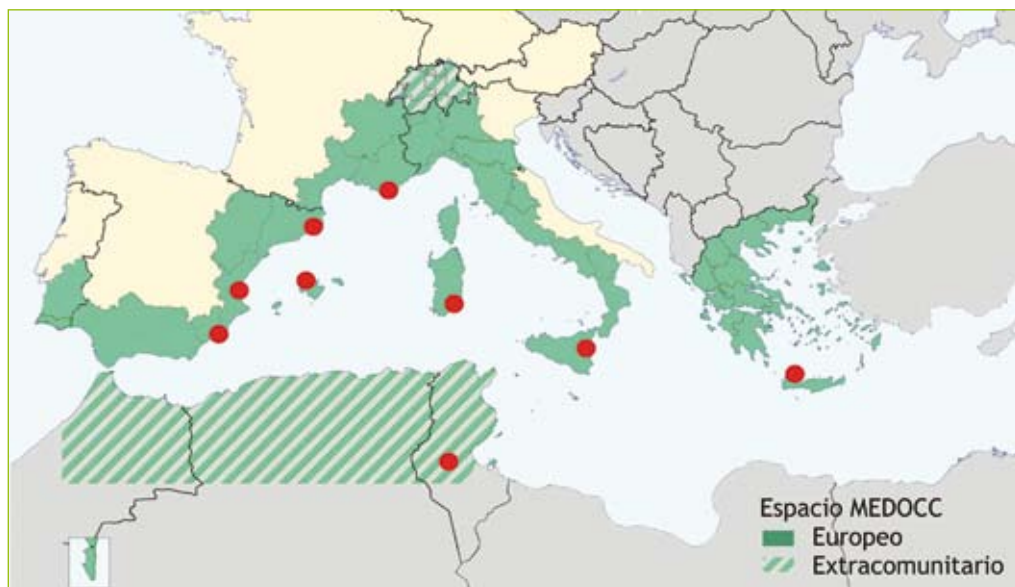
El proyecto INTERREG IIIB GENMEDOC (2004-2006) tiene como objetivo prioritario la constitución de una red de centros de conservación de germoplasma del Mediterráneo occidental. A la red GENMEDOC se adhieren diferentes miembros europeos, cubriendo gran parte del espacio MEDOCC, incluyendo las islas más importantes del Mediterráneo (Baleares, Córcega, Cerdeña, Sicilia y Creta) además de un miembro tunecino como representante de la costa meridional. Los diez centros involucrados son:

- *Banc de Llavors Forestals* (CIEF) de la Comunidad Valenciana.
- *Centro Conservazione Biodiversità* (CCB) del *Dipartimento di Scienze Botaniche dell'Università degli Studi di Cagliari* (Cerdeña).
- *Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles* (Hyères).
- *Dipartimento di Botanica dell'Università degli Studi di Catania* (Sicilia).
- *Jardí Botànic de la Universitat de València* (Comunidad Valenciana).
- *Fundació Jardí Botànic de Sóller* (Islas Baleares).
- *Mediterranean Agronomic Institute of Chania* (Creta).
- *Institut Botànic i Jardí Botànic de Barcelona* (Cataluña).
- *Institut des Régions Arides* (IRA) de Medenine (Túnez).
- *Dirección General del Medio Natural de la Región de Murcia* (Murcia).

Los objetivos principales del proyecto son:

- La elaboración de modelos comunes para la gestión de taxones, combinando la conservación *ex situ*, recolección y conservación del germoplasma con las actividades *in situ* (protección, recuperación y fortalecimiento de poblaciones naturales).
- El intercambio de conocimiento sobre la conservación del germoplasma, recolección, tratamiento, conservación y multiplicación.
- La duplicación de las colecciones entre los miembros, con el fin a garantizar su efectiva conservación en caso de catástrofes.
- El estudio de los taxones “estructurales” de los hábitats endémicos, raros o amenazados.

El objetivo final de la red es contribuir de forma significativa al desarrollo de la red europea NATURA 2000 (más de 300 especies vegetales seleccionadas y 40 hábitats mediterráneos), dedicada a la conservación de la biodiversidad en Europa, y en sinergia con los objetivos del



Integrantes de la red GENMEDOC (www.genmedoc.org)

Convenio de Diversidad Biológica. Para la selección de las especies, los diferentes miembros han desarrollado criterios basados en el papel estructural en las fitocenosis o la singularidad, entendida como rareza y/o endemidad, así como su nivel de protección y grado de amenaza. Para las especies de particular interés se han elaborado protocolos de germinación que permitan la multiplicación del germoplasma a utilizar en posibles acciones de refuerzo de poblaciones, o de reintroducción en el medio natural.

El proyecto ha permitido, además, la creación de colaboraciones inter-regionales entre los miembros, favoreciendo la colaboración y el intercambio de conocimiento, contribuyendo en el futuro próximo a una real acción de conservación de la flora en riesgo de extinción. Toda la información relativa al proyecto GENMEDOC en relación con la biodiversidad y conservación *ex situ* se encuentra disponible en red, a través de su página oficial (www.genmedoc.org).

ENSCONET

La red ENSCONET (*European Native Seed Conservation Network*) está formada por 24 bancos de germoplasma europeos, con el objetivo de poner a punto procedimientos comunes, coordinar esfuerzos y optimizar la gestión de los recursos disponibles. ENSCONET se propone además como un instrumento asesor de la política de conservación de la Unión Europea en sus obligaciones hacia el CDB y la Estrategia Global para la conservación de las plantas (EGCP), a través de la protección de semillas y evitando la extinción de las especies espontáneas europeas.

El proyecto nació gracias a la financiación de la Unión Europea, como parte del VI Programa Marco para la investigación, mediante una actividad integradora llevada a cabo como Acción



Integrantes de la red ENSCONET
(www.ensconet.org)

de Coordinación (N. 506109/2003), e incluye a 19 instituciones europeas pertenecientes a 12 estados miembros, representando 5 regiones biogeográficas europeas (www.ensconet.eu). La red está coordinada por el *Royal Botanic Gardens* de Kew (Inglaterra), y organizada en cuatro grupos de trabajo, con las siguientes responsabilidades:

- Analizar las colecciones existentes y localizar las especies y áreas poco representadas, donde es necesario efectuar nuevas campañas de recolecta.
- Mejorar la calidad de las prácticas de conservación de semillas, mediante la puesta en común de estructuras y conocimientos.
- Sentar los mecanismos para la integración de bases de datos en las instituciones implicadas.
- Divulgar la información sobre biodiversidad y conservación generada.

Los 24 miembros de ENSCONET se distribuyen en 17 países europeos:

- Alemania: *Botanischer garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem, FU Berlin.*
- Austria: *Universität Wien.*
- Bélgica: *National Botanic Garden Belgium Meise.*
- Bulgaria: *Institute of Botany - Bulgarian Academy of Sciences.*
- Chipre: *Agricultural Research Institute Cyprus.*
- Eslovaquia: *Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences, Bratislava.*
- España: *IMGEMA- Jardín Botánico de Córdoba; Jardín Botánico Viera y Clavijo; Universidad Politécnica de Madrid; Jardí Botànic de Soller; Jardí Botànic de la Universitat de Valencia.*
- Finlandia: *Helsingin yliopisto, Helsinki.*
- Francia: *Museun National d'Histoire Naturelle, Paris.*
- Grecia: *National and Kapodistrian University, Athens; Mediterranean Agronomic Institute Chania (Creta).*
- Hungría: *Budapest Zoo et Botanical Garden.*

- Inglaterra: *Royal Botanic Gardens, Kew.*
- Irlanda: *Botanical Garden, Trinity College Dublin.*
- Italia: *Università di Pavia/Centro Flora Autoctona della Lombardia; Università di Pisa, Orto Botánico; Museo Tridentino di Scienze Naturali di Trento.*
- Polonia: *Botanical Garden Polixh Academy of Sciences Warsaw.*
- Portugal: *Jardim Botânico - Fundação da Universidade de Lisboa.*
- Noruega: *Natural History Museum, University of Oslo.*

Además de los 24 miembros activos integrados en ENSCONET, otras 5 instituciones figuran como miembros asociados: (1) *University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna*; (2) *Musée National d'Histoire Naturelle Luxembourg*; (3) *Conservatoire et Jardin Botaniques Genève*; (4) *Frederik Institute of Technology, Nicosia*; y (5) *Rete Italiana Banche del germoplasma per la conservazione ex situ della flora Spontanea (RIBES)*.

El proyecto SEMCLIMED

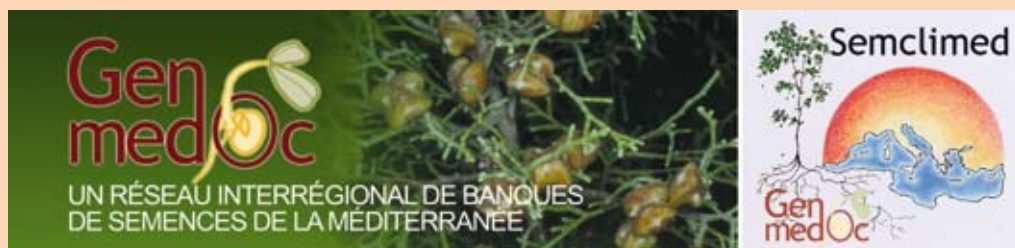
Uno de los primeros resultados prácticos de la red GENMEDOC ha sido la elaboración del proyecto común SEMCLIMED, destinado a la conservación de la biodiversidad vegetal del ámbito mediterráneo y que tuviera en cuenta los efectos del cambio climático. El proyecto SEMCLIMED (*SEMence, CLimat et MEDiterrannée*) ha propiciado además la adhesión de seis nuevos miembros a la red GENMEDOC: *Université Nationale et Kapodistrienne d'Athènes* (Grecia), *Conservatoire des Espaces Naturels du Languedoc-Roussillon* (Francia), *Conservatoire Etudes des Ecosystemes de Provence/Alpes du Sud* (Francia) *Argotti Herbarium and University Botanic Gardens* (Malta), *Département de Botanique et Ecologie Végétale - Institut Scientifique de Rabat* (Marruecos) y *Université de Mansouri* (Egipto).

Mediante la valoración de los efectos del cambio climático sobre la flora del Mediterráneo, el proyecto SEMCLIMED pretende proponer medidas de conservación para las especies y los hábitats amenazados, así como acciones de sensibilización que incrementen la conciencia pública sobre la amplitud social y ecológica del cambio climático. Los objetivos específicos de SEMCLIMED son:

- 1) El estudio y observación sistemática de la germinación de semillas y de los cambios en la fenología reproductiva sobre una amplia gama de especies mediterráneas, desde las de amplia distribución hasta las plantas endémicas de distribución más restringida.
- 2) La cooperación con centros e institutos de África del Norte, con el fin de favorecer la conservación *ex situ* de especies amenazadas en una de las zonas más vulnerables y menos estudiadas del Mediterráneo.
- 3) La realización de proyectos piloto para la recuperación del hábitat, ecosistemas y poblaciones amenazadas por una excesiva antropización.
- 4) La divulgación de información sobre los efectos nocivos del cambio climático sobre los sistemas naturales mediterráneos y sobre la supervivencia de numerosas especies sensibles de la flora mediterránea.
- 5) El intercambio de información sobre técnicas innovadoras de conservación *ex situ* del material genético estudiado por los miembros integrados en el proyecto.

Las acciones del proyecto se desarrollan en 12 regiones de 5 estados miembros del espacio MEDOCC (España, Francia, Italia, Grecia y Malta), así como en tres países de África del Norte (Marruecos, Túnez y Egipto). En el ámbito europeo, todas las acciones se desarrollarán principalmente dentro de los espacios LIC de la red Natura 2000.

Los impactos del cambio climático sobre la biodiversidad se consideran como los primeros efectos del calentamiento global, habiendo ya determinado variaciones relevantes en la distribución de especies en muchas regiones del planeta. Sin embargo, actualmente resulta difícil determinar con exactitud cuál será la amplitud de esta amenaza, dado que los escenarios futuros son aún inciertos, especialmente a escala regional o local. La cuenca del mediterráneo es un



www.genmedoc.org

hotspot o punto caliente de la biodiversidad (MÈDAIL & QUÉZEL, 1997), cuyas islas y ribera meridional incluyen los territorios donde se teme un mayor aumento de temperatura, con unos efectos desconocidos sobre la biología reproductiva de las plantas que allí viven. Los bancos de germoplasma y las actividades que en ellos se desarrollan son instrumentos importantes para la conservación *ex situ* de estas plantas, representando la última defensa eficaz contra su extinción (WILLIAMS & *al.*, 2003).

Si bien existen numerosos estudios sobre los impactos del cambio climático sobre la biodiversidad, falta información precisa y previsiones específicas sobre la respuesta de la flora mediterránea. Estos estudios suelen tener además un carácter general, considerando una serie de procesos ecológicos y fisiológicos de las plantas, y sin tener en cuenta otros procesos decisivos como la biología o la ecología reproductiva. Gracias al intercambio de experiencias, el proyecto SEMCLIMED prevé la elaboración de nuevos protocolos para las especies con un mayor riesgo de extinción, generalmente plantas raras que producen pocas semillas, o bien producen semillas recalcitrantes que no pueden ser conservadas con las técnicas tradicionales de preservación en frío y en seco.

El proyecto SEMCLIMED intenta poner remedio a la heterogeneidad actual de las metodologías de conservación desarrolladas en la cuenca mediterránea. De hecho, se da la circunstancia de que las regiones con mayor riqueza florística son las que disponen de menos infraestructuras para la conservación. La colaboración de instituciones de todo el espacio mediterráneo permitirá valorar la gravedad de la amenaza del clima sobre la conservación de la flora de este espacio, generando información útil para individualizar estrategias transregionales de protección de flora autóctona.

Técnicas de conservación *ex situ*

1. Selección de prioridades

1.1 Marco general

Como centros estratégicos de conservación, los bancos de germoplasma representan una herramienta práctica para la preservación *ex situ*, ya sea como acción preventiva, o como respuesta urgente a la extinción o declinación de poblaciones o especies. Los bancos de germoplasma ejercen además un papel relevante en la planificación logística relacionada con la conservación de la biodiversidad vegetal en sentido amplio, desde una perspectiva enfocada principalmente a las especies, pero con una labor decisiva para el desarrollo de la conservación *in situ* de ecosistemas funcionales (MAUNDER & al., 2004), a través de proyectos de recuperación de hábitats o reforzamiento poblacional.

En el marco de jardines botánicos, universidades u otras instituciones afines, los bancos de germoplasma destinados a la conservación de plantas silvestres pueden y deben, además, participar activamente en la toma de decisiones sobre los objetivos de conservación. La selección de prioridades se considera una herramienta más de la biología de la conservación (MACE & al., 2007) que puede ser aplicada en las estrategias de los bancos de germoplasma modernos (KOLBERG, 2003; JIMÉNEZ-ALFARO & al., 2007). Esta labor puede enfocarse según diferentes perspectivas, en función del ámbito geográfico de trabajo o las necesidades propias de cada centro, ya que los bancos de germoplasma pueden ser muy dispares en cuanto a recursos humanos o infraestructuras se refiere. Sin embargo, todos suelen tener unos objetivos de actuación similares, basados en la conservación de germoplasma vegetal silvestre (semillas, esporas o tejidos vegetales) y en la necesidad de optimizar los procesos de recolección y conservación.

La selección de “taxones objetivo” es un proceso único a desarrollar por cada banco de germoplasma, en función de la biodiversidad vegetal del territorio de actuación y de los objetivos concretos del centro (conservación de plantas amenazadas o endémicas, preservación de germoplasma de antecesores silvestres de plantas cultivadas, líneas específicas de investigación, etc). Debido a que las campañas de recolección de germoplasma implican un importante esfuerzo e inversión de tiempo y recursos, la selección previa de prioridades es una tarea esencial para la adecuada planificación de un banco de germoplasma, especialmente en el caso de aquellos en que la disponibilidad de recursos suele ser un factor limitante para el desarrollo de su actividad.

La estrategia de selección de prioridades florísticas para la conservación *ex situ* debe tener en cuenta, al menos, los siguientes factores (TENNER, 2003): (1) las fronteras geográficas de actuación; (2) las prioridades políticas vigentes; (3) la información botánica disponible; y (4) la capacidad logística para el desarrollo de los proyectos de conservación. En líneas generales, los bancos dedicados a plantas silvestres suelen estar más interesados en especies amenazadas, raras o endémicas, aunque los objetivos de conservación pueden ser muchos otros, como especies estructurales de hábitats amenazados, taxones relictos o en su límite de distribución, taxones emparentados con plantas de interés económico o medicinal, etc. De igual modo, los criterios para la valoración de estas prioridades pueden ser muy variables, en función de los parámetros que se consideren de mayor interés o la información disponible. Por ejemplo, MAXTED & GUARINO (2003) proponen utilizar criterios mixtos de valoración de prioridades, incluyendo factores como los costes de conservación de los taxones objetivo o su grado de conservación

efectiva, además de otros parámetros relacionados con la importancia biológica o el propósito de conservación. Por su parte, FARNSWORTH *et al.* (2006) desarrollan un sistema de valoración de poblaciones de plantas de interés utilizando factores de accesibilidad y viabilidad del material germinativo.

A pesar de que la tendencia inicial de los bancos suele llevar a la utilización directa de listas rojas o catálogos normativos vigentes, la definición de un sistema de selección de prioridades está adquiriendo cada vez más impulso, permitiéndo direccionar la actividad con base a unos objetivos concretos. Por otro lado, la actividad de los bancos de germoplasma de plantas silvestres no suele restringirse a la recolección y conservación *ex situ*, sino que en muchos casos esta actividad debe complementarse con el estudio de las poblaciones visitadas, o el desarrollo de acciones de conservación *in situ* basadas en el germoplasma estudiado.

Aunque la definición de prioridades suele realizarse en el marco de las necesidades de conservación *in situ* (MACE & COLLAR, 2002; HEYWOOD & DULLOO, 2006) o *ex situ* (MAXTED & *al.*, 1997), en la mayor parte de los casos pueden ser aplicadas ambas perspectivas, favoreciendo así una visión global sobre los taxones objetivo. La selección de prioridades u objetivos de conservación puede servir también para la selección de áreas de interés (KOLBERG, 2003), permitiendo establecer áreas prioritarias basadas en los taxones objetivo, aplicando así un sistema de selección para varias especies.

A continuación se detallan algunos factores que pueden resultar relevantes para el desarrollo de programas de selección de prioridades en un banco de germoplasma de plantas silvestres, en función del ámbito geográfico y administrativo en que se desarrolla la actividad, los métodos de selección y valoración de prioridades florísticas que pueden ser aplicados, y el desarrollo de la actividad de recolección con base a los sistemas de priorización.

1.2 Definición de objetivos en el ámbito geográfico y administrativo

La creación de un banco de germoplasma de plantas silvestres está relacionada, en muchos casos, con la necesidad de conservación de los recursos genéticos en un determinado territorio, generalmente a escala regional o nacional. Tomando como ejemplo algunos bancos de germoplasma de plantas silvestres europeos (Tabla 1), puede apreciarse cómo en la mayor parte de los casos la actividad principal se desarrolla en un marco geográfico relativamente próximo, relacionado directamente con los límites administrativos de la entidad que financia la actividad. Quizás la excepción más relevante la constituya el proyecto *Millenium Seed Bank* de Kew Gardens (<http://www.kew.org/msbp/>) destinado a conservar una buena parte del patrimonio genético de la flora mundial, a través de la colaboración directa con países asociados. En el extremo contrario, los bancos de germoplasma pueden dirigir su actividad a proyectos exclusivos, caso de la especialización en crucíferas endémicas del BGV de la UPM; o a un estrecho margen geográfico, como la recuperación de germoplasma representativo realizada en el *Jardim Botánico de Lisboa* como medida compensatoria de la presa de Alqueva, en el sudeste de Portugal (DRAPER *et al.*, 2004).

Bancos de germoplasma	Actividad Principal	Área de actuación	km ²
Banco de Germoplasma Vegetal Andaluz (España)	Conservación de especies amenazadas	Comunidad Autónoma Andaluza	c. 87.000
BG-SAR, Banca del Germoplasma della Sardegna, Cagliari (Italia)	Conservación de especies endémicas, raras y amenazadas	Cerdeña	c. 24.090
Banco de Germoplasma Vegetal de la UPM (Madrid, España)	Conservación de crucíferas endémicas y plantas raras o amenazadas ibéricas	España	c. 583.000
Conservatoire Botanique Porquerolles (Francia)	Conservación de especies amenazadas del ámbito mediterráneo francés	Área mediterránea, Francia	c. 15.000
Mediterranean Agronoic Institute Chania (Grecia)	Conservación de especies endémicas, raras y amenazadas de las islas griegas	Creta	c. 8.300
Banco de Germoplasma del JB de Funchal (Madeira, Portugal)	Conservación de especies endémicas y amenazadas macaronésicas	Madeira	c. 750

Tabla 1. Actividad principal y área de actuación de algunos bancos de germoplasma de plantas silvestres europeos.

En la mayor parte de los casos, las instituciones que financian la actividad de un banco de germoplasma esperan que se desarrollen actividades concretas en su marco geográfico o administrativo. Sin embargo, el marco administrativo no suele coincidir con los límites biológicos de la flora presente en un territorio, por lo que resulta de utilidad aplicar una perspectiva biogeográfica a la selección de prioridades, valorando la colaboración con otros centros a través de redes que incluyan espacios geográficos naturales (BUENO & *al.*, 2007). En todos los casos, los bancos de germoplasma deberán disponer de los permisos legales para la recolección de germoplasma, ya sea en su entorno más próximo o en las áreas remotas que sea necesario muestrear. La tramitación de los permisos oportunos con las diferentes instituciones regionales o nacionales deben tener en cuenta las leyes de propiedad de recursos genéticos, así como las pautas generales de acceso y distribución de beneficios definidas en el CDB (ver capítulo II).



Número especial de la revista *Naturalia Cantabricae* (3) dedicado a las prioridades de conservación de flora en el norte de la Península Ibérica, como resultado de la actividad de la "Red Cantábrica de Conservación de Flora" grupo de trabajo de la Sociedad Española de Biología de Conservación de Plantas.

1.3 Métodos de selección de prioridades florísticas

1.3.1 Clasificación de prioridades

El concepto de “especie prioritaria” puede presentar diferentes interpretaciones, en función de los objetivos y los criterios utilizados como referencia, por lo que la elaboración de listas de prioridades puede ser muy variable. Pueden reconocerse tres tipos principales de listas (GRAMMONT & CUARÓN, 2006): (1) listas basadas en un grado de amenaza biológica; (2) listas de especies prioritarias o de interés para la conservación; y (3) catálogos normativos desarrollados por las instituciones mundiales, nacionales o regionales. En muchos casos, estas listas pueden coexistir, o incluso evolucionar de forma paralela en un mismo territorio.

Cuando los objetivos de un banco de germoplasma se orientan hacia la conservación de flora silvestre en sentido amplio, la tendencia inicial es la utilización de listas ya existentes, como las desarrolladas según los criterios de la UICN (IUCN 1994, 2001) u otros sistemas análogos de categorización (ATKINS, 2005; NATURE SERVE, 2005). En otros casos, los catálogos normativos desarrollados por las instituciones regionales o nacionales determinan la actividad de conservación *ex situ* de un banco de germoplasma, seleccionando objetivos en función de criterios variables, definidos a través del conocimiento de las especies en el territorio. Ambas referencias son especialmente útiles cuando se definen objetivos en un contexto geográfico (por ejemplo, conservación de la flora protegida en un territorio administrativo), o cuando se establecen objetivos globales (por ejemplo, conservación *ex situ* del 60% de las especies amenazadas, tal y como marca la Estrategia Mundial para la Conservación de las Plantas). Sin embargo, la variabilidad de la situación geográfica y los objetivos de los diferentes bancos de germoplasma puede requerir de una adaptación de prioridades, ya sea por razones geográficas (las listas mundiales o regionales pueden carecer de sentido a una escala subnacional) o por la necesidad de incluir taxones en función de intereses complementarios (por ejemplo, plantas endémicas, de interés científico, económico, medicinal, etc.).

La base conceptual para la selección de prioridades de conservación parte de la necesidad de utilizar variables complementarias a la amenaza biológica (MACE & LANDE, 1991), estableciendo así listas de especies de *especial interés para la conservación* (KELLER & BOLLMANN, 2004; HARRIS & al., 2005; COATES & ATKINS, 2001) o, simplemente, *listas de especies prioritarias* (PÄRTEL & al., 2004; FRANSWORTH & al., 2006; DUNN & al., 1999; MASTER, 1991). Entre las principales aportaciones de estas listas, figura la aplicación de grados de prioridad relacionados con las características biogeográficas o corológicas de las especies en estudio. Por ejemplo, pueden ser utilizadas para la valoración de la rareza de especies dentro y fuera de un área geográfica de estudio (NATURE SERVE, 2005), o establecer sistemas que permitan desestimar acciones de conservación sobre especies cuya viabilidad está asegurada en regiones limítrofes (EATON & al., 2005). La elaboración de este tipo de listas también se utiliza en la gestión directa de recursos, a partir de la priorización de especies en función de criterios relacionados con el éxito esperable en los planes de recuperación (MARSH & al., 2007). Siguiendo esta línea, los bancos de germoplasma pueden aplicar estas listas para la planificación de sus recolecciones, tal y como se está haciendo en la selección de objetivos de la red europea ENSCONET, o en la planificación de bancos de germoplasma de regiones administrativas de reducido tamaño (ver cuadro 1).

Un aspecto que debe ser tenido en cuenta a la hora de establecer un plan de selección de prioridades es el rango taxonómico a utilizar. La mayor parte de las listas relacionadas con la conservación de plantas suelen utilizar las categorías de *especie* y *subespecie* para la nomenclatura de los taxones considerados. Salvo excepciones, los rangos inferiores (variedad o forma) o los taxones híbridos no suelen considerarse como unidades de conservación propias. El principal problema surge cuando se encuentran plantas con diferentes categorías taxonómicas, que están en proceso de discusión científica, o pertenecen a grupos apomícticos o en proceso de especiación. En estos casos, la interpretación taxonómica de un taxón puede alterar sustancialmente la lista de prioridades generada, por lo que debe considerarse siempre la implicación de este tipo de decisiones, a ser posible con la asesoría de un experto conocedor del grupo taxonómico en cuestión. Los problemas taxonómicos pueden resolverse, en parte, tomando como unidades de conservación poblaciones o agrupamientos intraespecíficos, por ejemplo siguiendo los conceptos de las *Unidades Evolutivamente Significativas* (ESU) (WAPLES, 1995; ALLENDORF & LUIKART, 1997). En el caso de entidades híbridas, la conservación de unidades evolutivas implicaría también la conservación de los parentales (MARQUES & DRAPER, 2004). Sin embargo, en la mayor parte de los territorios no se dispone de información genética o evolutiva suficiente para la selección de unidades de conservación bajo estos criterios. Una alternativa a esta limitación puede ser la asunción de correlación entre la diversidad genética y ecológica, mediante el uso de estudios ecológicos aplicados a los procesos de selección de prioridades (ver capítulo 2).

1.3.2 Criterios de selección

La selección de prioridades puede basarse en multitud de criterios, determinados por los objetivos de cada centro de conservación, y que pueden ser considerados de forma conjunta o individual. Con el fin de ofrecer una visión general sobre las variables que pueden estar representadas, se resumen a continuación algunos de los principales criterios utilizados, y considerando especialmente aquellos que pueden ser de utilidad para la planificación de un banco de germoplasma de plantas silvestres. Gran parte de los criterios comentados forman comúnmente parte de los mecanismos de selección de prioridades en la mayor parte de los manuales de biología de conservación. No se incluyen otros criterios que puntualmente pudieran ser aplicados en función de otras necesidades taxonómicas, ecológicas, de biología reproductiva, etc., los cuales pueden ser tan variado como diversos los centros de conservación de plantas.

Grado de amenaza

Se trata sin duda del principal criterio para la selección de un taxón como prioritario. Los criterios generales definidos por la UICN (IUCN 1994, 2001) suelen ser los más utilizados como referencia, si bien deben considerarse siempre las implicaciones del cambio de escala en la asignación de categorías (IUCN, 2003), así como el grado de incertidumbre que los caracterizan (AKÇAKAYA & *al.*, 2000). En líneas generales, un grado de amenaza global puede considerarse como causa de mayor prioridad que la amenaza regional o local, si bien desde un punto de vista de la biodiversidad de un territorio es necesario valorar el efecto de la escala de valoración. En

la mayor parte de los casos, el estatus de amenaza de una especie suele aplicarse en función de indicadores de amenaza biológica, como una reducida extensión geográfica, un número bajo de poblaciones o un bajo tamaño poblacional, por lo que la información obtenida a partir de los análisis de viabilidad poblacional suele considerarse como más efectiva y fiable. Los bancos de germoplasma juegan un papel fundamental en la conservación de plantas silvestres en peligro de extinción, como herramientas complementarias para la supervivencia de especies en su medio natural y, en último caso, como reservas vivas del patrimonio genético de especies extintas o en proceso de extinción.

Endemicidad

El parámetro de endemicidad otorga exclusividad geográfica a un taxón, y por lo tanto puede representar una variable importante, a la hora de valorar la importancia de conservación. Al igual que en el caso anterior, la implicación de la escala geográfica resulta decisiva a la hora de establecer prioridades de plantas endémicas. En líneas generales, endemismos muy restringidos suelen considerarse con un mayor interés de conservación en su área de distribución, por lo que la mayor parte de bancos de germoplasma suelen incluir los endemismos regionales (estén o no amenazados) como objetivos para la conservación, con fines preventivos o de investigación. El criterio de endemicidad puede resultar de especial interés en áreas consideradas como *hotspots* o puntos calientes de biodiversidad, ya que su elevada densidad de especies endémicas (MYERS & *al.*, 2000) implica una especial responsabilidad de los centros de conservación que trabajan en estos territorios.

Rareza

El concepto de rareza debe considerarse en términos relativos, ya que si bien la mayor parte de las plantas amenazadas pueden considerarse como raras, muchas plantas especialmente raras no tienen por qué estar amenazadas, aunque sí pueden representar objetivos de conservación por motivos científicos o de otra índole. La rareza de plantas puede estar relacionada con la distribución disyunta o fragmentada, incluyendo procesos relictuales que pueden implicar una prioridad local para la conservación. La medida de rareza puede estar sujeta igualmente a numerosas interpretaciones, como la cuantificación del número de localidades, poblaciones o individuos en un territorio dado. RABINOWITZ (1981) desarrollaron una clasificación de gran aceptación sobre diferentes formas de rareza en plantas vasculares, incluyendo factores ecológicos y geográficos.

Protección legal

Las leyes sobre conservación de la naturaleza están acompañadas, en muchos casos, de listas de plantas protegidas para las cuales existe una reglamentación específica. De forma genérica, los organismos legisladores incluyen en sus catálogos unas “prioridades políticas” (*sensu* TENNER, 2003) para el territorio de vigencia, por lo que es lógico que los mismos organismos consideren que los centros de conservación deban tomar esas listas como referencia general. A escala supranacional, las listas de la Unión Europea (Directiva 92/43/CEE) o la legislación CITES son ejemplos de listas con una repercusión legal a escala global, que pueden ser tomadas igualmente como referencia para la selección de prioridades en bancos de germoplasma (ver

capítulo II). En líneas generales, los taxones incluidos en una o más listas normativas deberían ser considerados con un grado de prioridad más alto, al menos desde un punto de vista geográfico-administrativo.

Responsabilidad

El concepto de responsabilidad para la conservación se definió en origen para la valoración de la importancia de aves reproductoras a escala regional (DUNN *et al.*, 1999). A través de clases de responsabilidad, KÉLLER *et BOLLMANN* (2004) valoran la importancia de un taxón en un territorio dado, en relación con el interés de la misma especie a escalas más amplias. Otra aplicación de este concepto puede tomar como referencia las competencias legales para un territorio, en el sentido de los deberes éticos o políticos que las administraciones adquieren frente a los recursos genéticos que gestionan (JIMÉNEZ-ALFARO *et al.*, 2007). La valoración de la responsabilidad puede estar medida de forma cualitativa, a través de medidas cualitativas de importancia (responsabilidad alta, media o baja) o como resultado de la interacción de diferentes parámetros (ver cuadro 1).

Interés evolutivo

Algunas especies o grupos taxonómicos pueden ser identificados como elementos en proceso de especiación, o con unas características genéticas con potencial evolutivo (por ejemplo, poblaciones fragmentadas, aisladas o disyuntas). En los casos en que la diversidad genética de un taxón permite establecer *Unidades Evolutivamente Significativas* (ESU) en el territorio, las poblaciones designadas pueden seleccionarse con un determinado tipo de prioridad, de igual modo a como se haría con un endemismo exclusivo. El principal inconveniente para estas aplicaciones es la falta de conocimiento sobre muchas especies, si bien una duda razonable puede ser motivo para incluir una población o conjunto de poblaciones como de interés evolutivo, provocando así su consideración, como objetivo de conservación, salvando las dificultades que pudieran ofrecer estirpes híbridógenas. La utilización de poblaciones o localidades como elementos de prioridad en bancos de germoplasma está siendo cada vez más aplicada, principalmente en el caso de plantas cultivadas, aunque también comienza a formar parte de los criterios empleados para la conservación de germoplasma *ex situ* de poblaciones de plantas silvestres (FRANSWORTH *et al.*, 2006).

Papel biológico

A algunas especies se les atribuye un papel biológico sobre los ecosistemas, ya sea de modo estructural o funcional. Entre las categorías más utilizadas, puede señalarse la existencia de especies “clave” (ejercen una función ecológica relevante para el mantenimiento de ecosistemas) y especies “estructurales” (sostienen el componente físico de un hábitat). El papel de los bancos de germoplasma frente a estas especies puede ser importante, acumulando material germinativo representativo para la posterior recuperación de hábitats, especialmente en los casos en que los medios favorecidos se encuentren amenazados. Debido a ello, las especies funcionales o estructurales pueden considerarse como prioritarias para la conservación en los territorios donde realizan este papel, especialmente en el caso de ecosistemas amenazados.

Especies indicadoras y especies paraguas

Las especies “indicadoras” suelen definirse como aquellas que, con su presencia, ofrecen información ecológica sobre el medio en que viven, que puede ser interpretada en términos de interés de conservación o viabilidad de ecosistemas. Los “indicadores ecológicos” son usados comúnmente para el seguimiento y caracterización de áreas de interés para la conservación, cuya aplicación constituye uno de los objetivos del CDB. Las especies “paraguas” son aquellas cuya presencia implica un buen estado de conservación de un hábitat o territorio, indicando el mantenimiento de valores altos de biodiversidad. El interés de conservación de estas especies es obvio, principalmente para la elaboración de planes de estudio o recuperación, los cuales requieren generalmente de una perspectiva ecológica o dirigida a los ecosistemas.

Importancia económica

Muchas plantas poseen un valor económico directo o indirecto, relacionado con el mercado alimentario, textil, farmacéutico, de flora ornamental, etc. En el caso de plantas cultivadas a mediana o gran escala, existen redes específicas de bancos de germoplasma que recolectan y clasifican la variabilidad genética de las principales familias botánicas implicadas, así como una honda preocupación en la conservación de la biodiversidad de los recursos genéticos (ej. www.biodiversityinternational.org). Los bancos de germoplasma de plantas silvestres pueden estar más interesados, a la hora de seleccionar sus objetivos, en plantas cultivadas a pequeña escala (principalmente en huertos o jardines) o en plantas silvestres con potencial interés comercial. Los objetivos de recolección frente a estas especies pueden ser muy variados, desde una labor estrictamente de conservación (ej., almacenando muestras representativas de especies con aprovechamiento regulado) hasta actividades con fines comerciales (ej. desarrollando nuevos cultivares de flora ornamental a través de buenas prácticas de producción en jardines botánicos). En otros casos, los bancos de germoplasma pueden estar especializados en el germoplasma de plantas emparentadas con cultivares de interés económico (antecesores silvestres o *wild relatives*), en cuyo caso existen metodologías específicas para la selección de prioridades bajo este criterio (FLOR & al., 2006; MAXTED & al., 2007).

Relevancia social o cultural

Otros criterios de selección de objetivos pueden considerar el interés social o cultural de algunas plantas, a través de proyectos de recuperación de especies ornamentales, práticoas, o de interés etnobotánico. En el caso de plantas en peligro de extinción, las “especies bandera” constituyen ejemplos de prioridades basadas en un concepto de interés social o patrimonial, asignando un valor emblemático a especies amenazadas que se desea conservar, permitiendo así la implicación de colectivos relacionados con el medio ambiente y desarrollando medidas de divulgación. Los ejemplos de especies bandera en plantas vasculares son escasos, si bien pueden considerarse como plantas emblemáticas el edelweis (*Leontopodium alpinum* Cass.) en las regiones alpinas, el drago (*Dracaena draco* L.) en Canarias o el cedro (*Cedrus libani* A. Rich.) en el Líbano.

Coste / efectividad

En algunos casos, la decisión última sobre las especies que deben ser recolectadas puede establecerse en función de los costes derivados de su recolección o en la eficacia real del esfuerzo dedicado para su conservación. Una vez seleccionado un número previo de prioridades (por ejemplo, 20 taxones que requieren una acción inmediata), los fondos disponibles pueden ser repartidos en función de la accesibilidad de las poblaciones (no es lo mismo recolectar semillas de una planta de alta montaña y hábitat inaccesible que una planta de costa con un acceso cómodo en vehículo) o las técnicas empleadas para su caracterización, en función de la tecnología disponible (ej. puede haber limitación de recursos para el estudio de esporas o el cultivo de especies con semillas recalcitrantes).

La especialización en un determinado grupo biológico (ej., la existencia de un grupo de investigación en pteridófitos u orquídeas) puede hacer más efectiva la recolección de un tipo de plantas, definiendo para ellas un grado de prioridad más alto. Un ejemplo de ello es el sistema propuesto por MARSH & *al.* (2007), aplicando un criterio de “éxito potencial de recuperación” que está basado en diferentes componentes relacionados con la efectividad de recuperación de especies, a partir de sus propiedades biológicas o la capacidad técnica de desarrollar planes de recuperación para ellas.

1.3.3 Sistemas de valoración

Los parámetros anteriormente comentados, junto a otros que pudieran interesar a un centro de conservación, pueden ser aplicados para la valoración diferencial de plantas y la definición de prioridades. Las opciones de valoración son muy numerosas, y dependerán en gran medida de los parámetros seleccionados. La complejidad de situaciones posibles se acompaña, además, de la carencia de una terminología clara sobre las variables utilizadas en la definición de prioridades y su valoración, ya que los conceptos de riesgo de extinción, valor biológico, responsabilidad, etc. pueden utilizarse de muy diverso modo. Por ejemplo, MACE & *al.* (2007) establecen un conjunto de variables jerarquizadas como “clases” y “tipos” para la valoración de seis criterios independientes de valoración: importancia, dificultad, beneficios reportados, costes, urgencia y efectividad de éxito. El criterio de urgencia consideraría el riesgo de extinción de cada especie, mientras que el resto son utilizados como elementos complementarios para la asignación de prioridades, tal y como se entiende que debe tratarse la aplicación de las categorías de la UICN (MACE & LANDE, 1991).

El primer paso para la definición de prioridades consiste en la selección de taxones (poblaciones o unidades de conservación), generalmente utilizando las floras de referencia en el territorio, y definiendo unos criterios previos: grado de rareza, interés de conservación, grupos endémicos, etc. Salvo que se valore toda la flora presente en un territorio, estos sistemas representan en sí mismos un método de priorización preliminar. Una vez seleccionado un grupo de taxones, la valoración de criterios puede realizarse según dos sistemas principales (JIMÉNEZ-ALFARO, 2008): (1) *métodos por categorías*, basados en la asignación previa de grupos de prioridad; y (2) *métodos de acumulación*, obtenidos mediante la suma o acumulación de grados o valores de prioridad, a través de sistemas cuantitativos o semi-cuantitativos. Cuando la valoración de prioridades se realiza a partir de varios criterios o escalas geográficas, puede hablarse

de sistemas multi-criterio y multi-escala, respectivamente, los cuales pueden ofrecer una interpretación más completa sobre la prioridad de los taxones de un territorio.

Métodos por categorías

Las prioridades de conservación pueden definirse a través de categorías pre-establecidas, en función de un conjunto de atributos o reglas de decisión. En este grupo se incluyen los métodos cuantitativos (*rule-based methods* según MACE & al., 2007) como el sistema de la UICN (2001), en el que se utilizan criterios cuantificados y de tipo biológico para la asignación de un riesgo de extinción (distribución geográfica, declinación poblacional, etc.); también se incluyen aquí métodos cualitativos (*qualitative judgement methods* en MACE & al., 2007, REGAN & al., 2004) como el sistema utilizado por NATURE SERVE (2005) en América (EEUU, Canadá y Latinoamérica), mediante el cual se definen cinco categorías de amenaza (en Peligro Crítico; en Peligro; Vulnerable; Aparentemente a Salvo y a Salvo) a tres escalas diferentes (global, nacional y subnacional). Los métodos cualitativos suelen incluir el uso del criterio de expertos para la asignación de categorías de prioridad, incluyendo listas normativas, como por ejemplo la mayor parte de los catálogos de protección vigentes en España (DEVESA & ORTEGA, 2004).

Métodos de acumulación

Los métodos de acumulación utilizan la valoración de los criterios utilizados para realizar una valoración conjunta. Los rangos de prioridad asignados a cada parámetro pueden ser de tipo cuantitativo, generalmente ordinal (ej. 0, 1, 2,...) o cualitativo (ej. bajo, medio, alto). En el primer caso se incluyen los sistemas más comúnmente utilizados, denominados sistemas de puntuación (*point-scoring methods* en MACE & al., 2007), los cuales permiten elaborar índices de prioridad mediante la suma de las puntuaciones asignadas. Los principales inconvenientes de estos sistemas se basan en la arbitrariedad de la asignación del valor original y en el grado de correlación que los diferentes criterios pudieran presentar (MACE & al., 2007). A pesar de ello, en los últimos años estos sistemas se han aplicado con profusión en bancos de germoplasma, dirigidos a la recolección de plantas silvestres de interés para la conservación. Por ejemplo, KOLBERG (2003) establece un sistema semi-cuantitativo de acumulación, a partir de cuatro criterios (status de conservación, endemidad, distribución y valor económico) y asignando valores de prioridad (entre 0 y 1) que son sumados para la obtención de una puntuación final, con valores posibles entre 0 y 9. Un sistema similar está siendo aplicado en la red ENSCONET para la definición de prioridades a una escala biogeográfica, a través de un sistema modular (www.ensconet.org). Entre los métodos de acumulación cualitativos puede incluirse el “cubo de conservación” propuesto por AVERY & al. (1995), según el cual tres parámetros (amenaza global, declinación nacional y responsabilidad local) son valorados de forma cualitativa (prioridad alta, media o baja), utilizando las 27 combinaciones posibles de acumulación de prioridad, que son representadas gráficamente en un cubo (sistema multi-criterio y multi-escala de acumulación). Otra aplicación de estos sistemas es la propuesta de FRANSWORTH & al. (2006), utilizando un sistema de matrices de decisión en tres pasos, asignando tanto valores cualitativos (generalmente presencia/ausencia de un carácter) como cuantitativos. La novedad de la propuesta de FRANSWORTH & al. (2006) radica tanto en la unidad de estudio (considerando las

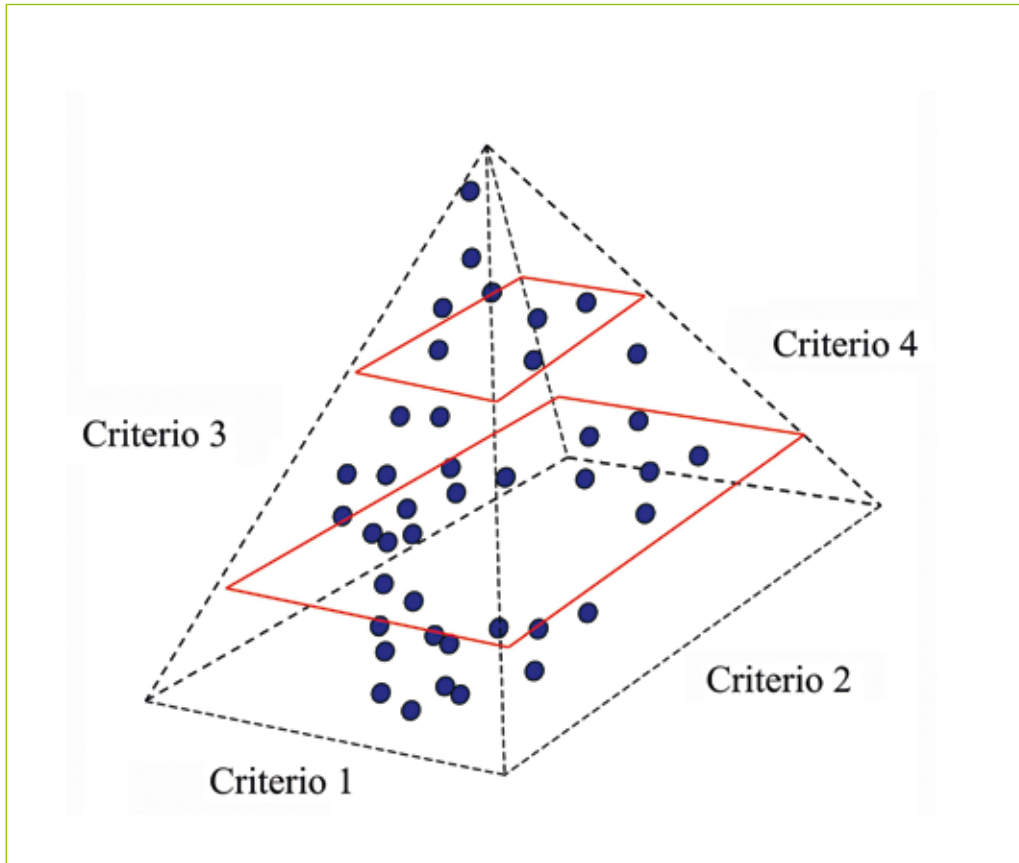


Figura 1.1 - Representación simplificada de un método de acumulación basado en cuatro criterios. En función de la valoración final de las especies (puntos) se define un rango de prioridad, simulado en este caso mediante una pirámide en cuyo vértice figuran las especies con mayor importancia de conservación (los polígonos interiores definen posibles puntos de corte para el establecimiento de grupos de prioridad).

poblaciones de cada especie) como en el tipo de parámetros utilizados, incluyendo tres valoraciones: (1) la viabilidad de preservación y germinación de semillas; (2) rareza, endemidad y estado de conservación; y (3) amenaza, diferenciación y accesibilidad de cada población. En algunos casos, los sistemas de acumulación utilizan parámetros basados en sistemas previos de asignación de valores (MARSH & *al.*, 2007) desarrollando así sistemas mixtos de valoración.

1.4 Aplicaciones en la planificación de bancos de germoplasma

Como conclusión general de este capítulo, conviene destacar la importancia de los sistemas de establecimiento de prioridades en las instituciones implicadas en la conservación *ex situ* de plantas silvestres (Figura 1.2). En el caso de los bancos de germoplasma, estos sistemas pueden formar parte de la planificación general de la actividad del centro, ayudando a definir los objetivos de las campañas de recolección y estudio de poblaciones.

Entre los principales factores que deben considerarse para el desarrollo de un plan efectivo de conservación *ex situ*, destaca la disponibilidad de información biológica suficiente sobre las especies que son seleccionadas y posteriormente valoradas en función de su importancia de conservación. Todo ello debe realizarse en el contexto de unos objetivos concretos, a partir de los cuales se definen las necesidades de conservación, en función de unos criterios coherentes con la institución o centro de conservación.



Figura 1.2. Planificación de recursos y gestión de prioridades en un banco de germoplasma (extraído de JIMÉNEZ-ALFARO, 2008).

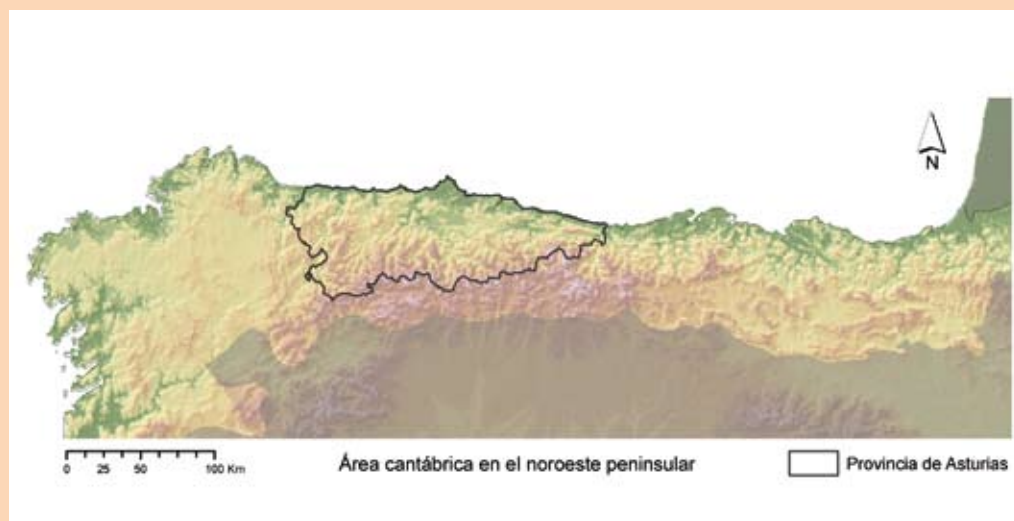
Selección de prioridades en el *Banco de Germoplasma Vegetal del Principado de Asturias* (a partir de JIMÉNEZ ALFARO & al., 2007)

Introducción

El Banco de Germoplasma Vegetal del Principado de Asturias (BGVPA), ubicado en el Jardín Botánico Atlántico desde el año 2003 (BUENO & FERNÁNDEZ PRIETO, 2003), tiene como objetivo la conservación de germoplasma de plantas silvestres, considerando de carácter prioritario aquellas presentes en el territorio regional e “incluidas en las normativas nacionales e internacionales de protección, en los listados UICN, y también aquellas plantas que se estime necesario conservar por su situación de amenaza o rareza”. La actividad del BGVPA intenta compaginar las labores de recolección de germoplasma con el estudio *in situ* de las poblaciones visitadas, con el fin de optimizar recursos y obtener información básica para la recopilación de información útil para los planes de conservación del Jardín Botánico Atlántico. Para el desarrollo de estas actividades, surgió la necesidad de establecer un listado de plantas prioritarias, como base para la toma de decisiones sobre los taxones objetivo de recolección y estudio. La reducida extensión y la situación geográfica de la región llevó a considerar un sistema de selección de prioridades que tuviese en cuenta diferentes parámetros y áreas biogeográficas, definiendo un sistema multi-escala y multi-criterio, a través de un sistema de valoración que definiera grados de importancia para la conservación.

Sistema de priorización

El primer paso a realizar fue la selección de prioridades para la conservación en el área de estudio, para lo cual se consideraron cuatro criterios relacionados con la conservación. Tres de ellos fueron utilizados para la selección preliminar de plantas de interés: (1) el grado de amenaza o riesgo biológico de extinción (AME); (2) el status legal de protección por las normativas vigentes (PRO); y (3) el grado de endemismo en el ámbito cantábrico (END). Posteriormente se incorporó un criterio de rareza (RAR) con el fin de priorizar aquellas plantas que, a igualdad de condiciones respecto a los criterios anteriores, son especialmente raras en la región, y por lo tanto se supone existe una mayor responsabilidad hacia ellas. Los parámetros fueron divididos en diferentes clases, ordenadas de menor a mayor interés para la conservación. Las categorías asignadas a cada planta, según los criterios AME, PRO, END y RAR, representan valores de tipo semi-cuantitativo, con una graduación por la cual las categorías superiores pueden ser consideradas como de mayor importancia y por lo tanto con un grado de preocupación mayor.



Ubicación de la Comunidad Autónoma de Asturias en el área cantábrica del noroeste peninsular.

Parámetro	Ámbito	Clase	Descripción
Amenaza (AME)	Estatad (España)	CR END VU	En peligro crítico (UICN nacional) En peligro (UICN nacional) Vulnerable (UICN nacional)
Endemicidad (END)	Regional (territorio cantábrico)	END1 END2 END3	Endemismo restringido a la unidad mínima (sector) Endemismo orocantábrico o cantabro-atlántico (subprovincia) Endemismo del área cantábrica s.l. (territorio atlántico-europeo)
Protección (PRO)	Autonómico (Asturias)	PEX SAH VU IE	En peligro de extinción (D 65/92 PA) Sensible a la alteración del hábitat (D 65/92 PA) Vulnerable (D 65/92 PA) De interés especial (D 65/92 PA)
Rareza (RAR)	Autonómico (Asturias)	RAR1 RAR2 RAR3 RAR4	Una única población conocida en Asturias Entre 2 y 10 poblaciones en Asturias Entre 11 y 100 poblaciones en Asturias >100 poblaciones en Asturias

Descripción de los criterios empleados para la asignación de clases.

Responsabilidad regional

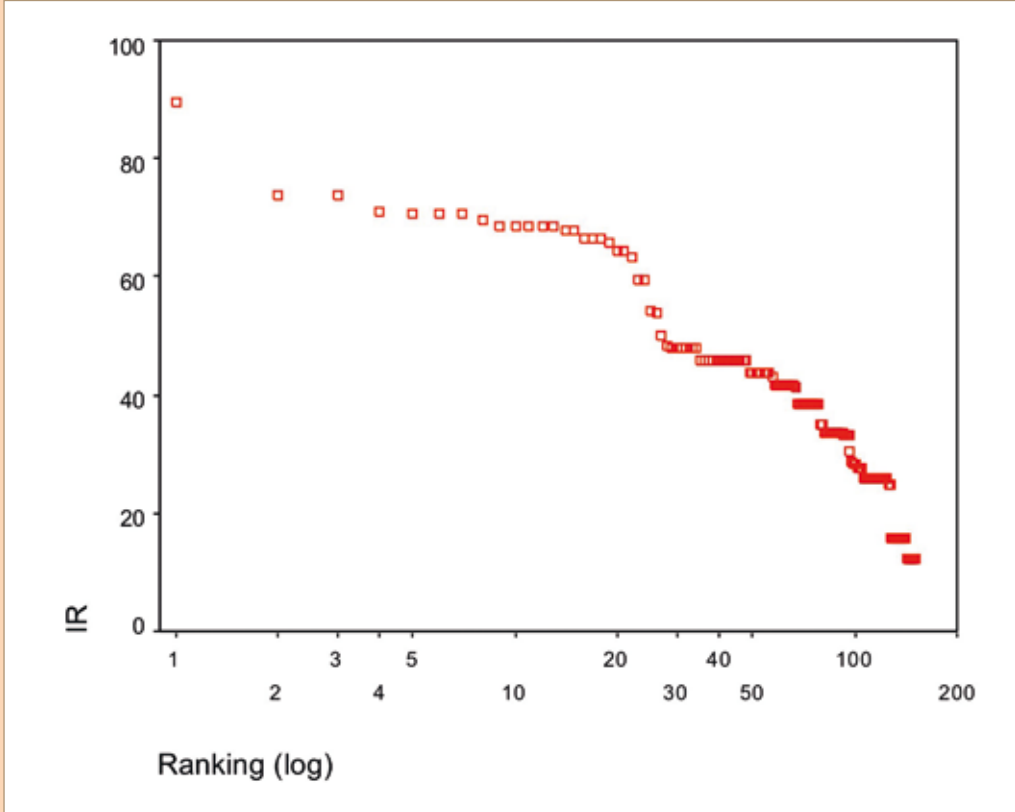
Siguiendo el modelo del “cubo de conservación” propuesto por AVERY & al. (1994), los criterios implicados en la categorización final de cada planta deben ser ponderados por igual, considerando la acumulación de valores altos como un signo de prioridad (KÉLLER & BOLLMANN, 2004). Con el fin de asignar un valor numérico que sirviera para la ponderación relativa, las clases de cada criterio fueron transformadas a valores cuantitativos discretos, en función de su percentil, asignándole el valor de la frecuencia acumulada, en sentido ascendente según su importancia. De este modo, el valor adquirido por las clases de menor importancia dependerá del número de plantas que lo compartan, asegurando siempre un mayor peso relativo para las clases más altas, especialmente si presentan bajas frecuencias. El percentil de cada clase fue calculado de manera independiente para cada criterio, en relación al número de plantas que cumplían los criterios de AME, PRO y END. En el caso del criterio de rareza (RAR) el percentil fue calculado en relación con el número total de plantas, ya que todas las plantas fueron incluidas en una de las clases de rareza definidas. Finalmente, el Índice de Responsabilidad fue calculado a partir de la media aritmética de los cuatro percentiles, según la expresión:

$$IR_i = (vp_i \text{ AME} + vp_i \text{ PRO} + vp_i \text{ END} + vp_i \text{ RAR}) / 4$$

Donde IR_i es el Índice de Responsabilidad de cada planta; y $vp_i(x)$ el valor de percentil adquirido por la planta en cada parámetro.

Plantas prioritarias

El sistema preliminar permitió seleccionar 150 plantas del catálogo de flora vascular autóctona de Asturias (103 especies, 45 subespecies y 2 híbridos), por cumplir al menos uno de los requisitos mínimos indicados de amenaza (AME), protección (PRO) o endemidad (END). Los valores adquiridos por cada clase en función de su percentil permitió definir un Índice de Responsabilidad (IR) para las 150 plantas vasculares de especial interés para la conservación en el Principado de Asturias. Los valores más altos corresponden a las plantas que cumplen los criterios mínimos para un número mayor de criterios, ya que presentan menor proporción de valores nulos (=0). Tan sólo dos plantas (*Centaureium somedanum* M. Lainz y *Dryopteris corleyii* Fraser-Jenkins) puntuaron para todos los criterios de selección (AME, PRO, END). Otras 27 plantas cumplieron dos de los tres criterios, mientras que las 122 restantes incluyeron dos valores nulos (=0), por lo que su valor final fue compensado únicamente por el criterio de rareza (RAR). Los valores finales del IR dependen del valor aportado por cada criterio, y permiten definir grupos en función de diferentes puntos de corte, entre los cuales las diferencias de IR son relativamente bajas.



Graduación ordenada de los valores finales de responsabilidad (IR) obtenidos a partir de la media de los percentiles (Ranking (log)) muestra la disposición de las plantas consideradas).



Foto B. Jiménez-Alfaro

Centaurium somedanum M.Laínz, endemismo cantábrico que vive en el entorno de fuentes carbonatadas, ocupa el número uno en la valoración de plantas vasculares de interés para la conservación en el Principado de Asturias.

2. Muestreo de poblaciones

2.1 Pautas generales

Los objetivos de la recolección pueden responder a criterios éticos, a la finalidad científica de la recolección o a las necesidades de gestión de cada territorio (ver capítulo 1). En todos los casos es necesario plantear un sistema de selección de localidades de muestreo, para lo cual existe abundante bibliografía relacionada con taxones de amplia distribución y/o de interés agroalimentario, pero escasa información sobre taxones raros o amenazados. Con el fin de presentar un panorama completo de las opciones de muestreo, se ha considerado importante, en este capítulo, hacer referencia a las principales aplicaciones prácticas a tener en cuenta, invitando a los recolectores a basarse en su experiencia en el campo y a apelar al sentido común, así como a las indicaciones que puedan ofrecer tanto los conservadores del banco como las personas con mayor experiencia en el campo.

Las estrategias de muestreo de poblaciones naturales deben intentar obtener el máximo de variabilidad genética en el mínimo número de muestras posible. El número absoluto de muestras a recolectar dependerá tanto de factores intrínsecos (número de genotipos en la población, tamaño poblacional relativo o absoluto, etc.) como extrínsecos (diversidad ecológica, factores de amenaza, etc.), así como de los objetivos concretos de la recolección y de los recursos disponibles. En cualquier situación, lo primero que debe hacerse es realizar una visita preliminar a la localidad preseleccionada para confirmar la identificación del taxón, determinar la viabilidad de la recolección y el periodo más probable de maduración del germoplasma. En los casos en que el tamaño de la población que pretendemos recolectar sea muy reducido o exista alguna limitación en la producción de semillas, esta primera visita puede ser dedicada a la polinización asistida de los individuos, para aumentar el éxito de la futura recolección.

Debido a los numerosos usos potenciales de las semillas, es importante maximizar el número de alelos presentes en cada muestra, recolectando la mayor proporción posible de los representados en una población. En condiciones óptimas, un lote de semillas recolectado en una única población debería ser potencialmente capaz de reestablecer la población en su localidad de origen, o en otros lugares compatibles con el rango ecológico natural del taxón y sus propias características genéticas, por lo que el objetivo debería ser incluir en una muestra al menos el 95% de todos los alelos presentes en la población. Cuando exista un conocimiento específico sobre la modalidad de polinización del taxón de estudio, este objetivo debería asegurarse a través de la recolección de semillas o de otro material vegetal de un número representativo de genotipos seleccionados aleatoriamente, especialmente en taxones con autopolinización (BROWN & MARSHALL, 1995). Como regla general, las poblaciones que tienen una alta diversidad son genéticamente más heterogéneas y requieren por tanto ser muestreadas más ampliamente, mientras que las poblaciones muy pequeñas deberían muestrearse en su totalidad. Cuando se conoce la estructura genética de una población, el muestreo de los recursos genéticos debe valorar la riqueza en alelos o el número de los distintos alelos de un solo locus. La riqueza alélica de una muestra es definible como la medida directa de su calidad (BROWN & MARSHALL, 1995).

La metodología de recolección aplicada por los recolectores resulta de vital importancia, puesto que se presenta como la interfaz entre la variabilidad genética presente en el campo y su representación en los lotes de ingreso al banco (NAMKOONG, 1998). Para proceder a la recolec-

ción de germoplasma de una población con fines de conservación, es necesario tener en cuenta algunas consideraciones, entre las cuales suelen apuntarse las siguientes:

- El muestreo debería realizarse sobre una población biológica genéticamente diferenciada, que en muchos casos puede estimarse en función de diferentes parámetros (distancias entre núcleos poblacionales, suelo, clima, altitud, polinizadores, barreras físicas, reproducción cruzada, etc). Las poblaciones deben ser silvestres, diseminadas por sí mismas, y no plantadas ni cultivadas.
- El número de poblaciones que permitan obtener una variabilidad genética adecuada puede variar de una especie a otra. En el caso de especies citadas en numerosas localidades, puede recomendarse iniciar el muestreo de al menos el 50% de poblaciones, a menos que se tenga información de base que permita escoger poblaciones representativas. En el caso de especies extremadamente raras y con un número limitado de localidades, es preferible proceder al muestreo de todas ellas.
- Las recolecciones de germoplasma deben asegurar, en todo momento, la viabilidad de las poblaciones en su hábitat original, por lo que debe valorarse el impacto que la extracción de un número determinado de semillas (variable en función de cada especie) tendría en la dinámica poblacional. La recolección debe también ajustarse a las características biológicas de la especie, como su ciclo vital (las especies anuales pueden ser más sensibles a la recolección) o su biología reproductiva (en plantas con morfotipos sexuales bien diferenciados es importante asegurarse de que se muestrean semillas de individuos de ambos morfos y no solamente de uno de ellos).
- El número absoluto de individuos a muestrear puede variar en función del tamaño poblacional total y los objetivos de la recolección. En algunos casos puede considerarse adecuado recolectar semillas de, al menos, el 50% de individuos. Este número puede incrementarse mediante la duplicación de algunas muestras, en los casos en que exista sospecha de que las semillas no se mantienen todas viables o en óptimas condiciones, o para evitar una posible pérdida de material durante el transporte o la cuarentena (BROWN & MARSHALL, 1995). En muchos bancos suele recomendarse recolectar un número mínimo estándar de 50 individuos, seleccionados de forma aleatoria y uniforme, excepto en poblaciones extremadamente reducidas, donde el número puede ser inferior.
- El número de semillas a recolectar puede variar enormemente, en función de cada especie y de la situación de cada población, por lo que no es posible establecer una cantidad mínima recomendable. A la hora de recolectar frutos o semillas, es necesario asegurar que existen semillas maduras, preferiblemente aún sobre la planta y en el momento de dispersión, verificando que no exista un alto porcentaje de semillas dañadas, depredadas o abortadas. Aún cuando se trabaja con especies con elevada producción de semillas, es necesario ajustar la recolección a las necesidades reales del banco, ya que, salvo condiciones de amenaza inminente, el mejor proveedor de semillas siempre será una población natural y viable. En condiciones óptimas, y siempre que sea posible, es preferible recolectar semillas de una población durante varios años, con el fin de minimizar el efecto de las variaciones ambientales.

Antes de iniciar los trabajos sobre el terreno (Figura 2.1) es necesario valorar la disponibilidad de información sobre las características ambientales, biológicas y corológicas de la especie. Los criterios de selección de las localidades de muestreo pueden basarse en criterios geográficos o genéticos, o incluso en una combinación de ambos. En el primer caso, parámetros como la distancia geográfica interpoblacional, la altitud, el clima o el hábitat pueden ayudar a individualizar la posible variabilidad genética existente en la población. Los muestreos genéticos, por su parte, permiten seleccionar áreas donde el taxón presenta un marcado polimorfismo, considerando la presencia o ausencia de barreras genéticas entre poblaciones y/o especies afines y simpátricas. A continuación se detallan algunas técnicas de muestreo basadas en ambos factores (geográfico y genético).



foto A. Bueno

Figura 2.1 - Muestreo demográfico preliminar de una población de *Carex capillaris* L. en el Parque Nacional Picos de Europa (España) en comunidades de alta montaña.

2.2 Criterios geográficos

Como ya se ha comentado, el objetivo principal de cualquier recolección de germoplasma es la maximización de la diversidad genética de las muestras que se pretende conservar. Es importante considerar en todo momento que los usos futuros que se pueda dar al material conservado dependerán en gran parte de cómo se realizó el muestreo. La principal limitación que se va a encontrar en el momento de abordar una misión de recolección va a ser la escasa documentación previa sobre la diversidad genética de las poblaciones a recolectar. En el apartado siguiente (2.3) se discutirá la estrategia de recolección considerando que se dispone ya de una idea previa sobre el comportamiento genético de la población. El objetivo de este apartado es inferir por vías indirectas el posible comportamiento de la diversidad genética, con el fin de desarrollar una estrategia de recolección. Para ello se analizan los factores ambientales como fuerzas de diversificación genética, y como herramienta para muestreos estratificados.

Los factores climáticos, como temperatura máxima y mínima, precipitación anual, periodos de reposo o crecimiento, intensidad lumínica y duración del día afectan y se reflejan en el desarrollo de las poblaciones (BENNETT, 1970). Por otro lado, los factores ecológicos son los principales determinantes de la diversidad genética (FORD-LLOYD & JACKSON, 1986). Cuando se habla de diversidad genética se debe tener claro que esta diversidad se explica mediante los dos grupos de factores comentados con anterioridad: (1) factores intrínsecos a la especie/población (sistema de cruzamiento, forma biológica, historia evolutiva, etc.) y (2) factores extrínsecos (edafología, clima, relaciones planta-animal). En este apartado se van a abordar las diferencias que los aspectos ambientales ejercen sobre las especies, dependiendo de donde se encuentren las poblaciones de las mismas, e incorporarlas en la estrategia de muestreo y en la frecuencia del mismo.

Cuando se pretende recolectar germoplasma de una determinada especie o de unas pocas especies es posible realizar muestreos previos que nos permitan definir los lugares más adecuados para realizar la recolección. Aunque estas acciones individualizadas han sido muy comunes hasta el momento, cada vez más los bancos de germoplasma van adquiriendo un papel determinante en la recolección urgente, masiva y dirigida a muchas especies simultáneamente, que no permite abordajes individualizados. La acción humana sobre el medio es cada vez más agresiva y afecta al ambiente tanto por una acción directa (construcción de infraestructuras, cambios de uso del suelo, etc.) como indirecta (cambio global, incendios, etc.) y cada vez se manifiesta con mayor velocidad. En estos casos las especies afectadas son muy numerosas y afectan tanto a las especies de forma individual como a las relaciones entre las especies (tanto animales como vegetales). En la mayoría de los casos no se dispone del tiempo ni de los recursos suficientes para analizar todo lo que sería deseable para definir una recolección especie a especie. En estos casos puede ser más recomendable un abordaje centrado en el territorio afectado, para lo cual es necesario saber cuáles son las especies o hábitats que se encuentran en esa zona determinada y conocer las variaciones ecológicas que se dan dentro de la zona.

2.2.1 Información preliminar necesaria

Antes de cualquier aproximación para la recolección en campo, se debe recopilar el máximo conocimiento posible tanto sobre el propio territorio como sobre las especies que lo ocupan. La estructuración de esta información debe tener como objetivo final el aumento de la eficiencia en todos los aspectos de la recolección: incrementar la recolección del mayor número de especies, incrementar la cantidad y calidad de los lotes recolectados, incrementar la diversidad genética de las poblaciones muestreadas, reducir el esfuerzo de campo y por último pero determinante reducir el esfuerzo económico.

La estructuración de una base de datos debe permitir la síntesis de toda la información proveniente de las diferentes fuentes consultadas. Esta información permitirá el análisis de lo que se tiene frente a lo que se pretende, así como identificar las especies o las áreas que no se encuentran representadas en nuestro banco. La recopilación de esta información también debe permitir analizar nuestra colección y determinar si las muestras son una buena representación de la distribución de las especies que conservamos o de las variaciones ecológicas que se incluyen en la colección.

La información necesaria debe centrarse en la determinación de los lugares donde se puede encontrar una determinada especie, donde se puede encontrar una mayor diversidad intra-específica, en qué lugar se deben recolectar muestras de una determinada especie donde se manifieste la diversidad intraespecífica, o donde se puede encontrar recursos genéticos con una determinada adaptación genética. Las respuestas a estas cuestiones permiten la organización de campañas de recolección más productivas y con resultados más satisfactorios.

Una primera aproximación al lugar donde se pretende realizar la recolección es esencial para planificar el itinerario de forma eficiente (REID & STRICKLAND, 1983). La preparación de la misión se ha realizado tradicionalmente basándose en el estudio de mapas, registros de herbario, floras locales y observaciones sobre el terreno para determinar las zonas a recolectar. El análisis de la ecología de los taxones y de su rango de distribución es esencial para determinar las zonas o los hábitats donde recolectar material. Tras encontrar las poblaciones de los taxones que se buscan se pueden realizar los muestreos necesarios, siempre sin comprometer el futuro de las poblaciones silvestres.

Si bien hasta el momento las estrategias de recolección se han centrado sobre una lista de especies o taxones, cada vez más es necesario disponer de la capacidad de actuar sobre áreas concretas (ver cuadro 2a). La actividad humana es capaz de generar rápidos cambios en el medio, que llevan a la desaparición de la cubierta vegetal. En algunos casos, la construcción de determinadas infraestructuras obliga a ejecutar medidas de emergencia sobre los recursos genéticos de las zonas afectadas, medidas dirigidas principalmente al rescate de la diversidad genética presente. La tarea más difícil es, en estos casos, la de identificar los lugares donde esta diversidad puede encontrarse. Todavía son escasas las situaciones en que se utiliza la información aportada por marcadores moleculares y su patrón de variación en el espacio en la definición de estrategias de recolección. Un ejemplo interesante sobre la variabilidad genética, su comportamiento geográfico y aplicaciones futuras en caracterización y mejora genética es el de *Stylosanthes macrocephala* M.B. Ferreira & Sousa Costa, realizado por BARROS & al. (2005). Estos autores combinan técnicas de marcadores moleculares y sistemas de información

geográfica para detectar las zonas de mayor diversidad genética y determinar posibles lugares de recolección. Ya que no es común disponer del conocimiento previo sobre los patrones de distribución de la diversidad genética en un determinado territorio (FARNSWORTH *et al.*, 2006), es necesario recurrir a medidas indirectas. Con un conocimiento adecuado sobre la zona donde habitan las especies pretendidas se puede utilizar la información del medio para inferir la diversidad genética o la diversidad biológica de determinadas zonas y construir con ello una estrategia de recolección.

Las relaciones entre la representatividad genética y la representatividad ecogeográfica han sido abordadas por GREENE *et al.* (1999) apoyándose en los factores ecogeográficos que contribuyen a la diferenciación genética. Son diversos los estudios que han encontrado correlaciones entre distancias genéticas y distancias geográficas, principalmente en el estudio de especies cultivadas (DEL RIO *et al.*, 2001; GUPTA *et al.*, 2002; BAEK *et al.*, 2003). Sin embargo, FERGUSON *et al.* (1998) consideran que estas correlaciones no son generalizables, siendo variables de especie a especie. Ello hace que en el caso de especies raras o amenazadas, deban considerarse las características propias de distribución, dispersión, biología reproductiva, etc. Como regla general, la estratificación de los sitios de recolección debería ofrecer una distribución basada en consideraciones climáticas y ecológicas. La intensidad del muestreo, por su parte, debe ser mayor allí donde las combinaciones de los factores climáticos y ecológicos sean más variables (FORD-LLOYD *et al.*, JACKSON, 1986).

2.2.2 Selección de las poblaciones

Cuando se trabaja con especies raras o con un número de poblaciones reducido (ej. menos de 5) es relativamente fácil determinar los lugares donde se debe recolectar germoplasma, si bien siempre que sea posible debe intentarse muestrear todas las poblaciones (GUERRANT *et al.*, PAVLIK, 1998; HAVENS *et al.*, 2004). Más difícil es determinar qué poblaciones deben ser recolectadas en el caso de especies con un mayor número de poblaciones, casos en los que la priorización de las poblaciones es necesaria, aunque nada fácil. Por otro lado, un banco de germoplasma generalmente dispone de recursos limitados (tanto humanos como de infraestructura o espacio disponible) que deben ser racionalizados, determinando para cada situación cuántas y qué poblaciones pueden ser conservadas. El principal desafío que existe actualmente a la hora de definir una misión de recolección es la priorización de poblaciones que maximice la diversidad alélica (NEEL *et al.*, CUMMINGS, 2003; GROVES, 2003).

Una propuesta para ayudar a seleccionar poblaciones de especies de amplia distribución se muestra en DRAPER *et al.*, (2003, 2004a). Estos autores proponen la utilización de algoritmos de agrupación para determinar zonas ecológicamente homogéneas donde se encuentra la especie de interés, permitiendo seleccionar según los criterios que se pretendan unas poblaciones u otras. En la figura 2.2 se ejemplariza el proceso propuesto con un caso hipotético para recolectar *Celtis australis* L. en Portugal (especie que se distribuye por toda la mitad norte del país), considerando únicamente 5 variables ambientales (altitud, precipitación, temperatura media, duración helada y tipo de suelo) y 10 grupos homogéneos. Del análisis de grupos se obtiene un árbol de clasificación y a la vez un nuevo mapa que representa las unidades ambientales homogéneas. Utilizando el árbol de clasificación se puede determinar las poblaciones de qué áreas

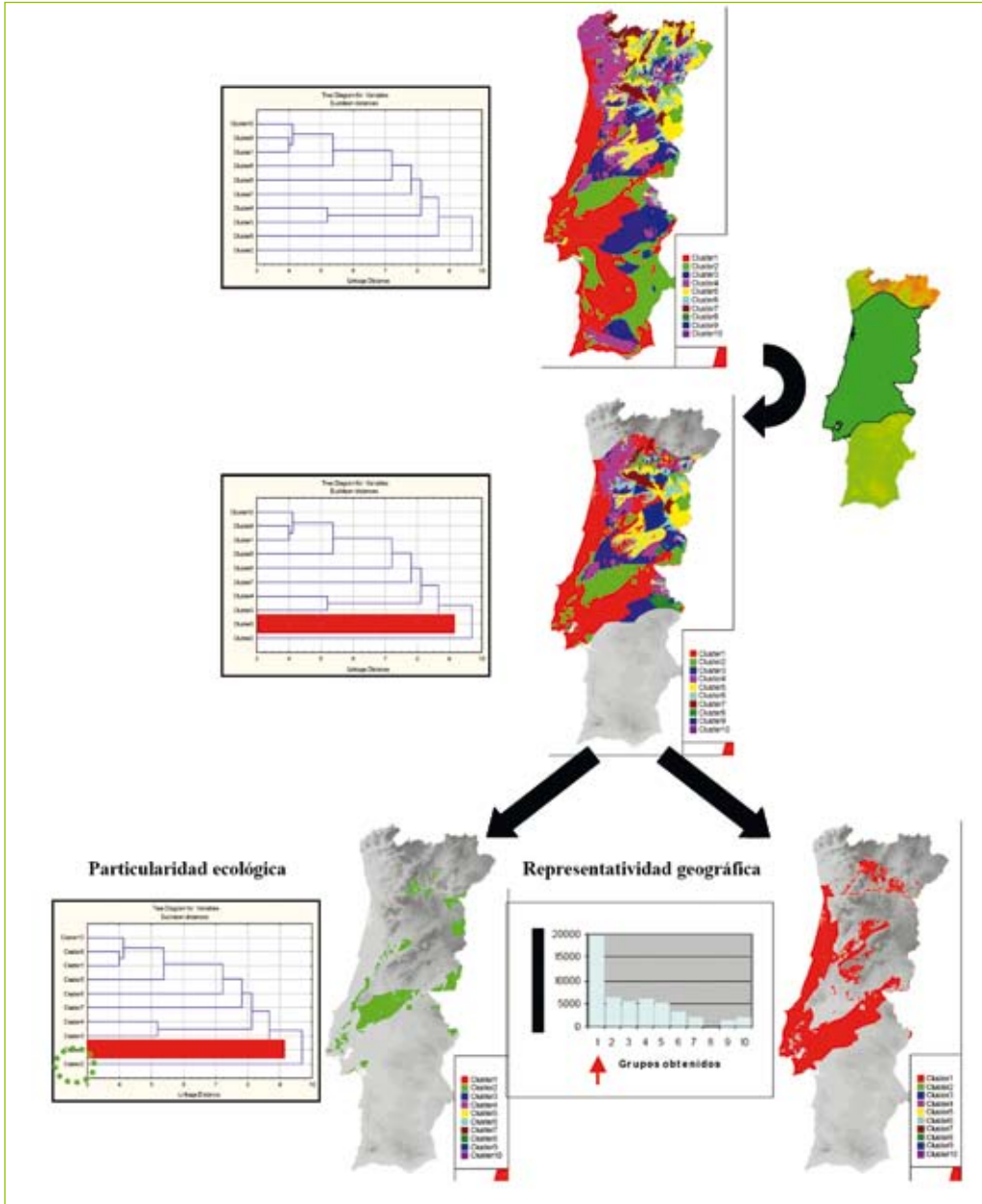


Figura 2.2. Método propuesto por DRAPER & AL. (2004b) para seleccionar lugares de recolección de germoplasma de especies comunes o con numerosas poblaciones maximizando la diversidad genética. En primer lugar, se generan las unidades ecológicamente homogéneas para todo el territorio, y sobre ellas se superpone la distribución de la especie de interés (en algunos casos determinadas especies no coinciden con algunas unidades ecológicas). A partir de esta superposición y dependiendo de los criterios que se pretendan pueden seleccionarse los lugares en función de la particularidad ecológica dentro del territorio, la combinación de factores más común, etc.

están sometidas a las condiciones más particulares o más semejantes. Por otro lado, a partir del mapa podemos ver qué combinación de variables es más frecuente en la distribución de *Celtis* o cual de ellas tiene menor representatividad geográfica. Si lo que se pretende es recolectar el mayor número de alelos se debería al menos recolectar material en cada una de las unidades homogéneas en que la especie se encuentra; si lo que interesa es recolectar una determinada combinación de variables, este método permite localizar las diferentes manchas que tienen las mismas condiciones. En el cuadro 2a se ilustra un caso real en que se aplicó esta metodología.

2.2.3 Herramientas

Aunque las principales fuentes de información continúan siendo las tradicionalmente utilizadas, se está asistiendo a un cambio considerable en las herramientas con las que la información es consultada y analizada. Una mayor accesibilidad a la información de colecciones biológicas y a la información ambiental permite dedicar mayor esfuerzo al análisis de la propia información. Algunos ejemplos que muestran el incremento del análisis de los datos disponibles para la optimización de una recolección de germoplasma se pueden encontrar en GREENE & al. (1999). Para la definición de unidades con características ambientales homogéneas y la obtención de representatividad genética de las muestras a recolectar puede consultarse a DRAPER & al. (2003), mientras que HIJMANS & al. (2000) muestran sistemas para la determinación de sesgos en colecciones *ex situ*.

En este apartado se dan a conocer las herramientas y técnicas que pueden utilizarse para la organización de las tareas y documentación de las accesiones. No se pretende presentar de forma exhaustiva y sistemática una lista de herramientas, sino centrarse en aquellos usos que pueden ser más útiles y novedosos. Algunas de estas herramientas no pueden ser consideradas como novedosas, ya que tienen su origen en métodos con más de 2 o 3 décadas de historia, o son comúnmente utilizadas en otras disciplinas científicas. Lo que las hace actuales son las aplicaciones que de ellas se derivan o la combinación de procesos aplicados a la recolección de germoplasma.

En los apartados siguientes se presentan tres tipos de herramientas que pueden ser utilizadas en diversas fases del proceso de recolección y se discutirá el papel de los sistemas de información geográfica en la gestión de la información para la recolección de germoplasma. También se presentará el método propuesto por MAXTED & al. (1995) para la elaboración de estudios ecogeográficos y su aplicación en la conservación de recursos genéticos. Finalmente se comentará la utilidad del análisis de lagunas (*gap analysis*) en la detección de las mismas.

Los Sistemas de Información Geográfica y su utilización en recolección de germoplasma

Los Sistemas de Información Geográfica (SIG) son un conjunto de procesos concebidos con el objetivo de almacenar, acceder y manipular información georreferenciada (HENRIQUES, 1990). En otras palabras, se trata de un sistema de gestión de una base de datos dedicado a la manipulación de características gráficas relacionadas con atributos almacenados en formatos alfanuméricos.

La aparición de los SIG se dio a mitad del siglo XX y se desarrolló por las necesidades crecientes en la gestión del territorio. Desde ese momento las aplicaciones de los SIG se fueron

ampliando a la vez que iban mejorándose las potencialidades de los sistemas. No fue hasta la década de los 80 cuando, gracias a un mayor desarrollo de los sistemas informáticos, se potenció y facilitó su difusión. Una mayor disponibilidad de cartografía temática digital (sea por información obtenida por satélites o por mapas digitalizados) propició la expansión de los SIG en campos como la ecología y la gestión de los recursos naturales. La utilización de los SIG en la gestión de la información para la conservación de recursos fitogenéticos se inicia a finales de la década de los 80 con iniciativas de varias agencias internacionales como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) o el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP) (GUARINO, 1995).

Una descripción de los diferentes elementos que participan en un SIG se puede encontrar en la serie de trabajos llevados a cabo por Guarino y colaboradores (GUARINO, 1995; GUARINO & al., 1999; GUARINO & al., 2002). Estos autores identifican 4 elementos principales del proceso en SIG:

- Introducción, verificación y edición de datos
- Almacenamiento, recuperación y gestión de la información
- Análisis de los datos
- Productos finales

Siguiendo esta estructura, es posible encontrar diversos ejemplos de casos reales aplicados directamente a la recolección de germoplasma. La base de las funcionalidades de un SIG radica en la calidad de los datos almacenados y la calidad de las coordenadas atribuida a cada registro, por estos motivos el esfuerzo que se dedique a mejorar la calidad de la información revertirá en la mayor potencia de los análisis y de las acciones de ellos derivadas. En esta línea, la verificación de las coordenadas de una determinada colección o de datos provenientes de otras colecciones es una de las primeras tareas a realizar antes de cualquier análisis (HIJMANS & al., 1999). Las recolecciones de germoplasma se basan generalmente en el conocimiento adquirido que se dispone sobre la distribución de determinados taxones. La utilización de la información contenida en herbarios y otras colecciones biológicas provoca frecuentemente sesgos en las recolecciones, dado que las fuentes iniciales suelen llevar incorporados estos sesgos. La evaluación de la calidad de las muestras respecto a la distribución espacial de las mismas permite identificar diferentes tipos de sesgos y definir estrategias de muestreo aleatorio que reduzcan el efecto de los mismos. HIJMANS & al. (2000) analizaron los sesgos geográficos incorporados a las colecciones de patata silvestre e identificaron una mayor frecuencia de recolección en zonas próximas a carreteras y a zonas consideradas como centros de diversidad genética. Mucho más común es encontrar resultados de análisis de datos para caracterizar muestras de germoplasma (BERGER & al., 2003, BARROS & al., 2005, PARRA-QUIJANO & al., 2007), para determinar los lugares para recolectar (HIJMANS & al., 2000; HIJMANS & SPOONER, 2001; DRAPER & al., 2003), para priorizar áreas para conservación *in situ* y *ex situ* (JARVIS & al., 2002, 2003), o analizar adaptaciones climáticas de las accesiones (FERGUSON & al., 2005).

Hay diversos programas de SIG que pueden ser utilizados para las diferentes tareas propias de un banco de germoplasma, y aunque se puede trabajar con programas genéricos, cada vez más surgen aplicaciones más especializadas y dirigidas a cuestiones concretas. Una de las prin-

Las principales ventajas de utilizar una aplicación específica es que la curva de aprendizaje del usuario sobre la aplicación es mucho más rápida cuanto más específico es el programa. Por otro lado, debe analizarse con mucho cuidado la adaptación de un programa muy especializado a un determinado banco, ya que podría suceder que no cubriera todas las necesidades del mismo. Un caso particular es el del programa DIVA-GIS producido por el Centro Internacional de la Papa (CIP) en colaboración con el *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI, actualmente *Bioversity International*). El programa se ha desarrollado pensando en cubrir las necesidades de los bancos de germoplasma para la gestión de la información de sus colecciones, y es de distribución libre (www.diva-gis.org). Entre las potencialidades de DIVA-GIS pueden destacarse la capacidad de mejorar y verificar las coordenadas de las accesiones utilizando bases toponímicas (HIJMANS *et al.*, 1999), además de permitir el cálculo de varios índices de diversidad, y la extracción de datos climáticos en las zonas donde se recolectó material.

Estudios ecogeográficos

Frente a la necesidad de realizar un proyecto de conservación de recursos filogenéticos es necesario considerar una serie de información que permitirá definir la mejor aproximación a la recolección. La aproximación más generalizada es la propuesta por MAXTED *et al.* (1995) en la que se propone la realización de estudios ecogeográficos que contemplen aspectos tan variados como la taxonomía, distribución geográfica, diversidad genética, adaptaciones ecológicas, y los aspectos geográficos, ecológicos y climáticos de la zona en cuestión. Dado que las poblaciones no se reparten uniformemente en el espacio, es necesario poder determinar los factores que condicionan o favorecen a una determinada especie. Así, el punto de partida para la realización de estos estudios ecogeográficos son herbarios, datos de pasaporte de accesiones de germoplasma, contribuciones de especialistas, bibliografía, mapas, etc. Los objetivos que se pretenden cubrir con la realización de estos estudios son la identificación de determinadas adaptaciones, la localización de taxones o hábitats particulares, la complementariedad entre zonas, la presencia de áreas con elevada diversidad (específica o genética) o con riesgos de erosión genética. Estos estudios se basan en la consideración de que existe una correlación entre diversidad genética y diversidad ambiental de las poblaciones que se encuentran en esas zonas. Si bien esta consideración es un punto de partida, hay algún estudio que concluye que el grado de correlación entre la diversidad genética y la diversidad ecológica es dependiente de cada especie (FERGUSON *et al.*, 1998). Dado que no es posible disponer de estudios referentes al comportamiento de la diversidad genética de todas las especies que se pretenden conservar, la consideración de la existencia de una relación entre diversidad genética y diversidad ecológica puede ser considerada como mayoritariamente verdadera (MAXTED *et al.*, 2008) y corroborada por diversos autores (DEL RIO *et al.*, 2001; GUPTA *et al.*, 2002; BAEK *et al.*, 2003).

Los estudios ecogeográficos están considerados como herramientas básicas para la conservación efectiva de especies silvestres emparentadas con cultivadas (HODGKIN *et al.*, 1997; MAXTED *et al.*, 1997). En GUARINO *et al.* (2005) se describe la metodología necesaria para la realización de los estudios ecogeográficos basándose en los trabajos anteriores de MAXTED *et al.* (1995) y MAXTED *et al.* (1998). Estos autores estructuran la metodología en tres fases principales:

- Fase 1: Organización del proyecto
- Fase 2: Compilación y análisis de la información
- Fase 3: Obtención de los productos resultantes

(1) *Organización del proyecto*: En esta primera fase es necesario definir el cometido del proyecto definiendo la zona en que se va a trabajar, el material vegetal que se pretende recolectar y los objetivos de la recolección. El paso siguiente es contactar con los especialistas sobre el taxón pretendido, en el caso de especies silvestres es muy importante que este especialista conozca tanto el taxón como la zona que este ocupa. A continuación se debe definir la delimitación taxonómica del taxón a recolectar consultado floras locales, expertos y monografías recientes, de manera que se establezca una base nomenclatural consensuada. La delimitación geográfica de la misión sería la acción siguiente, siendo recomendable que la zona incluya toda la distribución de los taxones objeto de estudio, garantizando así la inclusión de toda variación intraespecífica. Para este fin es necesario recurrir a mapas (en formato papel o digitales) topográficos y temáticos (vegetación, clima, geología, etc.) que permitirán comprender no sólo la distribución geográfica sino también la ambiental. Para concluir esta fase es necesario localizar y consultar la información depositada en colecciones biológicas (herbarios o bancos de germoplasma).

(2) *Compilación y análisis de la información*: En este momento del estudio es necesario tener una idea de las accesiones ya depositadas en colecciones de germoplasma provenientes de la zona y del taxón seleccionado. Para ello es necesario consultar los principales bancos de germoplasma que puedan disponer del material e inventariar sus accesiones. El objetivo de ello es documentar el rango de diversidad ya conservada (sea *in situ* o *ex situ*) e identificar las lagunas de las colecciones ya establecidas. Toda la información obtenida hasta el momento debe ser estructurada de manera homogénea para facilitar su análisis posterior. Esto supone que la información proveniente de fuentes diferentes debe ser uniformizada tanto en lo que se refiere a formatos como a contenidos (mismo sistema de coordenadas para todos los registros, mismo formato de fechas, etc). La posibilidad de disponer de información complementaria sobre el taxón (fenología, biología reproductiva, tipo de dispersión, etc.) así como usos y estado de conservación permitirán definir mejor las actividades de conservación. Llegado este punto se está en condiciones de analizar toda la información adquirida hasta el momento, a través de análisis que pueden ser representaciones visuales de las accesiones, registros de herbario sobre mapas temáticos para poder determinar rangos o frecuencias, o análisis más complejos, dependiendo de la información que se disponga. En este momento la utilización de SIG permitirá facilitar el análisis y generar resultados con mayor eficiencia. Un ejemplo de caracterización ecogeográfica es el trabajo sobre las especies silvestres de *Arachis* realizado por FERGUSON & al. (2005) o el de BENNET & BULLITTA (2003) sobre *Trifolium*. Tanto en el apartado donde se han comentado los sistemas de información geográfica como en GUARINO & al. (2005) se citan diversos análisis que pueden ser realizados dependiendo del objetivo pretendido.

(3) *Obtención de los productos resultantes*: Según MAXTED & al. (1995), los principales productos finales de una aproximación de este tipo son una base de datos, una sinopsis (*conspetus*) y el informe. En la base de datos se recogerá la información ecogeográfica derivada de los registros de herbario y los datos de pasaporte de las muestras de germoplasma. La sinopsis

incluiría la información relativa a la taxonomía y nomenclatura, referencias a la distribución, ecología y la fenología de los taxones del grupo estudiado. El informe final está formado por el análisis realizado sobre la base de datos y la sinopsis. En este documento final se incluirán las prioridades y estrategias de conservación.

Esta metodología está muy difundida en la recolección de especies silvestres emparentadas con especies cultivadas (EDMONDS, 1990, EHRMAN & COCKS, 1990, BOTHMER & al., 1995, MAXTED 1995, HUGHES, 1998, MAXTED & al. 2004) pero aún es poco común su aplicación en otros casos. Adaptaciones de este proceso pueden aplicarse para la caracterización de colecciones (PARRA-QUIJANO & al., 2007), la definición de colecciones nucleares de sorgo (GRENIER & al., 2001), sésamo (XIURONG & al., 2000), cebada (IGARTUA & al., 1998), arroz (YAWEN & al., 2003) y altramuces (PARRA-QUIJANO & al., 2007), o la definición de estrategias de recolección de germoplasma a escala regional (DRAPER & al., 2003) o a escala nacional (DRAPER & al., 2004).

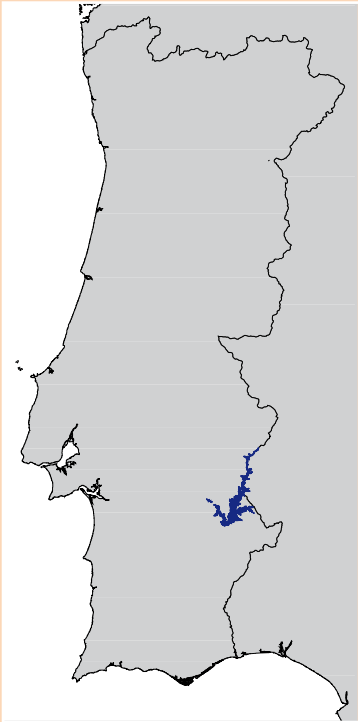
Análisis de lagunas (*Gap analysis*)

Una herramienta que combina las dos anteriores es la identificación de lagunas (*Gap analysis*) en las colecciones de germoplasma. Esta técnica se propuso como método de evaluación para identificar áreas donde determinados taxones no están representados (MARGULES, 1989). Aunque inicialmente este tipo de análisis se planteó para la definición de áreas en estrategias de conservación *in situ*, también es posible adaptarlo a la conservación de recursos genéticos tanto *in situ* como *ex situ* (PARRA-QUIJANO & al., 2003; STOLTON & al., 2006; PARRA-QUIJANO & al., 2007). Las lagunas que pueden existir en una colección pueden ser de varios tipos, desde las de tipo taxonómico hasta las de tipo geográfico. Los sistemas de información geográfica permiten identificar territorios que no han sido muestreados o zonas poco representadas en una determinada colección. Por ejemplo, PARRA-QUIJANO & al. (2003) aplicaron el análisis de lagunas para la conservación del género *Lupinus* en España.

BURLEY (1988) consideró cuatro pasos para la realización de un análisis de lagunas: (1) identificar y clasificar la biodiversidad; (2) localizar las áreas gestionadas principalmente para la biodiversidad (áreas protegidas, reservas, etc.); (3) identificar la biodiversidad no representada en estas áreas; y (4) definir prioridades de conservación. Con esta estructura se realizó el programa de conservación del género *Vigna* en África (MAXTED & al., 2005).

Sectorización ecogeográfica de la zona afectada por la construcción del embalse de Alqueva (Alentejo, Portugal) para la recolección de germoplasma. (a partir de DRAPER & *al.*, 2003)

Introducción



Ubicación del embalse de Alqueva situado en la frontera entre España y Portugal.

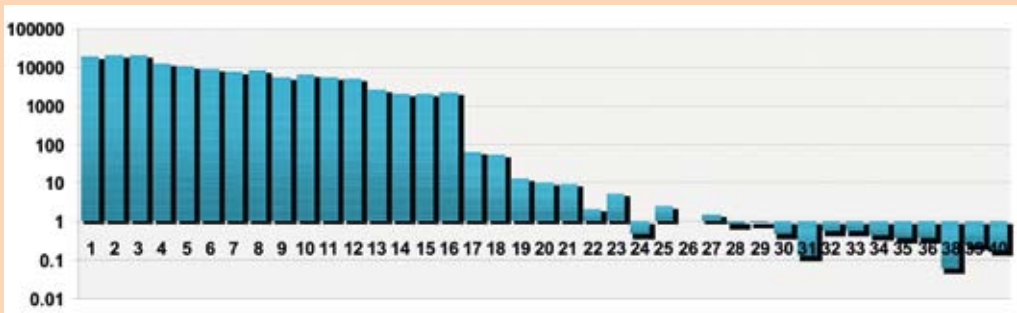
En primavera de 2001 se inició un ambicioso proyecto que consistía en recolectar y conservar la flora de la zona que sería posteriormente inundada por el embalse de Alqueva. Este embalse representa la mayor superficie artificial de Europa y suponía la inundación de 25.000 ha en la cuenca del río Guadiana. La zona afectada constituía un área con un interés ambiental relevante y una riqueza florística estimada en unas 550 especies de plantas vasculares, 97 de ellas catalogadas como de interés para Portugal (CAPELO, 1996). Este proyecto formaba parte de las acciones de minimización del impacto del embalse, con el objetivo de reducir la pérdida de recursos filogenéticos y de poder suministrar material vegetal autóctono para las futuras acciones de compensación del impacto.

La necesidad de recolectar una elevada diversidad de especies en un espacio de tiempo reducido (3 años efectivos) obligó a desarrollar técnicas para la optimización del proceso de recolección de germoplasma. Con este propósito y con la necesidad de recolectar tanto la mayor diversidad de especies y de diversidad genética, se recurrió a una aproximación ecogeográfica que integrase tanto la información de la distribución de las especies como las variaciones ambientales que se daban en la zona afectada (MAXTED & *al.*, 1997). Debido a la necesidad de recolectar muchas especies y de asegurar además la recolección de aquellas de interés para la conservación, se definió un método que permitiera, con el mínimo esfuerzo, pasar de un enfoque geográfico a otro nivel específico, y viceversa. El proceso adoptado se basó en el supuesto de que la diversidad genética de las especies es mayor cuanto mayor el número de muestras recolectado en diferentes condiciones ecológicas.

Sectorización de zonas ecológicamente homogéneas

Para determinar las zonas con afinidades ecológicas se utilizaron herramientas estadísticas de agrupamiento por un método iterativo no supervisado y con un algoritmo de máxima verosimilitud. Las variables utilizadas para la sectorización se engloban en variables geofísicas y climáticas. Las variables geofísicas se generaron a partir de un modelo altimétrico con una equidistancia de 1.5 m proporcionado por la propia empresa que construyó el embalse (EDIA S.A.). Para cubrir la máxima amplitud ecológica también se incluyeron variables edáficas como el tipo de suelo y el pH del mismo (C.N.A., 1983). Se generaron mapas rasterizados de la zona con una resolución de 25 m para todas las variables utilizadas. Las variables climáticas se generaron a partir de los modelos propuestos por SÁNCHEZ-PALOMARES & *al.* (1999) para la cuenca del Guadiana.

Como resultado final se obtuvieron un total de 40 grupos, de los cuales 13 de ellos tenían una superficie total en la zona considerada inferior a 1 ha. Estos grupos aunque pequeños en superficie representan características ambientales particulares que deben ser contempladas en la estrategia de recolección aunque a efectos prácticos muestrear estos grupos diminutos y muy fraccionados puede suponer un elevado esfuerzo de campo y económico. Por estas razones en este caso concreto se disolvieron dentro de los grupos vecinos. Una vez obtenido el mapa final se podía estratificar zonas de muestreo en función de la superficie de los grupos o en número de polígonos que se obtuvieron de cada grupo (una vez que las mismas condiciones ecológicas se pueden dar en diferentes lugares dentro de la zona considerada). Se disponía ahora de un mecanismo de selección que podía ser cruzado con mapas de riqueza de especies u otros factores. En particular, queríamos asegurarnos que las especies de interés para la conservación fueran recolectadas en varios sitios y de características ambientales diferentes. Necesitábamos una aproximación focalizada a cada especie.



Representatividad de la superficie en hectáreas de cada grupo eje horizontal, en escala logarítmica.

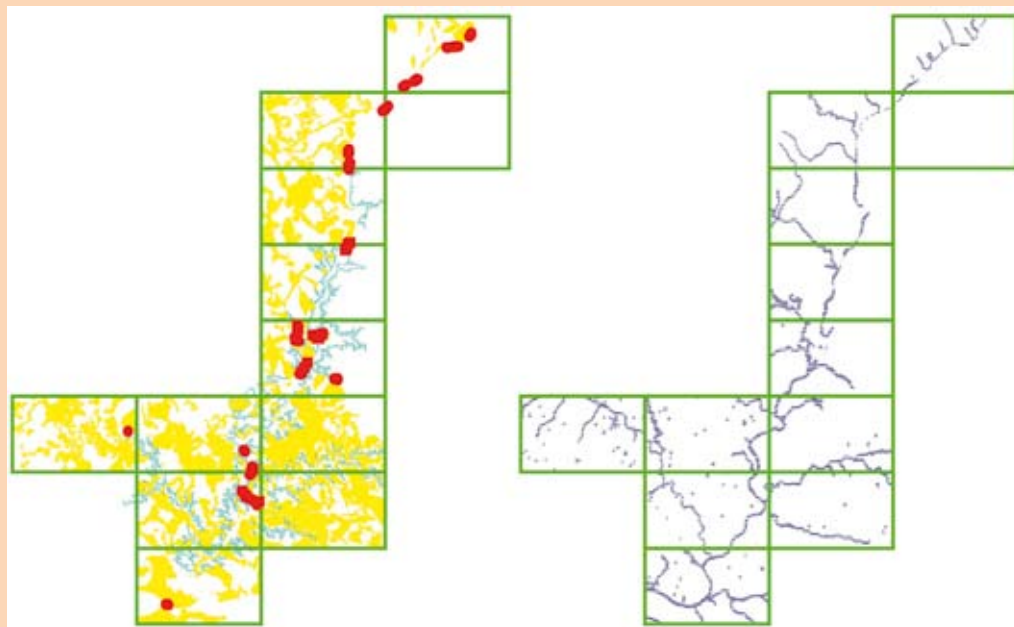
Protocolo seguido para el análisis de especies de interés particular

Para el enfoque específico podemos ilustrar, a título de ejemplo, el caso del pteridófito acuático endémico del suroeste de la Península Ibérica *Marsilea batardae* Launert, incluido en la Directiva 92/43/CEE. Se disponía de los mapas de distribución, especie a especie dentro de la zona considerada y se disponía también de las zonas en que no se había encontrado cada especie (DRAPER & *al.*, 2000A,B). Esta cartografía se realizó entre 1999 y 2000 con una resolución de 1 ha (BALLESTER-HERNÁNDEZ & *al.*, 2000). El hecho de disponer de mapas binarios de presencia/ausencia para cada especie nos permitió la generación de modelos logísticos de probabilidad de distribución de cada especie como herramienta más apropiada (PRESS & WILSON, 1978). Se validaba el modelo final con una muestra independiente del 25%. El modelo estadístico para *M. batardae* se realizó a partir de las variables significativas: inclinación del terreno, distancia a ríos, temperatura mínima, y número de días de helada por año. Los porcentajes de atribución correcta para las presencias y las ausencias fueron de 97 y 92% respectivamente (n=222).

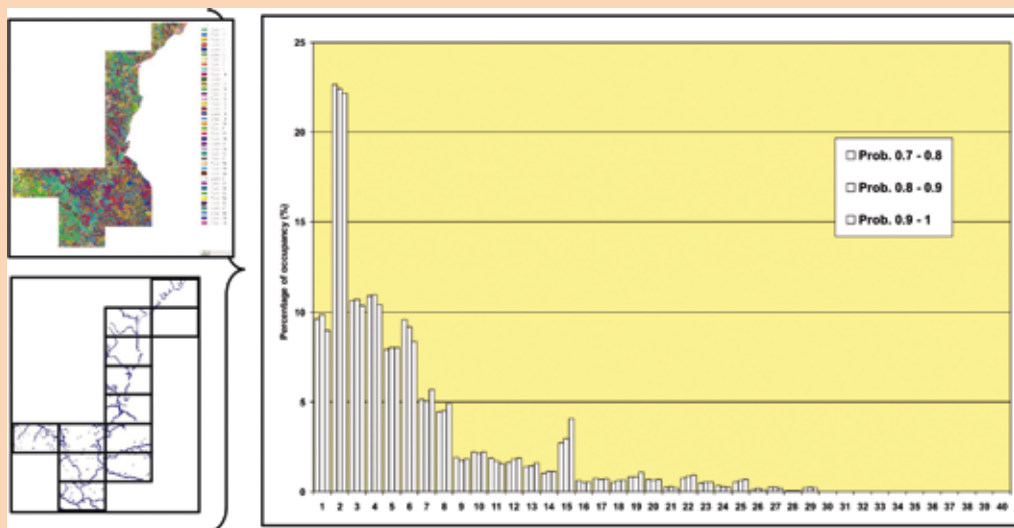
Protocolo mixto

Una vez desarrollado el modelo de probabilidad de la especie y el mapa de los grupos eco-geográficos pueden cruzarse ambas capas para identificar en qué grupos es más probable encontrar una especie diana (*M. batardae*) e incluso cuál es la frecuencia de cada intervalo de probabilidad para cada grupo. De este modo es posible sintetizar el riesgo (en forma de probabilidad) de ir a un determinado grupo y encontrar o no la especie deseada. También es posible seleccionar aquellos grupos donde *M. batardae* puede encontrarse en condiciones óptimas (donde tenemos mayor frecuencia de valores) así como identificar en que grupos está sometida a mayores adversidades (allí donde este presente pero en muy poca frecuencia). Para un correcto muestreo deberíamos visitar al menos cada uno de los grupos en que la especie pueda encontrarse, si esto no es posible por alguna limitación disponemos de una manera objetiva de seleccionar las zonas más extremas para cada especie.

Resumiendo, a partir de una buena caracterización de la zona donde vamos a trabajar podemos diseñar una sectorización que nos permita maximizar la diversidad genética de las especies que se encuentren en varios de los grupos obtenidos. Si a esta sectorización podemos añadir un relativo conocimiento de la distribución de las especies más interesantes para la conservación podemos evaluar tanto el rango ecológico de la especie en la zona estudiada como el esfuerzo necesario para muestrear todo o parte de ese rango ecológico.



Mapa inicial de la presencia y ausencia (rojo y amarillo respectivamente) de *M. batardae* (izquierda) y el resultado del modelo logístico de distribución para la misma especie (derecha).



Superposición entre los grupos obtenidos basándonos en variables ambientales y el modelo de distribución de *M. batardae*. En el gráfico podemos ver la frecuencia de píxeles (1 ha) para los valores de mayor probabilidad de encontrar *M. batardae*.

2.3 Criterios genéticos

El primer artículo del Convenio sobre la Diversidad Biológica (<http://www.biodiv.org/convention>) enfatiza la importancia de preservar los recursos genéticos de los organismos vivos. De esta forma, fomenta el uso de los desarrollos teóricos y empíricos de la genética de poblaciones para evaluar el estatus presente de los organismos amenazados e inferir prioridades y objetivos de conservación.

En el caso particular de la conservación de germoplasma, el conocimiento de los niveles y distribución de la variación genética en las poblaciones naturales es un requisito importante para diseñar estrategias de muestreo que garanticen la captura de una proporción representativa de la variación genética, ya sea con destino a su almacenamiento en bancos de semillas, a la restauración de hábitats destruidos, al reforzamiento de poblaciones en declive o al establecimiento de micro-reservas (HAMRICK *et al.*, 1991; O'BRIEN, 1994; FRANKEL *et al.*, 1995; CHAMBERLAIN, 1998; PRITCHARD, 1999; SHRADES-FRECHETTE *et al.*, 1999; FRANCISCO-ORTEGA *et al.*, 2000; BATISTA *et al.*, 2001; CAUJAPÉ-CASTELLS *et al.*, 2004; PEARSE *et al.*, 2004).

No obstante, a pesar de este consenso unánime, muchas estrategias de conservación *ex situ* no incorporan consideraciones genéticas. Esta situación es doblemente paradójica: primero, porque contradice el mencionado consenso; y segundo, porque existe una gran cantidad de parámetros y ensayos genéticos que pueden utilizarse para orientar decisiones de muestreo. Acumular semillas sin disponer de una estimación básica de la variación genética de las especies de interés tiene al menos una consecuencia indeseable, porque el gran esfuerzo humano y económico que representa la recolección de germoplasma se muestra de escaso valor efectivo para la conservación: al desconocer los niveles de variación genética en el taxón de interés, tampoco podemos disponer de una estimación de la representatividad de nuestra colección. Puesto que la misión de un banco de germoplasma no consiste meramente en “acumular semillas”, sino en garantizar la representación y conservación a largo plazo de la variabilidad genética de las poblaciones naturales de plantas, parece que la estimación de los niveles de variación genética debe ser un cometido inherente a su actividad.

Ciertamente, la estrategia general de basar la conservación *ex situ* en el análisis genético demora la recolección de material y es inviable a gran escala. No obstante, sí es factible aplicar los métodos genéticos a las especies más amenazadas, que son precisamente las que requieren mayor esfuerzo de conservación *ex situ* (FAY, 2003). El objetivo de este apartado es mostrar cómo la información sobre los niveles y distribución de la variabilidad genética puede usarse para diseñar estrategias de muestreo de semillas que representen un máximo de variación genética minimizando el esfuerzo de muestreo, los gastos de recolección y el espacio del banco dedicado al almacenamiento de esas muestras.

El muestreo poblacional previo para estimar la variabilidad genética se asume como dado para los propósitos de este apartado (para más detalles sobre este aspecto, puede verse CAUJAPÉ-CASTELLS, 2006). Además, partiremos de las siguientes cuatro premisas, algunas de las cuales han sido ya discutidas en las secciones precedentes: (i) disponemos de una estimación suficiente de la variabilidad genética del organismo a conservar en toda su área de distribución;

(ii) no hay dudas acerca de su identidad taxonómica; (iii) sus poblaciones producen semillas, y lo hacen en cantidad suficiente como para que nuestro muestreo para conservación *ex situ* no merme su continuidad en el futuro; y (iv) esas semillas son adecuadas para la conservación a largo plazo, y la metodología del banco de germoplasma de destino garantiza este objetivo.

2.3.1 Técnicas de muestreo en la captura de diversidad genética

Suponiendo que hemos detectado suficientes niveles de variación genética en el taxón de interés, es posible evaluar sistemáticamente los resultados de los análisis genéticos con el marcador molecular poblacional usado (aloenzimas, microsátélites, AFLPs, RAPDs, PCR-RFLPs) para dar respuestas cuantitativas a tres preguntas cruciales en el muestreo genético para conservación *ex situ*:

- a) ¿Cuántas poblaciones deberían muestrearse intensivamente para capturar un porcentaje significativo de la variación genética de una especie?
- b) ¿Qué poblaciones deberían considerarse para cumplir este objetivo con un mínimo esfuerzo?
- c) ¿Cómo tendría que llevarse a cabo el muestreo en las poblaciones seleccionadas para minimizar la probabilidad de muestrear individuos emparentados?

El método propuesto para sistematizar las decisiones en relación a estos tres puntos (esquemático en la figura 2.3) se explica en CAUJAPÉ-CASTELLS (2006), y pueden verse algunas aplicaciones en VILCHES *et al.* (2002) o en CAUJAPÉ-CASTELLS *et al.* PEDROLA-MONFORT (2005). Como se muestra en la figura 2.3, la primera decisión genética importante para el muestreo de semillas es si deberían agruparse todas las poblaciones, dividir las en varios grupos de más de una población, o considerar cada población individualmente. Para atender esta consideración, es importante establecer subdivisiones de partida y testar si nuestros criterios para establecerlas tienen un reflejo a nivel genético, que es el que realmente importa si pretendemos representar la variabilidad.

En la práctica, puede haber múltiples criterios de subdivisión *a priori*, dependiendo del tipo de taxón y de la información de que dispongamos sobre él. Por ejemplo, SOLTIS *et al.* GITZENDANNER (1999) muestran que la conservación de la biodiversidad tiene más sentido si las unidades biológicas se identifican unívocamente con grupos monofiléticos. En consecuencia, si disponemos de filogenias moleculares para el grupo considerado, uno de estos criterios podría basarse en si hay uno o varios grupos monofiléticos diferenciados a este nivel.

Otro criterio de subdivisión *a priori* es la separación geográfica (siempre y cuando vaya asociada a un accidente geográfico abrupto o a un tiempo de aislamiento prolongado). Por ejemplo, las poblaciones del endemismo canario *Matthiola bolleana* Webb *ex* Christ (ver cuadro 2b) solamente están descritas en las islas de Fuerteventura y Lanzarote. En principio, es conveniente considerarlas como grupos separados bajo un criterio exclusivamente geográfico y, posteriormente, ver si los análisis genéticos moleculares confirman esta separación. La Tabla 2 lista éstos y otros criterios potenciales para establecer subdivisiones *a priori*.

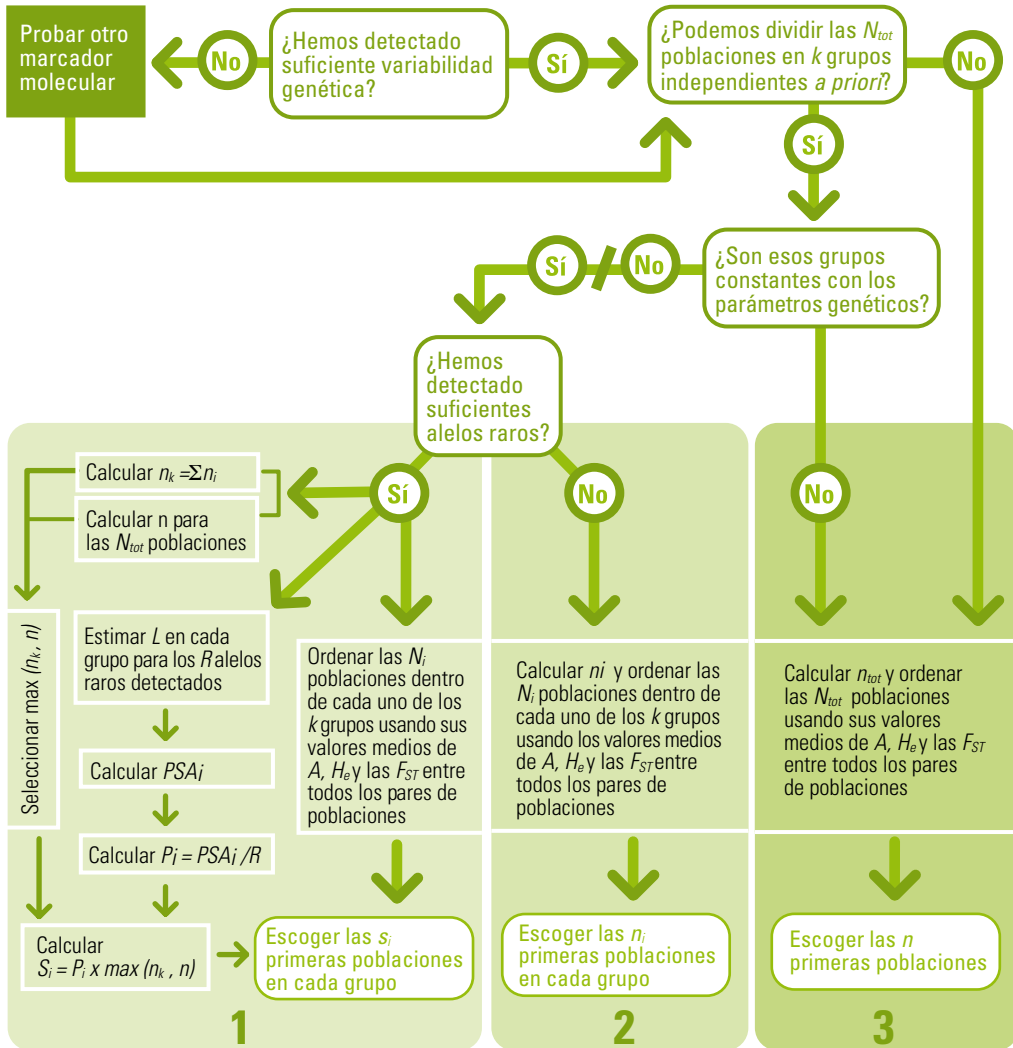


Figura 2.3. Diagrama de flujos representativo de las etapas del método de muestreo genético desarrollado (a partir de CAUJAPÉ-CASTELLS, 2006). Las definiciones de los parámetros implicados se dan en la Tabla 3. Los números 1, 2 y 3 designan las tres posibles rutas de selección de poblaciones diana para muestreo que se desprenden de este método, dependiendo de si hemos detectado suficientes alelos raros (1) o no (2) en grupos con diferencias significativas entre sus valores de F_{ST} o de si no hemos detectado diferencias significativas entre los valores de F_{ST} de los grupos (3). Este organigrama está pensado para conducir al investigador a las poblaciones que deben muestrearse para representar la proporción de variación genética detectada. No se incluyen aspectos sobre el muestreo en el espacio de las poblaciones seleccionadas, que sí se discuten en el apartado «¿Cómo muestrear los individuos?» de este capítulo.

2.3.2 Consistencia de las subdivisiones *a priori* con los parámetros genéticos

Para determinar si las subdivisiones realizadas en base a estos criterios (o quizás a otros que se juzguen adecuadamente objetivos para el caso en cuestión) tienen reflejo a nivel genético, es factible utilizar dos tipos de aproximaciones.

La primera opción es la aplicación de métodos bayesianos para determinar el número de unidades genéticas a partir del polimorfismo detectado. Por ejemplo, los algoritmos del programa STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000; FALUSH *et al.*, 2003) asumen que todo el material genético de los individuos muestreados procede de un número indeterminado de K poblaciones no observadas. Los individuos en la muestra se asignan probabilísticamente a poblaciones dependiendo de sus vectores de frecuencias alélicas en cada uno de los loci analizados, o a dos o más poblaciones si los genotipos lo apoyan. Por lo tanto, las asignaciones de pertenencia a poblaciones se realizan exclusivamente a partir de los datos genéticos.

La segunda opción para evaluar la robustez genética de las subdivisiones *a priori* parte de las poblaciones tal y como el investigador las define en el campo, y consiste en utilizar los valores de los parámetros clásicos (ver Tabla 3): G_{ST} (NEI, 1973) o F_{ST} (WRIGHT, 1951). Los valores de estos estadísticos varían entre 0 y 1 y cuantifican la proporción de la variabilidad genética total que se explica por la diferenciación entre poblaciones. Valores muy elevados indican una pronunciada subdivisión genética poblacional, mientras que valores muy bajos indican una considerable cohesión genética entre las poblaciones. Aunque existen otros métodos para estimar la distribución inter-poblacional de la variación genética (ver por ejemplo HAMRICK *et al.*, 1989), el procedimiento de NEI (1973) parece tener más sentido biológico por ser más sensible a la diferenciación poblacional estimada a través de la variación de frecuencias alélicas entre poblaciones (CULLEY *et al.*, 2002). El principio lógico sobre el que nos vamos a apoyar es que si existen diferencias significativas entre el valor de G_{ST} calculado para todas las poblaciones de un taxón y el valor de este parámetro calculado para cada una de las subdivisiones que hemos definido *a priori*, entonces podemos argüir que las subdivisiones realizadas tienen un trasfondo genético y que, por tanto, los grupos deberían considerarse separadamente. Por el contrario, la similitud entre los valores de G_{ST} nos ofrece un argumento robusto para considerar a los grupos conjuntamente. En términos prácticos, si las G_{ST} parciales no difieren significativamente de la G_{ST} total está justificado agrupar a todas las subdivisiones como una sola unidad de conservación. Por el contrario, si los valores de G_{ST} parciales sí difieren de la G_{ST} total, las subdivisiones consideradas existen también a nivel genético, y se sustenta su consideración de manera separada.

Puesto que los valores de G_{ST} o F_{ST} están más sobrestimados cuantas menos muestras se utilicen para su cálculo (CAUJAPÉ-CASTELLS 2007) y los muestreos para la estimación de la variabilidad genética suelen representar una baja proporción de los individuos censados en las poblaciones (especialmente en poblaciones grandes), parece más aconsejable utilizar para estas evaluaciones las aproximaciones bayesianas, que se basan exclusivamente en parámetros genéticos y producen asignaciones bastante precisas incluso con números bajos de loci (PRITCHARD *et al.* 2000).

Variable	Criterio
Demografía	Diferentes características demográficas (ej., poblaciones que han sufrido un cuello de botella frente a otras que no lo han sufrido, poblaciones jóvenes frente a viejas).
Ecología	Clara heterogeneidad de hábitat entre áreas de distribución.
Geografía	Discontinuidades geográficas obvias entre grupos de poblaciones.
Historia	Valor añadido de las poblaciones en una región determinada (p.e., poblaciones relicticas frente a modernas), diferentes grados de fragmentación.
Filogenia	Adscripción robusta a clados diferentes en filogenias moleculares o morfológicas.
Biología Reproductiva	Diferentes síndromes reproductivos.
Taxonomía	Existencia de diferencias morfológicas que tienen relevancia taxonómica (subespecies, variedades...).

Tabla 2. Variables y criterios posibles para definir grupos *a priori*, según el organigrama de la figura 2.2.

Parámetro	Definición genérica
N_{tot}	Número total de poblaciones.
k	Número de grupos considerados.
N_i	Número de poblaciones incluidas en la subdivisión "i".
G_{ST}	Proporción de variación explicada por el componente inter-poblacional (Nei 1973).
n_{tot}	Número de poblaciones a muestrear en el grupo compuesto por todas las poblaciones.
n_i	Número de poblaciones a muestrear en la subdivisión "i".
L	Probabilidad de pérdida alélica para cada alelo que satisfaga las condiciones de rareza.
R	Número de alelos que satisfacen las condiciones de rareza.
PSA_i	Número de alelos raros para los que la subdivisión "i" es el area de muestreo preferida.
P_i	Proporción de poblaciones a muestrear en la subdivisión "i".
S_i	Número de poblaciones a muestrear en la subdivisión "i".
A	Número medio de alelos por locus.
H_e	Heterozigosidad media por locus.
F_{ST}	Proporción de variación explicada por el componente interpoblacional (WRIGHT, 1951).

Tabla 3. Definiciones básicas de los parámetros utilizados en la metodología que se describe en la figura 2.2 (a partir de CAUJAPÉ-CASTELLS, 2006).

Es necesario recordar que, a pesar de que estas indicaciones cuantitativas tienen validez a nivel general, son simplemente pautas orientativas de actuación; en muchas situaciones reales, puede ser aconsejable mantener las subdivisiones a pesar de que las diferencias genéticas entre ellas no sean significativas. Sería el caso, por ejemplo, de taxones con grupos de poblaciones en diferentes zonas ecológicas o en zonas geográficas con difícil intercambio genético entre ellas. Hemos de tener presente que los métodos de estimación de la variabilidad genética se basan en un muestreo muy poco significativo del acervo genético total de los organismos (solamente unas pocas zonas del genoma, solamente una técnica molecular) y, por tanto, siempre estiman la variación genética por defecto. Por ello, es posible que taxones con marcadas diferencias ecológicas, o que hayan permanecido aislados mucho tiempo (esto es, sin intercambiar genes), hayan desarrollado también diferenciaciones genéticas a niveles que no detectemos con nuestro examen de variabilidad. Por estos motivos, mientras solamente hay una trayectoria posible en el organigrama en caso de detectar diferencias significativas entre los valores de G_{ST} , parece preferible dejar la opción de escoger entre dos trayectorias si no se detectan diferencias a este nivel (ver figura 2.3).

¿Cuántas poblaciones?

HAMRICK (1983) recomienda un muestreo que capture al menos el 99% de la variación genética para preservarla en bancos de semillas. La estimación del número de poblaciones a muestrear (n) para representar una proporción P de la variación genética detectada viene dada por la relación $P = 1 - G_{ST}^n$ (HAMRICK & *al.*, 1991), que mostró su robustez frente a diferentes métodos de cálculo de G_{ST} (ver las simulaciones llevadas a cabo por CULLEY & *al.*, 2002). No obstante, un inconveniente potencial a su aplicación generalizada es que asume niveles parecidos de variación genética en las poblaciones consideradas.

Esta asunción no presenta implicaciones en el caso de taxones sin subdivisiones significativas, donde estimaríamos n utilizando el valor de G_{ST} calculado juntando todas las poblaciones (ruta 3 en la figura 2.3). Pero si la subdivisión poblacional se sustenta a nivel genético (rutas 1 y 2 en la figura 2.3), entonces es preferible estimar n para todas las poblaciones y para cada una de las subdivisiones. En este caso, es muy probable que la suma de las n estimadas para cada subdivisión sea ostensiblemente diferente del valor de n estimado para las poblaciones agrupadas. Cuando se dé este caso, se hace aconsejable optar por la estimación de n que implica un mayor número de poblaciones, en aras de una buena representatividad genética (ver el ejemplo de *Matthiola bolleana* Webb *ex* Christ en el cuadro 2b).

Para taxones con subdivisiones significativas donde se hayan detectado suficientes alelos raros (ruta 1 en la figura 2.3), es además conveniente tenerlos en cuenta en el diseño del muestreo. El razonamiento que subyace de este proceder es que las poblaciones donde hayamos detectado más alelos raros neutrales a través de la técnica molecular aplicada probablemente contendrán también más alelos raros con valor selectivo, que son los que realmente interesan para la conservación de la biodiversidad. Es una asunción discutible (el salto lógico que plantea no tiene por qué ser cierto), pero hemos de considerarla operativa dada nuestra ignorancia del número y distribución de los alelos con potencial selectivo.

Para incorporar la información que ofrecen los alelos raros a nuestro diseño de muestreo,

aplicamos la noción de probabilidad de pérdida alélica (esto es, la probabilidad de que una muestra poblacional de tamaño N no contenga un alelo con frecuencia poblacional p), que se estima mediante la expresión $L = (1 - p)^{2N}$ solamente para los alelos que cumplan un criterio adecuado de rareza (BENGTSSON & *al.*, 1995).

Como se ilustra en el ejemplo de *M. bolleana*, es necesario hacer estos análisis con el conjunto de las poblaciones (como si no hubiera subdivisión) como para cada una de las subdivisiones (para saber en cuál de ellas los alelos raros compartidos tienen menos probabilidad de pérdida). El último paso que hay que llevar a cabo es consignar cuál es la subdivisión en la que sería más probable muestrear cada alelo raro [esto es, aquella en la que la probabilidad de pérdida observada (L_o) sea menor]. Al final de este proceso contamos con una estimación de las proporciones que deben guardar los números de poblaciones de cada subdivisión a incluir en el muestreo (dividiendo el número de veces que la subdivisión correspondiente es seleccionada por el total de alelos incluidos en el análisis). Para estimar cuántas poblaciones deberían muestrearse dentro de cada subdivisión basta con multiplicar esta proporción por la n máxima resultante de aplicar la formulación de HAMRICK & *al.* (1991) [ver el organigrama de la figura 2.3 y la Tabla 3 para indicaciones cuantitativas, y el ejemplo de *Matthiola bolleana* para una aplicación]. En taxones sin subdivisiones donde sí se hayan detectado alelos raros (incluidos en la ruta 3 de la figura 2.3), el análisis de la probabilidad de pérdida es opcional, ya que, como se verá más adelante, las poblaciones que tengan más alelos (sean estos raros o no) estarán siempre entre las seleccionadas para el muestreo intensivo.

¿Qué poblaciones?

Los números resultantes de la aplicación de las formulaciones anteriores no contienen ninguna indicación sobre qué poblaciones debemos muestrear para representar la proporción de variación genética sugerida. Para resolver este aspecto, la teoría básica de la genética de poblaciones indica que es aconsejable considerar tanto el número medio de alelos por locus (A) como el valor de la heterozigosidad esperada (H_e). Aunque en muchos casos existe correlación significativa entre los valores de estos dos parámetros, éstos ofrecen tipos diferentes de información. Mientras A da una indicación grosera de la cantidad de variación genética por población, H_e ofrece una medida indirecta de heterogeneidad genética que está menos afectada por el error de muestreo (NEI, 1987). Además, H_e tiene más sentido para la conservación, ya que su relación con caracteres relacionados con la adaptabilidad es comúnmente aceptada (MITTON & GRANT, 1984; ZOUROS & FOLTZ, 1987) y estadísticamente significativa (BRITTEN, 1996).

Asimismo, resulta conveniente incluir en el criterio de ordenación un parámetro que nos informe sobre la singularidad genética de cada población, esto es, de su diferenciación genética respecto de las demás. A este nivel, es muy informativo el valor de F_{ST} (WRIGHT, 1951). Por la interpretación biológica de este parámetro, valores mayores de F_{ST} indican mayor diferenciación genética. Por lo tanto, la prioridad a este nivel interpoblacional será muestrear las poblaciones que ostenten un mayor valor promedio de F_{ST} respecto a todos los pares de poblaciones incluidas en el análisis. Ordenando las poblaciones de mayor a menor tomando como referencia los valores de A , H_e y F_{ST} podemos obtener un criterio para seleccionar las poblaciones que deben muestrearse (ver figura 2.3 y Tabla 3 para detalles cuantitativos). En caso de varios valores

iguales de A , siempre prevalecerá(n) la(s) población(es) que ostente(n) un mayor valor de H_e y mayor valor promedio de F_{ST} con las otras poblaciones. En caso de taxones con subdivisiones significativas, hay que desarrollar este proceso para cada una de las subdivisiones y, luego, seleccionar las n primeras poblaciones de cada una.

¿Cómo muestrear los individuos?

Incorporar consideraciones espaciales asociadas a la distribución intrapoblacional de la variación genética permite sugerir diseños de recolección que minimicen la probabilidad de incluir en la muestra individuos emparentados. Con frecuencia, la consanguinidad menoscaba la capacidad de supervivencia de las poblaciones naturales, y debemos evitar fomentarla cuando las semillas almacenadas en bancos de germoplasma se utilizan en reintroducciones y reforzamientos poblacionales. Aunque la comprobación de si la consanguinidad da lugar a una depresión por consanguinidad no puede obtenerse a través de marcadores moleculares neutrales, estos sí pueden ofrecernos algunas orientaciones para minimizar la probabilidad de muestrear individuos emparentados.

La autocorrelación espacial (ver SOKAL, [1979]) para sus aplicaciones generales en biología y CAUJAPÉ-CASTELLS & PEDROLA-MONFORT (1997) o TORRES & *al.* (2003) para sus aspectos de genética de poblaciones) es una metodología estadística no paramétrica adecuada para este propósito por dos razones. En primer lugar, uno de los coeficientes de autocorrelación espacial (la “ I de Moran”, que notaremos IM a partir de ahora) puede equipararse al coeficiente de relación genética ρ de WRIGHT (1922). Por lo tanto, la autocorrelación espacial nos proporciona una estimación del grado de parentesco entre los individuos muestreados. Además, cuando se detecta autocorrelación espacial positiva, podemos establecer distancias mínimas de muestreo a partir de las cuales la probabilidad de muestrear individuos emparentados es mínima. Aunque esta aproximación ha sido criticada por su sujeción a cierta variación estocástica y estadística (EPPERSON, 1990), presenta utilidad para la conservación *ex situ* porque provee un valor operativo del tamaño de los vecindarios genéticos intrapoblacionales (esto es, las regiones donde la probabilidad de encontrar individuos emparentados es máxima).

En caso de no detectar autocorrelación espacial, hemos de asumir que la variación genética se distribuye al azar dentro de la población, con lo cual la separación entre los individuos de los que recolectemos semillas puede ser la que consideremos oportuna. En cualquiera de los casos, es adecuado que quede constancia de las distancias de recolección por si en el futuro observáramos anomalías en las eventuales reintroducciones que se realizaran con estas semillas.

Dos consideraciones genéticas sobre el almacenamiento de semillas en bancos de germoplasma

- (1) La práctica normal de los bancos de germoplasma es recolectar semillas en el campo, limpiarlas, secarlas e introducirlas en los recipientes al uso para su conservación a largo plazo en frigoríficos o congeladores, en un ambiente lo menos húmedo posible. Si disponemos de estimaciones del área del vecindario genético estimadas a partir de autocorrelación espacial (área donde se espera una distancia genética menor entre individuos) deberíamos también conservar esa información junto con las semillas. En estos casos,

es adecuado (y no consume mucho tiempo) almacenar las semillas recolectadas en cada vecindario genético dentro de un mismo recipiente, separándolas de las semillas que provengan de otros vecindarios genéticos de la misma población, que deberían ser guardadas en otro recipiente y tratados como otra accesión. La información sobre la situación espacial de las semillas puede ser crucial para minimizar los efectos de la consanguinidad en eventuales reintroducciones o reforzamientos que se lleven a cabo con ellas.

- (2) A menudo sorprende la cantidad de recursos materiales y humanos que se invierten en el rescate de especies (especialmente animales) que ya no tienen apenas variabilidad genética y que están en un callejón evolutivo cuya única salida es la extinción. Ciertamente, la espectacular publicidad que en ocasiones acompaña a estas acciones puede ayudar a concienciar a los niños y a los adultos no especialistas, pero todo este despliegue de medios va en detrimento de otros organismos de interés que aún no están en peligro y que todavía tienen mucha variabilidad genética que conservar. La situación de cambio climático y su previsible rápido impacto en la disminución del rango de distribución de especies actualmente abundantes deberían propiciar una redefinición de los criterios de adjudicación de recursos para que la conservación *ex situ* sea más coherente con las prioridades genéticas enfatizadas por la Convención sobre Diversidad Biológica (GRUPO DE GRAN CANARIA, 2006).

2.3.3 Selección de los individuos a muestrear

Generalmente la recolección aleatoria resulta ser la más correcta. Sin embargo, puede producirse, especialmente en el caso de plantas autóctonas, que las poblaciones naturales desarrollen subpoblaciones o auténticas metapoblaciones. En este caso serán a su vez individualizadas y recolectadas de forma aleatoria para ser tratadas como accesiones por sí mismas.

La recolección aleatoria implica, además, que cada individuo presente en la población tenga la misma probabilidad de ser incluido en el muestreo que todos los demás (MARSHALL & BROWN, 1983). Generalmente los recolectores recogen de modo casual o siguiendo transectos. El punto de partida y la dirección de los transectos en el área objeto de estudio, se deben realizar con atención, con el fin de evitar concentrar el muestreo en un espacio demasiado próximo con individuos en estrecha relación los unos con los otros (MARSHALL & BROWN, 1983). Las distancias y, por lo tanto, los individuos a muestrear están condicionados por la forma biológica de la especie, por lo que no puede ser utilizado un criterio o método único y sí un protocolo propio para cada especie.

2.3.4 Cantidad y tipo de material vegetal por planta

Otro aspecto importante consiste en la definición del método y la cantidad de material a recolectar de cada individuo. La recolección de semillas y de esporas, a diferencia de otro material vegetal, se distingue por su especial dependencia de las condiciones climatológicas. Esta dependencia puede resultar limitante, sobre todo en el caso de taxones todavía poco conocidos, conllevando diversas visitas sobre el terreno antes de proceder a la recolección de frutos y/o semillas o esporas en el momento justo de maduración (MARSHALL & BROWN, 1983). La recolección de otro material vegetal está menos supeditada a la meteorología. La recolección de

bulbos, rizomas y otras partes aéreas puede ser realizada sin rígidas limitaciones temporales sobre el terreno, preferiblemente durante los meses de reposo vegetativo.

La cantidad de germoplasma a muestrear está siempre relacionada con el grado de amenaza, vulnerabilidad o rareza a la que está sujeta la planta. En el caso de la recolección de semillas o esporas, el muestreo debe estar adaptado a la disponibilidad de germoplasma producido por la población en la localidad estudiada. La presión ejercida por la recolección debe calibrarse cada vez y adaptarse a la evolución o involución de la población. Por ello, la recolección ha de atenerse a un protocolo determinado, considerando entre las diversas opciones, la posibilidad de no proceder al muestreo o, por el contrario, de recoger todo el germoplasma disponible.

También la recolección de material vegetal para otros fines, por ejemplo el análisis biológico-molecular, debe ser efectuada en los límites indicados por el protocolo en uso, y ser adecuado para la conservación *in situ* y las actividades de investigación *ex situ*. En la recolección de semillas destinadas a la producción de semilleros, o bien a la conservación *ex situ*, los lotes generalmente no se mantienen separados para cada individuo, con el fin de evitar favorecer la presencia de determinados genotipos (ej. los más productivos, los situados en lugares más accesibles, etc.), siendo recomendable recolectar una cantidad análoga de semillas de cada individuo.

2.3.5 Consideraciones generales durante la recolección

- Como regla general nunca se debe recoger más del 20% de las semillas disponibles el día que se trabaja de campo. Esto asegura que la población no se dañe por recolección excesiva. La única excepción a esta regla se produce en situaciones particulares, como por ejemplo en el caso de la segura e inminente destrucción de la población.
- Para los taxones particularmente raros y/o amenazados, en el caso de que haya disponible material *ex situ*, de primera generación filial (F1) y sin hibridaciones, es posible utilizar dicho material en las pruebas de germinación para individualizar el protocolo más eficaz (germinación y propagación) y conservar todo el germoplasma recogido *in situ*, para multiplicarlo una vez se hayan definido los protocolos.
- Los taxones que hayan sido encontrados en un pequeño ámbito geográfico, se deben muestrear en más puntos, con un incremento en el número de individuos de cada localidad, así como un incremento en el número de propágulos de cada uno de los individuos muestreados. En el caso de taxones muy raros de los que es imposible encontrar un número elevado de individuos, se procederá a la recolección en diferentes épocas, muestreando así más cantidad de germoplasma de cada planta.
- Los taxones que se desarrollan en espectros ecológicos amplios poseen mayor diversidad genética. En estos casos es conveniente, por tanto, incrementar el número de poblaciones o subpoblaciones a muestrear, considerándolas distintas entre ellas.
- Las poblaciones de plantas perennes suelen estar constituidas por individuos de edad diferente y poseen una estructura dependiente precisamente de la edad de la población; en este caso, los individuos deberán ser muestreados al azar, sin tener en consideración ni el tamaño ni la edad, con el fin de maximizar la diversidad genética existente.

- Si las plantas tienen la capacidad de reproducirse vegetativamente, puede resultar útil recoger, además de las semillas, otros órganos vegetativos como bulbos, rizomas y tallos lignificados para efectuar esquejes de las plantas (HEEDE & LECOURT, 1989; HARTMAN & KESTLER, 1983) que permitan su perpetuación, y depurar así estas técnicas de reproducción. Este tipo de regeneración será la más recomendada cuando el taxón se encuentre en grave peligro de extinción, y en tal caso se deberá tener en cuenta que la cantidad de material recolectado no merme en exceso la población y la lleve a un estado de amenaza mayor. Deberá tenerse en cuenta que los momentos de recolección de semillas (madurez) y movilización de reservas con el consiguiente crecimiento vegetativo no coinciden; así pues en ocasiones se debe visitar las poblaciones en repetidas ocasiones a lo largo del año para las diferentes recolecciones de material vegetal, sobre todo con especies amenazadas en las que prima el aprovechamiento al máximo del material recolectado.
- Las plantas con fenología sincrónica pueden ser muestreadas simultáneamente, cuando previamente se haya realizado una precisa planificación del trabajo de campo. Por otro lado, cuando el periodo de floración es muy amplio, no todos los individuos poseerán las semillas en el mismo estado de maduración cuando se realice el muestreo. La variabilidad genética puede estar influenciada por los diferentes factores locales por lo que es importante recoger muestras de plantas que se desarrollen bajo distintas condiciones ambientales y ecológicas.
- Es necesario incrementar la recolección de los taxones que puedan presentar un elevado polimorfismo. Las poblaciones de especies autóгамas pueden presentar subpoblaciones que justifiquen que el muestreo deba ser aleatorio.
- En el caso de que la polinización sea anemófila se debe tener presente que cada planta con varias flores puede ser polinizada con polen de distinta procedencia. Si la polinización es zoófila, la fuente del polen puede ser la misma para varias flores (MARSHALL & BROWN, 1983).
- Se debe prestar especial atención a las poblaciones aisladas o que se encuentren en su límite de distribución ya que puede ser que presenten variantes alélicas raras. En las zonas de contacto entre subespecies se pueden encontrar también mayores variaciones genéticas y morfológicas, resultado de la hibridación y segregación. Se deben considerar los diferentes morfotipos de forma separada, en la medida en que esto sea posible. Las personas que realizan el muestreo, por tanto, deben de prestar especial atención en las zonas donde se puedan producir transiciones entre taxones. Es fundamental que los recolectores indiquen cada posible cambio en la frecuencia y en la extensión geográfica de cada una de los taxones, para formular las hipótesis sobre las posibles causas dichos procesos (VON BOTHMER & SEBERG, 1995).

En resumen, y según lo expuesto en este apartado, se recomienda:

- a) Muestrear, cuando sea posible, no menos de 10 poblaciones de cada área ecológica y geográfica homogénea.
- b) Muestrear, si es factible, aproximadamente el 50% de los individuos de cada población.
- c) Muestrear aleatoriamente, pero teniendo en cuenta las metapoblaciones en el caso en que el hábitat sea heterogéneo.
- d) Muestrear la cantidad de semillas o de material vegetal de cada planta para poder asegurarse el obtener una buena representatividad.
- e) Recorrer de manera aleatoria la superficie a examinar e indicar en la ficha de campo la metodología que se ha empleado (recolección central, en línea diagonal, en los bordes, etc.).
- f) Tener en cuenta los diferentes parámetros ambientales (altitud, exposición, suelo, inclinación, efecto de sombra) para obtener la mayor diversidad posible en la muestra.
- g) Determinar las fases fenológicas en las que se encuentran los individuos, tanto en las visitas preliminares a los lugares de recolección, como en el momento del muestreo, indicándolas en la ficha de campo. Con esta información se podrá realizar un calendario fenológico, para monitorizar las variaciones del ciclo vegetativo año tras año y optimizar de este modo el tiempo en las siguientes campañas de recolección.
- h) Especificar en la ficha de campo los problemas y dudas surgidos durante el muestreo.

Selección de poblaciones de muestreo para la conservación *ex situ* de *Matthiola bolleana* (a partir de SÁNCHEZ & *al.*, 2004, 2006)

Matthiola bolleana (*Brassicaceae*) es un endemismo canario conocido únicamente en las islas de Fuerteventura y Lanzarote. Se trata de una especie no amenazada ni protegida, para la cual se han descrito niveles de variación genética aloenzimática moderado-altos (SÁNCHEZ & *al.*, 2004). Se muestrearon cinco poblaciones representativas de la distribución conocida de este taxón en Fuerteventura y tres en Lanzarote. En ausencia de información filogenética, la distribución geográfica llevó a considerar a las poblaciones distribuidas en cada isla como grupos independientes de partida. Los datos genéticos poblacionales para esta especie refuerzan este criterio, al estimar que las poblaciones de Lanzarote ($G_{ST} = 0.074$) están genéticamente más cohesionadas que las de Fuerteventura ($G_{ST} = 0.234$).

La heterogeneidad genética entre Fuerteventura y Lanzarote se manifiesta también en el hecho de que, cuando consideramos todas las poblaciones indistintamente, el valor de G_{ST} es mucho mayor ($G_{ST} = 0.367$) que el encontrado en cualquiera de las dos islas. Aplicando la fórmula de HAMRICK & *al.* (1991) a estos datos, resultan valores de $n = 3.17 \approx 4$ (Fuerteventura); $n = 1.76 \approx 2$ (Lanzarote) y $n = 4.79 \approx 5$ (*M. bolleana sensu lato*). En este caso, la suma de n para cada una de las islas no coincide con el valor de n obtenido para toda la especie.



Localización espacial de las poblaciones de *Matthiola bolleana* muestreadas en Fuerteventura (izquierda) y Lanzarote (derecha) por SÁNCHEZ & *al.* (2004). Las imágenes muestran a *Matthiola bolleana* en la naturaleza (arriba), y fotografías de la resolución de las enzimas PGM (forfoglucotomasa) y PGI (fosfoglucoisomerasa) (imágenes central e inferior, respectivamente).

Puesto que se detectó un buen número de alelos raros en la especie (ver criterios de rareza estipulados en el apartado 2.3), éstos se utilizaron para decidir qué número de poblaciones debería muestrearse en cada isla. La representación de las probabilidades de pérdida frente a las frecuencias relativas medias de cada alelo indicó que la representatividad de una sola de las poblaciones de *M. bolleana* en términos de alelos raros es de $R = 0.504$, claramente insuficiente para el objetivo de obtener la máxima representatividad genética posible. La aplicación de la formulación de probabilidades de pérdida (ver tabla adjunta) permitió establecer que para 5 de los 17 alelos raros detectados, el área de muestreo preferida sería Lanzarote, y Fuerteventura para los 12 restantes. Es ilustrativo resaltar que los únicos alelos para los que el cálculo de las probabilidades de pérdida parciales fue útil en la selección de la isla de muestreo preferida son *Idh1-d* y *Pgm2-a*, que están presentes en poblaciones de Fuerteventura y Lanzarote. El resto de

alelos son o bien exclusivos de Fuerteventura (12 alelos), o bien de Lanzarote (3 alelos). Notemos que, si no se hubieran detectado alelos raros compartidos, la proporción de poblaciones de cada isla a incluir en el muestreo vendría dada directamente por los cocientes (n° de alelos exclusivos de Fuerteventura/17) y (n° de alelos raros exclusivos a Lanzarote/17).

A partir de estos resultados, siguiendo el organigrama propuesto en el capítulo 2 (Figura 2.3), es fácil calcular que las proporciones de poblaciones de Fuerteventura y Lanzarote en el muestreo final deben de ser 0,7:0,3 respectivamente (12/17 y 5/17). De igual modo, para saber el número de poblaciones que deberían muestrearse en cada área, basta multiplicar estas proporciones por 5, con el resultado de 3,5 poblaciones en Fuerteventura y 1,5 en Lanzarote. Como no es posible muestrear décimas de población, una opción para resolver este problema consiste en examinar las poblaciones que contienen los alelos raros. En el caso de la isla de Lanzarote, muestreando en CAB2 es muy probable capturar todos los alelos raros detectados en la isla. Por lo tanto, a partir de este criterio cualitativo, la decisión final de muestreo sería 1 población en Lanzarote y 4 en Fuerteventura. Otra alternativa sería ajustar por exceso y muestrear 2 poblaciones en Lanzarote y 4 en Fuerteventura.

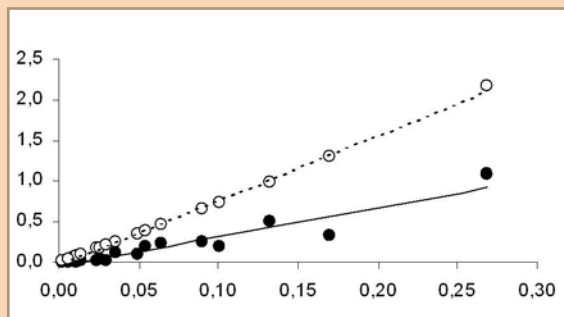
Locus/alelo	Fuerteventura					Lanzarote		
	1	2	3	4	5	6	7	8
MDH1-1A	0,833	0,735	0,775	0,769	0,591	1,000	1,000	1,000
MDH1-1B*	0,000	0,029	0,000	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000
MDH1-1C	0,167	0,235	0,225	0,192	0,409	0,000	0,000	0,000
MDH-2*	0,033	0,067	0,031	0,038	0,050	0,000	0,000	0,000
MDH-2B	0,233	0,100	0,188	0,135	0,250	0,000	0,000	0,000
MDH-2C*	0,000	0,000	0,188	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
MDH-2D	0,733	0,833	0,594	0,827	0,700	0,875	0,917	1,000
MDH-2E*	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,083	0,000
IDH-1A*	0,000	0,000	0,000	0,769	0,591	0,000	0,000	0,000
IDH-1B	0,933	0,941	0,975	0,038	0,000	0,125	0,000	0,038
IDH-1C	0,033	0,059	0,025	0,192	0,409	0,000	0,000	0,000
IDH-1D*	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,688	0,583	0,846
IDH-1E*	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,188	0,417	0,115
PGI-2A	0,800	0,912	0,900	0,846	0,955	1,000	1,000	1,000
PGI-2B	0,200	0,088	0,100	0,154	0,045	0,000	0,000	0,000
GOT-1A	0,000	0,567	0,667	0,280	0,455	1,000	1,000	0,900
GOT-1B*	0,000	0,067	0,111	0,520	0,364	0,000	0,000	0,000
GOT-1C	0,250	0,367	0,167	0,200	0,182	0,000	0,000	0,100

GOT-1D*	0,750	0,000	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
GOT-2 ^a	0,000	0,118	0,100	0,208	0,091	0,000	0,000	0,000
GOT-2B	1,000	0,882	0,900	0,792	0,909	1,000	1,000	1,000
PGM-1A*	0,179	0,214	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
PGM-1B	0,500	0,536	0,000	0,000	0,100	0,143	0,083	0,000
PGM-1C	0,321	0,179	0,500	0,808	0,550	0,643	0,500	0,538
PGM-1D	0,000	0,071	0,500	0,192	0,350	0,214	0,333	0,462
PGM-1E*	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000
PGM-2A*	0,000	0,000	0,025	0,019	0,000	0,000	0,083	0,154
PGM-2B	0,000	0,000	0,625	0,038	0,000	0,563	0,917	0,846
PGM-2C	1,000	1,000	0,350	0,923	1,000	0,438	0,000	0,000
PGM-2D*	0,000	0,000	0,000	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000
PGM-3A*	0,233	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
PGM-3B	0,100	0,500	0,125	0,039	0,050	0,875	0,833	0,923
PGM-3C	0,667	0,500	0,875	0,961	0,900	0,125	0,167	0,077
PGM-3D*	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000
PGD-2A*	0,000	0,000	0,000	0,019	0,050	0,000	0,000	0,000
PGD-2b	1,000	0,882	0,947	0,923	0,800	1,000	1,000	1,000
PGD-2C*	0,000	0,118	0,053	0,058	0,150	0,000	0,000	0,000

Frecuencias alélicas para los 11 loci isoenzimáticos interpretados en las 8 poblaciones del endemismo canario *Matthiola bolleana* (SÁNCHEZ & al., 2006). Los asteriscos marcan los alelos que cumplieron los criterios de rareza expuestos en el texto. Los alelos enmarcados simbolizan los alelos exclusivos de Fuerteventura (en sombreado) y Lanzarote (el resto).

Se ha seleccionado este ejemplo para poner de relieve el hecho de que, si aplicamos el criterio de selección basado en alelos raros, los números de poblaciones a muestrear en cada subdivisión no coinciden necesariamente con los calculados con la fórmula de HAMRICK (1991) para cada subdivisión. Esta fórmula se utiliza solamente para seleccionar el número total de poblaciones a muestrear intensivamente según la metodología expuesta, pero, si hemos detectado suficientes alelos raros, parece justificado incorporar la noción de probabilidad de pérdida para obtener el número concreto de poblaciones a muestrear en cada subdivisión, por las razones mencionadas en el capítulo 2. Según esta aproximación, los valores de n resultantes de la fórmula de Hamrick solamente serían estimadores directos del número de poblaciones a muestrear en cada subdivisión en caso de no hallarse alelos raros en la composición genética de nuestra muestra.

Cuadro 2b



Regresión lineal entre la frecuencia media de los alelos considerados para la probabilidad de pérdida (eje x) y $-\log(L_o)$ [puntos blancos] y $-\log(L_e)$ [puntos negros] (eje y). Para esta representación se han considerado los 17 alelos señalados con asteriscos en la tabla anterior. El valor de representatividad de una sola población fue de $R = 0,504$.

Alelo	<i>Matthiola bolleana s. l.</i>				Fuerteventura				Lanzarote			
	Freq	N	L_o	L_e	freq	N	L_o	L_e	freq	N	L_o	L_e
MDH-1b	0,008	2	0,966	0,873	0,014	2	0,947	0,872	-	-	-	-
MDH-2c	0,023	1	0,954	0,684	0,038	1	0,926	0,682	-	-	-	-
MDH-2e	0,026	2	0,900	0,656	-	-	-	-	0,069	2	0,750	0,649
IDH-1a	0,170	2	0,475	0,051	0,272	2	0,281	0,042	-	-	-	-
IDH-1d	0,269	4	0,082	0,007	0,007	1	0,987	0,935	0,706	3	0,001	0,001
IDH-1e	0,090	3	0,568	0,221	-	-	-	-	0,240	3	0,193	0,193
GOT-1b	0,133	4	0,320	0,103	0,212	4	0,148	0,092	-	-	-	-
GOT-1d	0,101	2	0,654	0,183	0,161	2	0,495	0,173	-	-	-	-
GOT-2a	0,065	4	0,586	0,343	0,103	4	0,418	0,336	-	-	-	-
PGM-1a	0,049	2	0,818	0,447	0,079	2	0,721	0,441	-	-	-	-
PGM-1e	0,010	1	0,979	0,846	-	-	-	-	0,028	1	0,945	0,844
PGM-2a	0,035	4	0,751	0,564	0,009	2	1,000	0,915	0,079	2	0,848	0,610
PGM-2d	0,002	1	0,995	0,962	0,004	1	0,992	0,962	-	-	-	-
PGM-3a	0,029	1	0,943	0,623	0,047	1	0,909	0,620	-	-	-	-
PGM-3d	0,006	1	0,988	0,905	0,010	1	0,980	0,904	-	-	-	-
PGD-2a	0,014	2	0,946	0,801	0,035	2	0,869	0,704	-	-	-	-
PGD-2c	0,054	4	0,641	0,410	0,095	4	0,451	0,370	-	-	-	-

Probabilidades de pérdida observada (L_o) y esperada (L_e) para las ocho poblaciones de *Matthiola bolleana*, y para las cinco poblaciones de Fuerteventura y las tres de Lanzarote consideradas separadamente. Para cada subdivisión poblacional, N representa el número de poblaciones donde el correspondiente alelo fue detectado. Las probabilidades de pérdida permiten decidir en el caso de los alelos IDH1-a y PGM2-a que la región preferida de muestreo es Lanzarote.

A partir de los cálculos realizados, puede realizarse una ordenación descendente de las ocho poblaciones incluidas en el análisis, en función de sus valores de A y He . Las cuatro poblaciones a seleccionar para el muestreo intensivo en Fuerteventura serían TALA, OVEJ, PSBR y CRUZ. Aunque la ordenación para Lanzarote sitúa a CAB2 en segundo lugar, recorde-

mos que se optó por incluirla como única representante de esta isla, por ser la población cuyo muestreo intensivo permitiría la captura de todos los alelos raros detectados en ella. Vemos pues que, como se ha mencionado en el capítulo 2, aunque los criterios cuantitativos explicados son resolutivos en muchas situaciones, en otros casos la decisión final puede depender de circunstancias que los análisis matemáticos no reflejan ni permiten decidir, o de factores que no están relacionados con variables moleculares. Por ejemplo, si alguna de estas ocho poblaciones estuviera distribuida en un hábitat ecológico radicalmente diferente, sería aconsejable muestrearla independientemente de lo que resulte del análisis cuantitativo, porque podría haber desarrollado diferenciaciones genéticas no detectadas con el marcador molecular neutral empleado.

Código	ISLA	A_1	H_e	Ordenación
TALA	F	2,5	0,270	1
OVEJ	F	2,4	0,294	2
PSBR	F	2,3	0,322	3
CRUZ	F	2,3	0,287	4
FAJA	F	2,0	0,249	5
CAB1	L	1,6	0,187	1
CAB2	L	1,6	0,168	2
FAMA	L	1,5	0,128	3

Ordenación de las poblaciones por isla (F: Fuerteventura, L: Lanzarote) de mayor a menor idoneidad para el muestreo intensivo de variabilidad genética según sus valores de A_1 y H_e .

3. Biología reproductiva

El interés por la conservación de los recursos vegetales ha potenciado el desarrollo y la aplicación de diversas técnicas de conservación *in situ*, como la protección de los ecosistemas para conservar la diversidad de genes, especies o procesos ecológicos; y *ex situ*, a través de colecciones dispuestas en jardines botánicos o bancos de germoplasma (MOZA & BHATNAGAR, 2007). Con frecuencia, el material de las colecciones *ex situ* apoya estrategias de conservación *in situ*, con el fin de mantener a largo plazo las poblaciones de plantas en su entorno (GIVEN, 1987; FALK & al., 1996). Sin embargo, parte de ese esfuerzo de conservación puede desaprovecharse si los individuos de las poblaciones naturales o aquellas obtenidas a partir de germoplasma presentan limitaciones reproductivas, por lo que cualquier estrategia de conservación de plantas debería considerar, entre otros aspectos, aquellos relacionados con su biología reproductiva (ver BOSCH & al. 1998; BERNARDELLO & al., 1999, 2004; EVANS & al., 2003; GAUDEUL & TILL-BOTTRAUD, 2004). En este capítulo se exponen algunos de los principales factores a tener en cuenta a la hora de abordar la biología reproductiva de plantas silvestres, revisando los principales tipos de sistemas de reproducción en plantas y algunas técnicas sencillas, rápidas y de bajo coste para su conocimiento. De forma complementaria, en este capítulo se resumen los procesos de dispersión de semillas y las propiedades de los bancos de semillas del suelo.

3.1 Implicaciones de la biología reproductiva en la conservación *ex situ*

La biología reproductiva de las plantas abarca un gran número de elementos relacionados con las características de la reproducción, que van desde el desarrollo de la flor hasta la supervivencia de las plántulas: desarrollo de los gametos, características de la flor, edad de floración, sistema reproductivo, mecanismo de polinización, dispersión de semillas, germinación de las semillas o supervivencia de las plantas, etc. (BARRET, 1998; MOZA & BHATNAGAR, 2007). En los últimos años, las disciplinas que engloba esta materia se han diversificado enormemente (PÉREZ DE PAZ, 2003), por lo que ha aumentado la dificultad de componer toda la información sobre el mecanismo de reproducción de una determinada especie. Sin embargo, el sistema reproductivo es, entre otros, un punto clave de la biología de una especie, que puede estudiarse de manera relativamente sencilla, y que proporciona conocimiento útil para la actividad de un banco de germoplasma, por diversas razones.

En primer lugar, uno de los objetivos de cualquier banco de germoplasma consiste en la conservación de la diversidad genética, la cual está regulada por factores geográficos, ecológicos, históricos, o de la propia vida de la planta, como su estrategia reproductiva (HAMRICK & al., 1979; HAMRICK & GODT, 1996B). La información sobre el sistema reproductivo ayuda a conocer mejor la extensión y distribución de la diversidad genética y, en consecuencia, permite mejorar la planificación de la recolección (ZORO & al., 1998; RAO & HODGKIN, 2002).

En segundo lugar, un banco de germoplasma debe mantener la disponibilidad del material en su colección, pues con frecuencia se distribuye para usos científicos, o pierde progresivamente la viabilidad. En estos casos se requiere de una continua reposición de material fresco que no es posible obtener en las poblaciones naturales (ej., porque han desaparecido). El desarrollo de estrategias de regeneración de semillas, consistente en reemplazar las semillas del banco de germoplasma a partir del cultivo y de la propagación de las semillas de la propia

colección, supone una alternativa a la recolección en poblaciones naturales y en situaciones críticas. Esta actividad ha sido tradicionalmente recomendada en colecciones de germoplasma de plantas cultivadas, si bien su aplicación puede provocar importantes mermas en la variabilidad genética inicial. Entre las diferentes aproximaciones para conocer la implicación de estas estrategias, es necesario elaborar estudios experimentales sobre el sistema reproductivo de la planta (PORCEDDU & JENKINS, 1982; LAWRENCE, 2002), los cuáles pueden ser de especial utilidad en el caso de plantas en peligro de extinción.

Finalmente, la detección de fenómenos que reducen la cantidad y la calidad del material de recolección (ej., limitación de polen y depresión por endogamia) puede abordarse con un estudio del sistema reproductivo que, a su vez, permita el diseño de estrategias de actuación orientadas a paliar los déficit en este sentido (JOHNSON & *al.*, 2004; TAKAGAWA & *al.*, 2006; UESUGI & *al.*, 2007).

3.1.1 El sistema reproductivo

El sistema reproductivo de las plantas comprende las estructuras reproductivas y los procesos que afectan a la fecundidad y a la composición genética de la descendencia de una planta (BARRER & ECKERT, 1990; DAFNI & *al.*, 2005). En términos generales, las plantas pueden reproducirse de forma sexual o asexual, y sólo en el primer caso es posible incorporar variabilidad genética en la descendencia (GRANT, 1989). La reproducción asexual puede ser vegetativa o por agamospermia (producción de semillas sin fecundación previa). En la reproducción sexual se pueden producir semillas por *autogamia*, a partir de la fertilización de los óvulos con polen de la propia flor; *alogamia*, a partir de la fertilización de los óvulos con polen de otra flor de la misma (*geitonogamia*) o de una planta distinta (*xenogamia*); o bien por una mezcla de autogamia y alogamia (RICHARDS, 1997).

Con frecuencia, la alogamia se ve favorecida por fenómenos como la *dioecia* (sexos separados en distintos pies), la *hercogamia* (separación espacial de los órganos masculinos y femeninos), la *dicogamia* (separación temporal en la maduración de los órganos masculinos y femeninos), o el sistema de auto-incompatibilidad (incapacidad de una planta fértil de producir cigotos después de ser polinizada con polen propio) (NETTANCOURT, 1977; LLOYD & WEBB, 1986; WEBB & LLOYD, 1986). En contraste, la ausencia de hercogamia, dicogamia y del sistema de auto-incompatibilidad facilita la autogamia en las plantas de flores hermafroditas (SCHOEN, 1982; GOTTLIEB, 1984; HOLTSFORD & ELLSTRAND, 1989; RUNIONS & GEBER, 2000).

Las diferencias en el sistema reproductivo suelen correlacionarse con otras características reproductivas y ecológicas de las plantas. Así, las plantas autóгамas tienen flores de menor tamaño y producen menor cantidad de polen que las flores de plantas alógamas con las que están emparentadas (RITLAND & RITLAND, 1989; ORTEGA-OLIVENCIA & DEVESA, 1993; SCHOEN & *al.*, 1997; RUNIONS & GEBER, 2000; GÓMEZ, 2002; JÜRGENS & *al.*, 2002; ELLE & CARNEY, 2003; THOMPSON, 2005), mientras que las plantas autóгамas suelen ser colonizadoras de hábitats degradados o propias de los primeros estados sucesionales de la vegetación, siendo las plantas alógamas características de estados sucesionales más tardíos (BAKER, 1955; CRUDEN, 1977).

Para valorar la principal estrategia reproductiva de una planta se puede recurrir a diferentes técnicas, como los marcadores moleculares (OJA, 2005; PASTORINO & GALLO, 2006) o, como se

explica en este capítulo, el cálculo del cociente polen-óvulo (PROTOCOLO 1) y los cruzamientos experimentales (PROTOCOLO 2). Hay que tener en cuenta que el resultado del estudio de una población de una planta no siempre puede aplicarse al conjunto de las poblaciones de la especie (DAFNI & *al.*, 2005), ya que el sistema reproductivo puede variar a lo largo de gradientes geográficos y/o ecológicos, como se ha visto en *Helleborus foetidus* L. (HERRERA & *al.*, 2001), *Buxus balearica* Lam. (LÁZARO & TRAVESET, 2005) o *Cyclamen balearicum* Willk. (AFFRE & *al.*, 1995) y, especialmente, bajo condiciones de estrés (RUNIONS & GEBER, 2000).

3.1.2 Conservación de la diversidad genética

El sistema reproductivo es un factor que afecta significativamente a la extensión y distribución de la diversidad genética y puede proporcionar información sobre la distribución genotípica en las poblaciones. En general, las especies autóгамas, comparadas con las xenógamas, tienen un nivel menor de diversidad genética total, menor variación genética intra-poblacional y mayor diferenciación genética inter-poblacional (HAMRICK & GODT, 1996A). Estas consideraciones son importantes cuando se desarrollan estrategias de recolección del germoplasma enfocadas al mantenimiento de la diversidad genética de recursos vegetales (RAO & HODGKIN, 2002).

Aunque existen numerosos ejemplos de plantas que cumplen las generalidades arriba mencionadas (en *Phlox*, LEVIN, 1978; en *Plectritis*, LAYTON & GANDERS, 1984; en *Zeuxine* y *Eulophia*, SUN & WONG, 2001), se conocen algunas excepciones. Por ejemplo, hay casos de especies autóгамas y xenógamas con niveles similares de variación genética intra-poblacional e inter-poblacional (en *Limnanthes*, ARROYO & KALIN, 1975), autóгамas con mayor diversidad genética total que sus xenógamas relacionadas (en *Triticum*, HILLEL & *al.*, 1973) o xenógamas con gran variación inter-poblacional (en *Gliricida*, CHALMERS & *al.*, 1992). Esta aparente contradicción se explica porque hay además otros factores ecológicos, geográficos o históricos que afectan a la diversidad genética (HAMRICK & GODT, 1996B) y pone de manifiesto que la información del sistema reproductivo es complementaria a la de los análisis genéticos que evalúan la diversidad genética.

3.1.3 Desarrollo de estrategias de regeneración de semillas

Uno de los desafíos de las estrategias de regeneración de semillas consiste en que el nuevo lote de semillas que reemplaza al anterior mantenga la integridad genética. Si bien los bancos de germoplasma deberían minimizar siempre las actividades de regeneración, en ocasiones ésta se hace necesaria. En ese caso, se planean métodos adecuados para cultivar y propagar las semillas, que difieren en función del sistema reproductivo de la planta (LAWRENCE, 2002). La integridad de las muestras de las especies autóгамas se puede preservar mediante el cultivo y reproducción de una sola semilla. De esta manera cada individuo de la generación de partida queda representado en la generación siguiente. En contraste, este método no es aplicable a especies xenógamas, ya que cada planta es diferente de las plantas de la siguiente generación. En estas plantas, controlar experimentalmente la contribución reproductiva de cada parental a la siguiente generación es fundamental para evitar la pérdida de diversidad genética (PORCEDDU & JENKINS, 1982; SCHOEN & BROWN, 2001).

3.1.4 Fenómenos que afectan a la cantidad y calidad del material de recolección

Limitación de polen

Para las plantas xenógamas de polinización entomófila, el tamaño poblacional y la densidad de plantas está estrechamente relacionado con la atracción y la actividad de los polinizadores (MOELLER & GEBER, 2005). Dado que las poblaciones pequeñas pueden ser menos atractivas para los polinizadores, la reducción del tamaño poblacional resulta en un descenso de la producción de frutos y semillas debido a una insuficiente transferencia de polen (LAMONT & *al.*, 1993). En esta situación, algunas estrategias de conservación proponen la realización de polinizaciones cruzadas manuales para elevar la producción de semillas en las poblaciones naturales (en *Argyroxiphium sandwicense* DC., WALKER & POWELL, 1999; en *Oxyanthus pyriformis* (Hochst.) Skeels, JOHNSON & *al.*, 2004).

En algunas especies predominantemente xenógamas se produce un incremento en la incidencia de la autogamia ante la escasez y la baja disponibilidad de polinizadores, como en *Blandfordia grandiflora* R.Br. (RAMSEY & VAUGHTON, 1996) o *Fuchsia magellanica* Lam. (TRAVERSE & *al.*, 1998). Existen plantas en las que la autogamia puede llegar a ser el principal modo de reproducción en las poblaciones donde falta el polinizador habitual de la especie, mientras que la xenogamia es el mecanismo mayoritario en aquellas poblaciones donde sí aparece, como en *Medicago citrina* (Font Quer) Greuter (PÉREZ-BAÑÓN & *al.*, 2003).

Depresión por endogamia

A diferencia de la xenogamia, la reproducción por autogamia no genera varianza genética y aumenta la homocigosis en la descendencia, incrementando la probabilidad de que se expresen mutaciones deletéreas recesivas o parcialmente recesivas (CHARLESWORTH & CHARLESWORTH, 1987). Este fenómeno se conoce como depresión por endogamia y puede provocar efectos negativos en diversas fases del ciclo reproductivo como la producción y calidad de las semillas o el crecimiento y supervivencia de las plántulas (DUDASH & FENSTER, 2001; SEVERNS, 2003). Hay muchos ejemplos de plantas afectadas de depresión por endogamia, como *Swertia perennis* L. (LIENERT & FISCHER, 2004), *Chamaecrista keyensis* Pennell (LIU & KOPTUR, 2003) o *Platanthera leucophaea* (Nuttall) Lindley (BOWLES & *al.*, 2002), en las que se presenta una reducción de la producción y germinación de semillas obtenidas por autogamia con respecto a las producidas por xenogamia.

Como solución para evitar la reducción del desarrollo de las plantas en poblaciones que manifiestan depresión por endogamia, en ocasiones se ha propuesto la introducción de variabilidad genética en la población, a través de la incorporación de polen o semillas de plantas de una población diferente (MADSEN & *al.*, 1999; TALLMON & *al.*, 2004). Sin embargo, esta estrategia modifica la estructura genética original de la población y puede generar fenómenos de depresión por alogamia (la descendencia originada por cruces entre plantas distantes presenta menor desarrollo que la proveniente de cruces entre plantas próximas) (HEDRICK & KALINOSWKI, 2000; TAKAGAWA & *al.*, 2006).

La depresión por endogamia puede estimarse con información genética obtenida con marcadores moleculares (ECKERT & BARRETT, 1994), o como se expone en este capítulo, a partir de datos procedentes de cruzamientos experimentales (PROTOCOLO 2 y PROTOCOLO 4).

3.1.5 Protocolos para la valoración de la estrategia reproductiva

PROTOCOLO 1: Cociente polen-óvulo (P/O)

El P/O es un parámetro que estima el tipo de sistema reproductivo de un taxón (CRUDEN, 1976, 1977), mediante la relación entre la producción de polen y la de óvulos por flor. Este valor refleja la eficiencia de la flor en la transferencia de polen y es más bajo cuanto más eficaz es ésta. Los valores más bajos de P/O corresponden a plantas de flores *cleistógamas* (flores que no se abren e inevitablemente son autógamas), mientras que a las xenógamas se les atribuyen los valores de P/O más altos (Tabla 4). A pesar de que el P/O predice con cierta fiabilidad el sistema reproductivo de cada especie es conveniente estudiar en profundidad cada caso, pues se conocen situaciones en las que el tipo de sistema reproductivo estimado con el P/O no se corresponde con el real de la planta (TALAVERA *et al.*, 1993; AFFRE *et THOMPSON*, 1999; JÜRGENS *et al.*, 2002).

Para el cálculo del P/O se seleccionan entre 10-20 flores de plantas distintas de cada población. El número de granos de polen se puede obtener de manera automática, con un aparato contador de partículas (ver DAFNI *et al.*, 2005) o de forma manual. En este último caso, se debe introducir una antera aún no abierta en un tubo *ependorf*, y después depositar un volumen conocido de agua con una gota de jabón, para evitar la adhesión de los granos de polen a las paredes del tubo. La antera se abre y se vacía de polen con unas pinzas, y la solución resultante se mezcla en un vórtex. Se extrae un mínimo de tres submuestras de la solución, se colocan sobre un portaobjetos y se cuentan todos los granos de polen de cada submuestra bajo un microscopio óptico. La producción de polen por antera se obtiene multiplicando la media del recuento de polen de las submuestras por el factor de dilución. El número de granos de polen por antera se multiplica por el número de anteras para obtener la producción de polen por flor. Para el cálculo del número de óvulos se disecciona el ovario bajo el microscopio estereoscópico y se cuentan todos los óvulos. El P/O de cada flor se calcula dividiendo el valor de la producción de polen por el número de óvulos, y finalmente se obtiene un valor medio de P/O a partir de todas las muestras.

Sistema de cruzamiento	P/O
Cleistogamia	4,7 ± 0,7
Autogamia obligada	27,7 ± 3,1
Autogamia facultativa	168,5 ± 22,1
Xenogamia facultativa	796,6 ± 87,7
Xenogamia	5859,2 ± 936,5

Tabla 4. Tipos de sistemas de cruzamiento con los valores medios de P/O según CRUDEN (1977).

PROTOCOLO 2: Cruzamientos experimentales

Este ensayo, que permite evaluar el sistema reproductivo de una especie, requiere seleccionar un mínimo de 10 plantas de cada población, sobre las que se realizan los siguientes ensayos de polinización (Tabla 5): (1) agamospermia (las flores se emasculan y embolsan sin polinizar), para evaluar la capacidad de reproducción asexual; (2) auto-polinización autónoma (las flores se embolsan sin polinizar) para evaluar la capacidad de producción de frutos y semillas sin que medien agentes externos; (3) auto-polinización (las flores se embolsan y polinizan con su propio polen) para la determinación de auto-incompatibilidad; (4) geitono-polinización (las flores se emasculan, embolsan y polinizan con polen procedente de otra flor de la misma planta) para la determinación de auto-incompatibilidad; (5) polinización (las flores se emasculan, embolsan y polinizan manualmente con polen procedente de otra planta) para evaluar la capacidad de producción de frutos y semillas cuando median agentes externos; (6) control (las flores se marcan y dejan libres para la polinización natural) para evaluar la capacidad de producción de frutos y semillas bajo condiciones naturales (ver figura 3.1).

A continuación se indican algunas consideraciones necesarias para el desarrollo de los ensayos de polinización, basadas en DAFNI (1992): (1) la emasculación se realiza antes de la apertura de las anteras con unas pinzas finas, para evitar la contaminación de polen en el estigma; (2) las bolsas evitan la polinización de la flor por medio de agentes externos, y se colocan siempre antes de la apertura de la flor, se retiran para polinizar si lo requiere el tratamiento, se vuelven a colocar y no se retiran hasta la marchitez de la flor; (3) el embolsamiento se realiza con bolsas de malla que eviten cualquier efecto lateral (ej., la entrada de polinizadores, reducción de la luz, aumento de humedad y temperatura, infestación con hongos o insectos o interferencias en la antesis floral); (4) las polinizaciones deben realizarse con polen viable (ver apartado 4.4.4) y en el momento en el que el estigma es receptivo (PROTOCOLO 3); (5) en plantas que producen una cantidad suficiente de flores, las polinizaciones artificiales y el control deben hacerse sobre la misma planta para minimizar los efectos de la variabilidad intraespecífica; (6) sólo se debe utilizar una fracción pequeña (cerca del 20% o menos) del número total de flores de cada inflorescencia o planta para prevenir el aborto de los óvulos previamente fertilizados por falta de disponibilidad de recursos.

Finalmente, el sistema reproductivo de la planta se evalúa en relación con el éxito reproductivo obtenido en cada ensayo de polinización, en función de la cantidad y calidad de los frutos y semillas producidos. Para ello, para cada tratamiento se calcula un porcentaje de fructificación y de fecundación, y se pesan las semillas obtenidas. El porcentaje de fructificación resulta de dividir el número de frutos producidos por el número total de flores tratadas; y el porcentaje de fecundación dividiendo el número de semillas producidas en el número total de óvulos contenidos en las flores tratadas.

El tipo de sistema reproductivo puede describirse a través del cálculo del índice de auto-polinización automática (IAS) y del índice de auto-incompatibilidad (ISI). El IAS se obtiene dividiendo el porcentaje de fructificación y/o fecundación de la auto-polinización autónoma por el porcentaje de fructificación y/o fecundación xenógama, respectivamente. El ISI se obtiene como el cociente entre el porcentaje de fructificación y/o fecundación de la auto-polinización y el porcentaje de fructificación y/o fecundación xenógama, respectivamente. Los valores del



Foto I. Marques & D. D. Draper

Figura 3.1 - Cruzamientos experimentales en *Narcissus cavanillesii* A. Barra & G. López.

IAS y del ISI por encima de 0.2 indican capacidad de auto-polinización autónoma y auto-compatibilidad, respectivamente (RUIZ-ZAPATA & ARROYO, 1978; JAIMES & RAMIREZ, 1999).

Ensayo de polinización	Emasculación	Embolsamiento	Pol. manual	Procedencia polen
Agamospermia	+	+	-	-
Auto-polinización autónoma	-	+	-	Misma flor (espontánea)
Auto-polinización	-	+	+	Misma flor (activamente)
Geitonogamia	+	+	+	Otra flor de la misma planta
Xenogamia	+	+	+	Otra planta
Control	-	-	-	Diverso

Tabla 5. Características metodológicas de los ensayos de polinización, basado en BOSCH (1999).

PROTOCOLO 3: Receptividad estigmática

El éxito del ensayo de los cruzamientos experimentales dependerá, en parte, de que las polinizaciones se realicen sobre un estigma receptivo, es decir, capaz de promover la germinación de los granos de polen, y que se caracteriza por presentar una alta actividad enzimática (DAFNI & MAUES, 1998). Este último hecho ha servido como base para el desarrollo de diversos ensayos que determinan la receptividad del estigma a partir de la identificación de la actividad de determinados enzimas como las peroxidases, estrasas, oxidadas o fosfatasas (KNOX & *al.*, 1986; DAFNI, 1992; KEARNS & INOUE, 1993).

Una técnica sencilla para estimar si el estigma es receptivo consiste en colocar el pistilo previamente separado de una flor en la depresión de un portaobjetos excavado, para después cubrirlo con una solución de 1% de benzidina (debe manipularse con precaución por ser cancerígena) en 60% etanol, peróxido de hidrógeno y agua. El estigma receptivo presenta peroxi-

dasas que rompen el peróxido de hidrógeno y desencadenan la oxidación de la benzidina que adquiere un color azul. De manera más sencilla, se puede sumergir el pistilo en una solución de peróxido de hidrógeno (3%), y observar si se producen burbujas en el estigma, provocadas por la actividad de las peroxidases, lo que indica que el estigma es receptivo. Según DAFNI *et al.* (2005), cuando se realiza este ensayo se debe: (1) utilizar estigmas no polinizados (pueden dar falsos resultados), por lo que hay que embolsar las flores antes de la antesis; (2) usar flores de diferentes plantas y en distintos estados de desarrollo, pues la receptividad del estigma puede variar con la edad de la flor; (3) utilizar estigmas no dañados (pueden dar falsos resultados); (4) trabajar con una temperatura entre 25-35° C.

Adicionalmente a los métodos de identificación de actividad enzimática (ver más métodos en DAFNI *et al.*, 2005), la receptividad del estigma puede evaluarse con otras técnicas basadas en la detección de cambios morfológicos del estigma, germinación de los granos de polen o producción de semillas después de la polinización del estigma (ver DAFNI 1992; DAFNI *et al.*, 2005).

PROTOCOLO 4: Depresión por endogamia

El nivel de depresión por endogamia se estima a partir de los resultados del ensayo de los cruzamientos experimentales comentados en el PROTOCOLO 2 (porcentaje de fructificación, porcentaje de fecundación y del peso de las semillas), aunque se pueden usar otros componentes del desarrollo de la planta, como la germinación de las semillas. El coeficiente de depresión por endogamia (δ) se calcula mediante la fórmula:

$$\delta = 1 - (w_s/w_o)$$

donde w_s es el desarrollo de la progenie autógena obtenida por auto-polinización (o geitono-polinización) y w_o es el desarrollo de la progenie xenógama obtenida por polinización (SCHEMSKE *et al.* LANDE, 1985; CHARLESWORTH *et al.* CHARLESWORTH, 1987). El valor del coeficiente de depresión por endogamia normalmente oscila de cero a uno. El valor cero indica que no hay depresión por endogamia, un valor negativo indica que el desarrollo de la progenie autógena es mayor que el de la xenógama, mientras que un valor positivo indica lo opuesto.

Es posible calcular un valor acumulativo de δ que consiste en restar a uno el producto del cociente del valor de desarrollo de la progenie autógena entre el de la xenógama para: (a) el porcentaje de fructificación, (b) el porcentaje de fecundación, (c) el peso de la semilla, o (d) cualquier otro componente del desarrollo de la planta (NAVARRO *et al.* GUITIÁN, 2002), según la fórmula:

$$\delta = 1 - [(w_{sa}/w_{oa}) \times (w_{sb}/w_{ob}) \times (w_{sc}/w_{oc}) \times (w_{sd}/w_{od})]$$

Hay que tener en cuenta algunos aspectos cuando se evalúa la depresión por endogamia: (1) el nivel de depresión por endogamia puede variar en función de las condiciones en las que se encuentra la planta, por ejemplo, las plantas cultivadas en invernadero pueden mostrar un nivel inferior al que exhibirían en condiciones naturales (CHARLESWORTH *et al.* CHARLESWORTH, 1987; DUDASH, 1990); (2) las especies autógenas suelen expresar la depresión por endogamia tarde en el ciclo de vida, mientras que en las xenógamas la expresión de la depresión por endogamia se produce a lo largo de todo el ciclo de vida (HUSBAND *et al.* SCHEMSKE, 1996).

3.2 Los procesos de dispersión

El resultado último de las diferentes estrategias de reproducción existentes en las plantas se basa en la formación de nuevos individuos, con el propósito de perpetuar la especie, y ofrecer sistemas de adaptación al medio basados en la variabilidad genética. Todo ello no sería posible sin la ayuda de sistemas de propagación del material germinativo, a través de procesos de dispersión muy variados. Debido a que las características del germoplasma (principalmente semillas y frutos de plantas vasculares) están directamente relacionadas con los mecanismos de dispersión propias de cada especie, la comprensión de estos aspectos resulta de especial interés cuando se elaboran estrategias de conservación de plantas, ya sean éstas *in situ* o *ex situ*.

3.2.1 Influencia del vector y la forma

Sobre la base de la estructura externa de semillas y frutos, WERKER (1997) sintetizó las principales estrategias de dispersión activa y pasiva, que se describen a continuación.

Anemocoria

Dispersión determinada por el viento y característica de semillas ligeras, a menudo dotadas de apéndices que aumentan su superficie (figura 3.2). Típica de numerosas familias y en particular de *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Orchidaceae*, *Poaceae* y *Scrophulariaceae*.

Los apéndices pueden ser de naturaleza diversa:

- Pelos cubridores de la totalidad o parte de la superficie de la semilla (p.ej. *Platanus*, *Nerium oleander*, etc.)
- Pelos simples o plumosos formando un mechón o una corona de pelos denominado *vilano* (ej. *Taraxacum*, *Crepis*, *Sonchus*, *Hieracium*)
- Cola plumosa (ej. *Clematis*, *Anemone*, etc.)
- Alas (p.ej. *Bignonia*, *Tilia*, *Fraxinus*, *Acer*, etc.)

Hidrocoria

Muchas semillas y frutos de especies acuáticas flotan sobre el agua, siendo desplazadas por la corriente (ej. *Posidonia*, *Nuphar*, etc.); otras pertenecientes a especies no acuáticas (ej. *Anchusa formosa* Selvi, Bigazzi & Bacch., *Pancratium maritimum* L.) pueden ser transportadas por las precipitaciones, por cursos de agua o por mareas, dispersándose a distancias considerables.

Autocoria

La autocoria es un tipo de dispersión por la cual la diáspora está originada por la propia planta. El método pasivo de dispersión por el cual los frutos o las semillas caen en las proximidades de la planta madre por gravedad, siendo arrastradas hacia abajo se denomina *barocoria*. Las semillas así dispersadas pueden, en un segundo tiempo, ser comidas por animales que aseguran de este modo su dispersión (*diplocoria*). Por otro lado, las especies *geocoras* no dispersan sus semillas, sino que entierran sus frutos, asegurando así su conservación en el lugar (ej. *Morisia monanthos* (Viv.) Ascherson, *Arachis hypogaea* L., *Trifolium subterraneum* L.). La maduración de algunos frutos secos viene acompañada de un “lanzamiento” de sus semillas (*balistocoria*)



foto: B. Jiménez-Alfaro



foto: A. Bueno



foto: E. Mattana

Figura 3.2 – Adaptaciones para la dispersión de semillas por (a) anemocoria (cipselas con vilano de *Aster pyrenaeus* Desf ex DC.), (b) hidrocoria (fruto flotante de *Nuphar luteum* (L.) Sm. subsp. *pumilum* (Timm) Bonnier & Layens), (c) autocoria (*Hura crepitans* L.) y (d) zoocoria (myrmecoria, *Polygala sarda* Chodat).

(ej. *Cytisus scoparius* (L.) Link., *Acanthus mollis* L., *Cardamine*, *Geranium*, etc.). En *Hura crepitans* L., el fruto explota en 18 piezas con tal violencia que las semillas, de 1 cm de grosor, son proyectadas a 25 metros. En *Mercurialis annua* L., las semillas son también proyectadas a una distancia media de 15 cm (LISCI & PACINI, 1997). El poder de diseminación de semillas a través de este mecanismo es mucho más limitado respecto al producido por la dispersión a través del viento, el agua o los animales.

Zoocoria

La zoocoria es la dispersión producida por animales, jugando éstos un papel activo (principalmente a través de la *endozoocoria*) o un papel pasivo (*epizoocoria*).

En el caso de la *endozoocoria*, las semillas están siempre contenidas en el interior de frutos o pseudofrutos carnosos, consumidos por animales frugívoros (ej. *Ficus carica* L., *Fragaria vesca* L., *Pyrus*, *Malus*, *Phoenix*, etc.). Después de ser expulsadas con las heces, las semillas germinan

fácilmente, una vez que sus tegumentos han sido atacados por los ácidos gástricos en el tránsito por el aparato digestivo del animal.

La *epizoocoria* actúa en aquellas semillas provistas de un sistema de enganche macro o microscópico, mediante setas, pelos o uncínulos que permiten fijarse a los pelos o a las plumas del animal (ej. *Xanthium strumarium* L., *Agrostemma githago* L., etc.). Por otro lado, y de un modo más sencillo, los animales transportan las semillas a través de la tierra pegada a sus patas o a su cuerpo.

Las hormigas merecen un tratamiento aparte, no actuando ni por *endozocoria* ni por *epizoocoria* propiamente dicha. Estos himenópteros transportan, entre sus mandíbulas, un gran número de semillas, en particular aquellas provistas de apéndices ricos en aceites, de los cuales se nutren (ej. *Euphorbia*). Este tipo de dispersión se denomina *mirmecocoria*.

3.2.2 Eleosomas y dispersión de semillas en las plantas mediterráneas

Estructura del eleosoma

En las semillas de algunos frutos secos se encuentra un apéndice, no involucrado en la germinación, cuya función principal es la de atraer a los animales dispersadores, normalmente hormigas, y más raramente aves (LISCI & al., 1996). Este apéndice fue llamado *eleosoma* por SERNARDER (1906) por su contenido en lípidos, y en algunos casos se ha identificado como carúncula, estrofiolo, etc. No obstante, independientemente del nombre y su origen anatómico, su función es principalmente ecológica, facilitando la dispersión de las semillas mediante hormigas, las cuales encuentran en el eleosoma una recompensa comestible (LISCI & al., 1996).

Los eleosomas son protuberancias que se encuentran en el extremo de la semilla, siempre de colores claros, que contrastan con el resto de la semilla, normalmente de color oscuro, marrón o negro. Están constituidos por células muertas cuyo citoplasma acumula reservas lipídicas. Los eleosomas son delicados y fácilmente extraíbles por las hormigas u otros animales. Las reservas que contienen consisten generalmente en lípidos, si bien en algunos casos también proteínas, como en el caso de *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Cytisus scoparius*, *Euphorbia cyparissias* L., *Centaurea parlatoris* Heldr.; o también almidón, como en *Euphorbia lathyris* L., *Lamium purpureum* L., o *Tussilago farfara* L. En *Centaurea jacea* L., las recompensas para los dispersadores consisten tan solo en proteínas, por lo que estas estructuras no se denominarían propiamente eleosomas (LISCI & al., 1996; VIEGI & al., 2003).

Al medir el contenido calórico de la semilla entera y del eleosoma, se ha comprobado que este último contiene siempre cerca de un tercio de la energía total de la semilla, independientemente del grupo sistemático estudiado (LISCI & al., 1996). Entre los frutos secos con eleosoma en el ámbito mediterráneo destacan los géneros *Euphorbia*, *Viola*, *Chelidonium*, *Corydalis*, *Melampyrum*, *Trillium* o *Vulpia* (BEATTIE & LYONS, 1975; ARONNE & WILCOCK, 1994; LISCI & al., 1996). También se encuentran eleosomas en los aquenios de algunas *Asteraceae*, como *Sylibum marianum* (L.) Gaertn., en algunas especies del género *Centaurea*, y también en las semillas de algunos frutos carnosos (ej. *Rhamnus alaternus* L.).

Funciones del eleosoma

Independientemente de la dispersión, que es su función primaria, los eleosomas pueden indirectamente estar implicados en una o más de las siguientes funciones:

- Permiten evitar la depredación de otros animales, ya que las hormigas hacen desaparecer las semillas del suelo apenas son dispersadas por la planta madre.
- Las semillas depositadas por las hormigas en el nido son protegidas del fuego y de las altas temperaturas.
- Sirven para evitar la competencia intraespecífica, al ser las semillas alejadas de la planta que las ha producido.
- Las paredes de las células de los eleosomas pueden ser espesas, conteniendo pectinas, esto es, moléculas que consiguen absorber y retener el agua que servirá durante el inicio del proceso de la germinación (BIANCHINI & PACINI, 1996).
- Gracias a estas paredes espesas los eleosomas pueden estar involucrados en la deshidratación de las semillas que precede a la dispersión, así como en la rehidratación que precede a la germinación (LISCI & *al.*, 1996; BIANCHINI & PACINI, 1996).
- Determinan la dormición de la semilla, como sucede en *Mercurialis annua* L., *Euphorbia cyparissias* y *Calendula arvensis* L., donde la semilla germina solo cuando el eleosoma es extraído de manera natural o experimental (PACINI, 1990; LISCI & *al.*, 1996).

Eleosoma y diplocoria

Las semillas con eleosoma son a menudo también *diplocoras*, presentando una dispersión que tiene lugar en dos tiempos. ARONNE & WILCOCK (1994) han puesto en evidencia que en *Rhamnus alaternus* L. los frutos carnosos son en primer lugar dispersados por los pájaros, mientras que, después de la defecación, y gracias a los eleosomas (que no han sido dañados durante el trayecto por el aparato digestivo), son dispersados por las hormigas. PACINI (1990) y LISCI & PACINI (1997) indican que en *Mercurialis annua* las semillas son antes lanzadas al aire gracias a un mecanismo de catapulta presente en las paredes del fruto, a distancias de hasta 130 cm, para luego ser recolectadas por las hormigas, alejándolas generalmente a distancias de seis metros, raramente más (LISCI & PACINI, 1997).

VIEGI & *al.* (2003) muestran en cambio que, en el género *Centaurea*, los aquenios pueden o no presentar eleosomas y vilanos, según las especies. Cuando el vilano y el eleosoma están presentes, los pelos del vilano, en función de la especie, pueden tener diferente longitud, permitiendo una dispersión a diferentes distancias. En cualquier caso, la dispersión mediante el viento precede siempre a la producida por las hormigas. En las especies donde existe tan solo eleosoma o vilano se tiene un solo tipo de dispersión. Los mismos autores indican que la presencia-ausencia de los eleosomas no sigue la sistemática del género, rebatiendo que estas estructuras, más que sistemático o evolutivo, tienen un significado ecológico para la especie. Las distancias a las cuales las hormigas pueden dispersar las semillas dependen de la especie: tratándose de himenópteros sociales, existen diferentes tipos y niveles de sociabilidad. Existen hormigas pertenecientes a especies con un bajo nivel de organización que se alimentan del eleosoma apenas encuentran la semilla, alejándolo poco del lugar donde ha sido recogido. Existen otras hormigas, con un nivel superior de sociabilidad, que llevan la semilla al nido, el eleosoma

es extraído y la semilla llevada fuera del nido, hacia la zona de desechos. Por último, resulta interesante el caso de *Messor structor*, una hormiga mediterránea que vive en ambientes antropizados y que, una vez llevadas las semillas al nido, extrae el eleosoma y deposita las semillas en celdas separadas, según la especie. Existe la hipótesis de que este mecanismo de “conservación sistemática” sirve para consumir el interior de la semilla, lleno de reservas, en el momento en que se emblandece el tegumento duro, mediante la acción de bacterias y hongos (PACINI, 1990). La mayor parte de las semillas consiguen escapar de este “secuestro” gracias a las prácticas agrícolas de arado que tienen lugar en los ambientes en que este proceso tiene lugar.

Concluyendo, cabe destacar que las semillas con eleosoma son todas ortodoxas (BASKIN & BASKIN, 1998), esto es, dispersadas con un bajo contenido de agua y con un metabolismo ralentizado (ver capítulo 6). Por la propiedad de los eleosomas de asegurar la dispersión en tiempos variables, y a veces largos, su presencia no es compatible con las semillas recalcitrantes, de difícil conservación.

3.3 El estudio de los bancos de semillas del suelo

Ecólogos y botánicos coinciden en el importante papel que los bancos de semillas del suelo juegan en el mantenimiento de la biodiversidad ecológica (a nivel de especie) y genética en las poblaciones y en las comunidades vegetales (GROSS, 1990). El estudio del banco de semillas del suelo, que pone en evidencia la capacidad de las plantas de crear depósitos de semillas viables enterrados, ayuda a definir mejor la autoecología de la especie, a estimar la capacidad de compactación de las comunidades, a profundizar en el estudio de las dinámicas de la vegetación y a obtener información básica para la programación de actividades de gestión (CERABOLINI *et al.*, 2003).

La formación de bancos de semillas en el suelo es una estrategia de las plantas que viven en ambientes sujetos a perturbaciones, sean de origen natural o antrópico. Los suelos de estos ambientes contienen generalmente más semillas de especies anuales que perennes, más semillas de plantas herbáceas de hoja ancha (anuales y perennes) que de gramíneas, y muchas semillas de leguminosas y plantas especializadas en la colonización de lugares alterados (MILLER, 2000). En función del periodo de persistencia de las semillas en el suelo, pueden definirse dos tipos principales:

- Bancos transitorios: las semillas permanecen viables en el terreno cerca de un año.
- Bancos persistentes (o duraderos): las semillas permanecen viables durante largo tiempo.

Son estos últimos los que mayormente contribuyen a la regeneración de fitocenosis destruidas o degradadas (THOMPSON, 1993). Muchas especies australianas o sudafricanas, adaptadas al fuego, además de algunas coníferas mediterráneas, forman bancos aéreos de semillas en los frutos leñosos que se abren después de los incendios (frutos *serotinos*). La tipología de plantas que forman bancos de semillas en áreas norteamericanas habitualmente sometidas a incendios se ilustran en la Tabla 6.

Grupos de plantas	Bancos transitorios	Bancos persistentes		
		en el terreno	en la copa (frutos)	la germinación es estimulada por el fuego
Coníferas (árboles)	•		•	
Latifolios perennes (árboles)	•			
Caducifolios (árboles)	•			
Arbustos	•	•		•
Herbáceas de hoja ancha de dimensiones medio-grandes (anuales)	•	•		•
Herbáceas de hoja ancha de dimensiones medio-grandes (perennes)	•	•		•
Gramíneas	•			

Tabla 6. Tipología de bancos de semillas del suelo (MILLER, 2000).

El procedimiento para el estudio de los bancos de semillas consiste en tomar muestras de suelo, introducirlas en sacos de plástico y registrar la información útil para el reconocimiento de las semillas presentes. Posteriormente, en el laboratorio se procede al reconocimiento metódico de las semillas contenidas en la muestra. El estudio puede ser realizado extrayendo manualmente o con la ayuda de instrumentos mecánicos las semillas del terreno, reconociéndolas y contándolas, o bien disponiendo las muestras de suelo en ambientes controlados y favoreciendo la germinación de las semillas contenidas en ellas. El método de la germinación prevé que la muestra, previamente dispuesta en un ambiente controlado, sea distribuida (espesor de 1 cm) en bandejas de vidrio, después de haber desechado los restos vegetales (ej. ramas, hojas, etc.), los pequeños organismos y las pequeñas piedras presentes (ROBERTS, 1981). Se procede después al riego de las muestras, realizando un seguimiento de las plántulas que van apareciendo. De manera alternativa, las muestras pueden disponerse también en salas de germinación: esta opción permite la germinación de semillas durmientes solo en el caso en que sea bien conocido el protocolo de germinación de la unidad taxonómica a estudio.

La dificultad de aplicación de algunas metodologías han llevado a la definición de un método más rápido y expeditivo, que permite predecir la persistencia de las semillas en el suelo a través de la información morfométrica de la semilla, en este caso teniendo en cuenta su forma y dimensiones (THOMPSON *et al.*, 1993). El método se fundamenta en la observación de que las semillas persistentes generalmente son pequeñas y de formas regulares, mientras que las no persistentes son gruesas, aplanadas o alargadas. Las dimensiones y la forma son, de hecho, los parámetros que influyen en la capacidad de enterramiento de la semilla en el terreno. Se ha demostrado que las semillas sepultadas tienen tasas de depredación más bajas respecto a aquellas que permanecen en la superficie del terreno (HULME, 1994) y que la depredación se considera el factor principal que determina el tiempo de permanencia de la semilla en el suelo (HULME, 1998).

Sólo recientemente se ha empezado a considerar el estudio de los bancos de semillas del suelo en el análisis demográfico de las poblaciones; esto es debido probablemente a que los datos que provienen de los bancos del suelo (semillas viables y tasas de germinación) a menudo son difícilmente confrontables con los datos relativos a las plántulas y a las plantas adultas. Las características de los bancos de semillas del suelo resultan determinantes para la estructura, dinámica y distribución espacio-temporal de las fitocenosis en general, y para aquellas de influencia mediterránea en particular (PARKER *et al.*, 1989; ORTEGA *et al.*, 1997; PECO *et al.*, 1998). Las variaciones en la dinámica de los bancos de semillas del suelo se reflejan en la composición, distribución y dominancia de las especies (PARKER *et al.*, 1989). Sin embargo, no siempre puede establecerse una correlación directa entre la vegetación y el banco de semillas del suelo (THOMPSON, 1986; LEK, 1989; RICE, 1989), ya que algunas especies se reproducen tanto por semillas como de forma vegetativa.

Planificación del estudio y análisis de los datos reproductivos de especies amenazadas para una conservación *in situ-ex situ*: el caso de *Fumana juniperina* (Dunal) Pau (a partir de CARRIÓ & al., 2008)

Fumana juniperina (Dunal) Pau es una especie perenne de distribución mediterráneo-occidental que vive sobre suelos arenosos de naturaleza silíceo. Se conoce su presencia en la Península Ibérica (Cádiz), Menorca, Cerdeña, Sicilia, Argelia, Túnez y Marruecos. Por las características del sustrato que ocupa su presencia no es frecuente en ninguno de los territorios, pero en todos ellos, excepto en España, las poblaciones conocidas están formadas por numerosos individuos y, aparentemente al menos, no presentan síntomas de amenaza. Sin embargo, en España, está catalogada, de acuerdo con las categorías de la UICN como en peligro crítico [CR: A4c; B1ab(i,ii,iii,iv,v)+2ab(i,ii,iii,iv,v); C1], debido principalmente a que las dos únicas poblaciones españolas conocidas (Cádiz y Menorca) se han visto reducidas drásticamente en los últimos años como consecuencia del cambio del uso del territorio (GÜEMES, 2003). La población de Cádiz está formada por unos 700 individuos dispersos en varios núcleos como consecuencia de la fragmentación producida por el desarrollo urbanístico del litoral gaditano. Por su parte la población de Menorca está formada por apenas 20 individuos, que presentan fuertes fluctuaciones y cambios importantes en el número. Seguramente el cambio del uso del territorio, la reducción del pastoreo y el avance de la vegetación natural han apartado a esta especie marcadamente heliófila.

La necesidad de desarrollar un plan de conservación *in situ-ex situ* nos llevó a plantear el estudio de la influencia del sistema reproductivo en el mantenimiento de poblaciones pequeñas, potencialmente de individuos consanguíneos. Es conocido que las Cistáceas leñosas en general presentan una marcada autoincompatibilidad y, por tanto, la eficacia de su sistema reproductivo depende del cruzamiento con la participación de insectos polinizadores, principalmente himenópteros, dípteros y coleópteros (BOSCH, 1992; HERRERA, 1992; TALAVERA & al., 1993, 1997; BLASCO & MATEU, 1995; RODRÍGUEZ-PÉREZ, 2005). Si la autoincompatibilidad estaba presente también en *F. juniperina*, las poblaciones cada vez menores difícilmente serían capaces de sacar adelante a una descendencia que las renovara y cualquier plan de recuperación debería pasar por el reforzamiento y el aumento de la diversidad genética de las poblaciones. Sin embargo, había antecedentes de autocompatibilidad y de cierta capacidad para la polinización autónoma en algunas Cistáceas subarborescentes del género *Helianthemum* (TÉBAR & al., 1997) y concretamente en otra especie de *Fumana*, en este caso de amplia distribución (GÜEMES & BOSCAIU, 2001). Si *F. juniperina* también fuera autocompatible, capaz de polinizarse de manera autónoma, y no presentara depresión por endogamia, la recuperación de las poblaciones podría plantearse solo desde la perspectiva de facilitar su desarrollo, reducir la competencia y evitar la destrucción de más ejemplares, pero no sería necesario un refuerzo poblacional con material ajeno.

Con estos antecedentes nos planteamos estudiar dos cuestiones principales, directamente relacionadas con el éxito reproductivo de la especie: 1) ¿Qué capacidad de autocompatibilidad y de autopolinización autónoma presenta *F. juniperina*?; 2) ¿Presenta algún grado de depresión por endogamia?

F. juniperina es una especie con flores pequeñas (6,4-9,2 mm de diámetro), casmógamas, que se abren con los primeros rayos de luz de la mañana y se marchitan apenas cinco o seis horas después. Produce muy pocas flores por planta (unas 40-45), de las que solo 3-5 se abren simultáneamente en cada planta.

Al plantear el estudio, la primera dificultad encontrada fue la limitación de las poblaciones españolas por el bajo número de ejemplares. Un estudio de estas características necesita no menos de 200-250 individuos para poder realizar todos los ensayos necesarios para establecer con precisión el sistema reproductivo de la especie. Por este motivo trasladamos el estudio a las poblaciones, bien conservadas, de Cerdeña para después contrastar los datos allí obtenidos. El estudio abordó la valoración de los siguientes aspectos del sistema reproductivo:

- Características de la flor
- Relación entre la producción de polen y de primordios por flor
- Viabilidad del polen y receptividad estigmática
- Sistema de cruzamiento mediante polinizaciones controladas
- Papel de los polinizadores
- Carga polínica en el estigma a lo largo de la antesis
- Porcentaje y velocidad de la germinación de la semillas
- Depresión por endogamia

Los resultados más importantes desde el punto de vista de la conservación de la especie y de la elaboración de un plan de recuperación fueron los siguientes:

No se encontraron diferencias significativas entre los resultados de los distintos tratamientos de polinización, lo cual significa que la autogamia es tan eficaz como la alogamia. Por ello podemos afirmar que *F. juniperina* es una planta autógena, capaz de producir semillas viables por autopolinización autónoma, que ocurre después de la antesis de las flor. Este dato coincide con los valores calculados del cociente polen/óvulo ($1232,26 \pm 223,46$) que se sitúan en lo que CRUDEN (1977) definió como especies alógamas facultativas.

La observación del proceso de polinización y la participación de los insectos en él nos ha permitido concluir que la especie presenta limitación de polinizadores. No se observaron visitas de polinizadores y el estigma permaneció libre de cualquier grano de polen en más del 50% de los casos. Solo excepcionalmente al final de la antesis el estigma presentaba algunos granos de polen, insuficientes para garantizar la fecundación de los primordios. De ese modo *F. juniperina* se comporta como una especie autógena estricta (o casi, ya que es posible que se produzca una polinización cruzada mientras la flor está abierta).

Tratamiento	Producción frutos	Nº flores tratadas	Producción semillas por fruto ^a	Nº frutos muestreados	Peso semillas ^a	Nº semillas pesadas
Autopolinización autónoma	35,0	100	95,8 ±4,1	32	0,997 ± 0,258	160
Autopolinización forzada	53,4	53	91,6 ±3,4	27	1,118 ± 0,118	135
Geitonogamia forzada	46,4	84	859 ±3,5	36	1,186 ± 0,045	180
Polinización cruzada	45,7	59	84,4 ±7,3	25	1,123 ± 0,112	125
Control	39,1	92	93,0 ±3,7	34	1,235 ± 0,066	170

Producción de frutos (%), producción de semillas por fruto (%) y peso de las semillas (mg) de *Fumana juniperina* en cada tratamiento de polinización (^aNo se encuentran diferencias significativas en función del Test de Kruskal-Wallis ($P > 0,05$). Valores medios \pm desviación estándar).

Tratamiento	Porcentaje germinación ^a	Velocidad germinación ^a
Autopolinización	42,18 ±13,59	19,21 ±6,02
Geitonopolinización	53,12 ±14,09	23,59 ±6,17
Xenopolinización	50,00 ±5,70	21,66 ±2,64
Control	59,37 ±4,03	27,34 ±1,71

Porcentaje y velocidad de germinación de las semillas de *Fumana juniperina* resultantes de diferentes tratamientos de polinización (^aNo se encuentran diferencias significativas en función del Test de Kruskal-Wallis ($P > 0,05$). Valores medios \pm desviación estándar).

La autogamia no sería un mecanismo eficaz para mantener la viabilidad de las poblaciones si se presentara acompañada de una elevada depresión por endogamia. Sin embargo, no hemos podido detectar la existencia de esta consecuencia negativa. La producción y calidad de las semillas (peso) es semejante en los tratamientos a autogamia y de alogamia; tampoco son significativas las diferencias de porcentaje y velocidad de germinación entre las semillas procedentes de distintos tratamientos (ver tablas), por lo que no hay una selección negativa de sobre las semillas autógamas. No existe pues depresión por endogamia, al menos en esta fase temprana del ciclo vital de la especie. Pero entre las especies autógamas es relativamente fre-

cuentas la aparición tardía (en fase de plántula o a lo largo del desarrollo de las plantas adultas) de fenómenos de depresión por endogamia (HUSBAND & SCHEMSKE, 1996). Serán necesarios más estudios sobre el desarrollo de plántulas y plantas antes de poder conocer con precisión el efecto de la depresión por endogamia en esta especie.

Las consecuencias del conocimiento del sistema reproductivo de *F. juniperina* son las siguientes:

- 1) La autogamia probablemente es el mecanismo dominante en esta especie y podría ser el responsable de un importante aislamiento poblacional al reducir el flujo génico entre las poblaciones. Es previsible la existencia de una alta diferenciación genética entre poblaciones y una baja diversidad genética en cada población, quizá fundada a partir de pocos individuos.
- 2) Hasta disponer de estudios genéticos sobre la distribución de la diversidad genética, debe evitarse el reforzamiento de poblaciones con material alóctono.
- 3) La especie no presenta limitaciones reproductivas, al menos en las fases de polinización, fecundación y germinación.
- 4) El primer paso para intentar el aumento del tamaño poblacional pasaría por una facilitación del desarrollo de las plantas (eliminar competencia, evitar alteraciones del territorio) y el seguimiento del éxito reproductivo. También podría realizarse una plantación con plantas de la misma población para aumentar más rápidamente el número de individuos reproductores.

La conservación *ex situ* se basará en la recolección de semillas de todas las poblaciones y, en la medida de todos los individuos ya que el flujo génico entre ellos puede ser muy bajo y cualquiera de ellos podría albergar un alelo singular.

4. Recolección y gestión

La recolección constituye, quizás, la actividad más crítica en cualquier banco de germoplasma, ya que de ella depende la eficacia de cualquier estrategia de conservación *ex situ*. Una vez conocida la distribución, ecología y características biológicas de un taxón, y diseñado el método de muestreo más adecuado (ver capítulo 2), las técnicas de recolección y gestión pueden incidir de manera positiva o negativa en la calidad y viabilidad del germoplasma, por lo que resulta imprescindible garantizar unos protocolos mínimos para el desarrollo de esta actividad. En este apartado se detallan algunas de las pautas generales que deberían considerarse para la recolección en un banco de germoplasma, considerando por separado las condiciones especiales que atañen a las semillas, polen y esporas.

4.1 Recolección de semillas

4.1.1 Recolección en campo

Durante la recolección es importante tener en cuenta el estado de maduración de los frutos y semillas, así como su localización en la planta, ya que la diferente posición en la inflorescencia puede dar lugar a una maduración escalonada de las semillas. Por ejemplo, en *Pastinaca sativa* L., las umbelas primarias maduran aproximadamente 10-14 días antes que las umbelas secundarias que, a su vez, maduran 10-14 días antes que las terciarias. Así, para toda la población, las semillas se dispersan durante un periodo de tiempo comprendido entre agosto y octubre (HENDRIX, 1984).

La observación de la polinización también puede aportar datos importantes a la forma de proceder a la recolección. La polinización con polen proveniente de distintos donantes puede llevar a una maduración heterogénea de los frutos producidos; en los óvulos de plantas que han sido fecundadas en un primer momento es más fácil que se desarrollen semillas que en las plantas fertilizadas tardíamente (LEE, 1988). Para reducir el riesgo de pérdida de semillas maduras, la recolección debería desarrollarse a lo largo de todo el periodo de dispersión de las semillas, registrando de manera individual cada recolección. La longevidad de una muestra de semillas que llega al banco de germoplasma está fuertemente determinada por su calidad en el momento de la recolección, sobre todo en las semillas consideradas “ortodoxas” (ver apartado 5.9.1). Como norma general, debería recogerse el mismo número de semillas (o frutos) de cada planta, en el mismo estado de maduración y justo antes del momento de la diseminación.

La forma en que se han recogido las semillas puede igualmente influir en los resultados de los ensayos de germinación realizados en el laboratorio y en la capacidad para superar posibles dormiciones. Ha sido demostrado que, para algunas especies, dichas variaciones pueden depender de la posición que las semillas tienen en el interior del fruto (ej. semillas basales más durmientes que semillas apicales) o de su distribución en la planta (TOOLE & al., 1964). Además, el peso y el tamaño de las semillas también pueden influenciar la calidad del lote y su respuesta en los ensayos de viabilidad. En concreto, algunas especies de la familia *Poaceae* desarrollan dos tipos morfológicos de semillas, de las cuales las más grandes dan lugar a plantas más vigorosas y con mayor capacidad de germinación (LAHIRI & KHARABANDA, 1961).

foto: E. Mattana



4.1

foto: L. Poddá



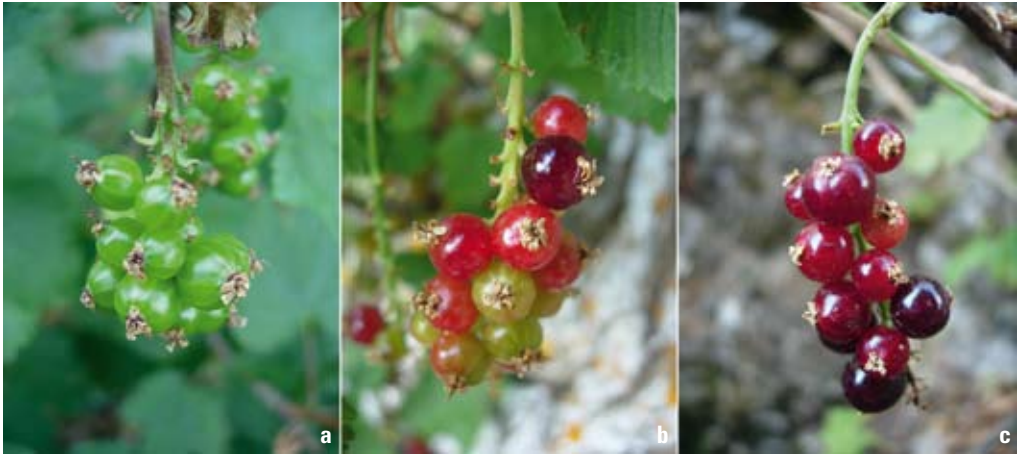
4.2



4.3

foto: G. Bacchetta

Figura 4.1- Frutos de *Astragalus verrucosus* Moris en fase de maduración; Figura 4.2- Semillas de *Helicodiceros muscivorus* (L.f.) Engl.; Figura 4.3- Gálbulo de *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Neilr. Para su correcta conservación, las semillas deben ser extraídas de los gálbulos en el momento de entrada en el banco.



(foto E. Mattana)

Figura 4.4 - Estados de maduración de frutos de *Ribes multiflorum* Kit. ex Roem. & Schult. subsp. *sandaliticum* Arrigoni. (a) frutos inmaduros, (b) estado intermedio de maduración, (c) maduración completa.

4.1.2 Momento idóneo para la recolección

En muchos casos las semillas no pueden ser recolectadas separadamente, sino junto a los frutos que las contienen (figuras 4.1, 4.2 y 4.3). De este modo se evitará interrumpir el proceso de maduración fisiológica que se está produciendo, a la vez que se favorece la adquisición, por parte de las semillas, de la tolerancia a la deshidratación.

Sabiendo que las semillas producidas por los frutos no carnosos, sean éstos dehiscentes o indehiscentes, son en las primeras fases del desarrollo intolerantes a la deshidratación, la recolección se debe efectuar en una fase posterior, cuando la semilla es capaz de absorber agua y, por lo tanto, tolera la deshidratación. Seleccionar este momento no es fácil. Cuando no existe experiencia, algunos indicios en el fruto (carnoso o no carnosos) pueden ayudar en la forma de proceder:

- El cambio de coloración puede ser un buen indicador, aunque no siempre es fiable. Por ejemplo, en el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bayas de diferente color (del verde al rojo) pueden contener semillas en el mismo estado de maduración (ELLIS & ROBERTS, 1981).
- El tamaño del fruto en las drupas está relacionada con el desarrollo completo de sus semillas (SMITH, 1995).
- El endurecimiento del pericarpio de determinados frutos se manifiesta únicamente cuando el embrión se ha desarrollado.

Los frutos carnosos deben ser recogidos en un estado de maduración óptimo (figura 4.4). Una recolección anticipada puede proveer de materiales con bajo poder de germinación. Por otro lado, una recolección demasiado tardía puede ocasionar pérdidas de material debidas a la dispersión natural, como la predación por parte de animales o a fenómenos meteorológicos como granizo o lluvias intensas.



foto: E. Mattana

Figura 4.5 - Prueba del corte en una semilla de *Pancratium maritimum* L.

4.1.3 La prueba del corte

Después de seleccionar la población que se va a muestrear se debería examinar con atención una primera muestra de las semillas usando la “prueba del corte” (figura 4.5), utilizando en el caso de semillas muy pequeñas una lupa de campo. Este simple análisis preliminar permitirá realizar una estimación bastante aproximada sobre la calidad del material, la cantidad de semillas vacías o estropeadas y el momento óptimo para la recolección. La prueba consiste en realizar una sección de un número representativo de semillas por la mitad, utilizando una cuchilla o un bisturí; las semillas de buena calidad presentan sus tejidos turgentes, sanos, con el color típico de cada especie (generalmente blancos o marfileños) y sin daños producidos por patógenos o insectos. El número adecuado de semillas utilizadas varía en función de cada especie, si bien es necesario tener en cuenta que en el caso de lotes de calidad mediocre el corte de pocas semillas puede llevar a sobrestimar el número de semillas sanas (SUSZKA & al., 1994).

Los problemas que pueden surgir al realizar estos análisis preliminares están relacionados con una limitada experiencia del recolector, o la manipulación de semillas de muy pequeño tamaño (PIOTTO & al., 2001). En este último caso, y cuando el aumento de la lupa no permita un buen análisis de la semilla, se puede recoger el material en bolsas transpirables y posponer la investigación de la calidad de las semillas al banco de germoplasma, donde la prueba puede realizarse examinando tres réplicas de 30 semillas cada una (CROSTI & al., 2006).

4.1.4 Protocolo de recolección

Si existe suficiente cantidad de semillas en el momento de la recolección, puede llevarse a cabo el siguiente protocolo:

- a) Conservar las semillas maduras y secas en bolsas de papel o algodón.
- b) Conservar las semillas enteras, dentro de los frutos, en bolsas de papel.
- c) Conservar los frutos carnosos en bolsas de plástico y mantenerlas aireadas: se pueden descomponer rápidamente y una mala conservación puede perjudicar la viabilidad de sus semillas. En general, la limpieza de las semillas debería ser llevada a cabo por el equipo del laboratorio del banco de germoplasma.
- d) Recoger un ejemplar para el herbario con el fin de asegurar su correcta determinación, siempre que ello no perjudique a la población.
- e) Para ejemplares muy raros o amenazados, repetir la recolección en dos años sucesivos, para tener la certeza de haber recogido el material en un estado idóneo, o bien repetir varios muestreos en el mismo año.
- f) La cantidad ideal de semillas a recolectar es aquella que permite:
 - Disponer de una muestra representativa que pueda ser conservada en un banco de germoplasma a largo plazo, en caso de desaparición de la población o como base para realizar estudios sobre la genética y biología de la especie, a través de análisis tanto cuantitativos como cualitativos, no destructivos.
 - Obtener semillas suficientes para realizar los ensayos de germinación y de viabilidad.
 - Realizar pruebas periódicas de viabilidad en el banco de germoplasma.
 - Que una parte de la colección pueda destinarse a la producción de lotes para la duplicación de las colecciones y para la validación de los protocolos de germinación que se realicen, bien en el banco de germoplasma, bien en otros centros de investigación.

En el caso de que se prevea que la recolección pueda influenciar negativamente en el desarrollo demográfico de una especie o de una determinada población que está ya fuertemente amenazada, la recolección no debe efectuarse, aplicando otros métodos de multiplicación compatibles con la forma biológica del taxón (ej. multiplicación *in vitro*, realización de esquejes o regeneración a partir de multiplicación de germoplasma proveniente de otros bancos de germoplasma, etc).

4.1.5 Procedimiento tipo para la recolección de semillas

A continuación se especifica la secuencia de trabajo recomendable para la recolección de germoplasma:

- a) Identificación inicial del taxón objetivo.
- b) Si no existe certeza de su naturaleza, utilizar floras para la determinación (en este caso, indicar en la ficha de recolección la bibliografía utilizada); en el caso de que no pueda ser determinado el taxón con total certeza, indicar en la ficha: “se necesita regeneración para la determinación”.
- c) Delimitar la localidad de muestreo.

- d) Si la localidad de muestreo tiene dimensiones cuantificables, determinar los límites, la extensión, la presencia de posibles microhábitats, etc., reflejando todos estos datos en la ficha de recolección. Es importante, además de la información geográfica, indicar datos sobre el régimen de propiedad y uso del espacio afectado, así como las medidas de protección existentes.
- e) Recolectar el material.
- f) Indicar en la ficha de campo el número de individuos de los que se ha recogido material y la cantidad obtenida de cada unos de ellos, además de la metodología llevada a cabo en el muestreo.
- g) Finalizar la ficha anotando cualquier dato que pueda resultar útil al banco de germoplasma.
- h) Registrar el pliego testigo recogido para el herbario.

4.2 Recopilación de datos en el campo y cumplimentación de fichas

La caracterización de poblaciones es un instrumento básico para la diagnosis de su estado de conservación y para la estimación de su viabilidad futura, que puede realizarse desde diferentes perspectivas (GARCÍA, 2002), ofreciendo información útil para la programación y la gestión de la conservación *in situ*. En lo referente a la conservación *ex situ*, los resultados derivados del estudio de la estructura y dinámica de las poblaciones, unidos al conocimiento de la distribución actual del taxón, la variabilidad genética, la autoecología o la biología reproductiva, permiten obtener muestreos más eficaces y más representativos del taxón que se pretende conservar.

Para garantizar que los datos recogidos por distintos recolectores o diversos bancos de germoplasma sean comparables y homogéneos, suelen desarrollarse fichas de campo estandarizadas, cuya cumplimentación permite recoger y elaborar los datos relativos a la localidad de muestreo de los taxones de interés. De este modo, cada vez que se realiza una determinada investigación, las fichas aportadas por diferentes instituciones pueden ser contrastadas y unificadas siguiendo criterios homogéneos. Por ejemplo, las fichas empleadas en el proyecto GENMEDOC poseen una primera parte relativa a los datos de la localidad de muestreo, y una segunda parte específica para cada tipo de estudio (ver cuadro 4). La repetición de los datos referidos al hábitat de cada una de las recolecciones permite obtener una mayor seguridad en la información y la posibilidad de observar en el tiempo las posibles variaciones de los parámetros ambientales (ej. rango altitudinal, superficie, etc.). Por otro lado, la disponibilidad de estos datos es fundamental para la elaboración de protocolos de germinación de taxones endémicos, o sobre otros para los que no existen datos publicados.

4.2.1 Equipamiento para la recolección de germoplasma y datos asociados

El equipamiento y los materiales necesarios para el trabajo de campo (figura 4.6) son en gran parte los mismos que se utilizan en cualquier otro tipo de investigación o práctica botánica. A continuación se especifica el equipamiento útil para la recolección de germoplasma y toma de datos, incluyendo otros elementos que pueden ser necesarios:

- Cuaderno de campo.
- Grabadora.
- Fichas de campo.
- Ordenador portátil – Notebook.
- Bolsas de algodón o de papel de diferentes tamaños.
- Bolsas de polietileno de varios tamaños.
- Botes de plástico o vidrio (para capturar posibles parásitos, polinizadores y recolectores).
- Bolsas de filatelia transparentes y transpirables.
- Cinta adhesiva, elástica.
- Etiquetas para introducir en cada bolsa.
- Alcohol 95° desnaturalizado y glicerina.
- Formaldehído al 30% para la fijación de material vivo.

foto: C. Pontecorvo



Figura 4.6. Recolección de núculas de *Anchusa formosa* Selvi, Bigazzi & Bacch.

- Floras y manuales de campo de obras genéricas.
- Altímetro / barómetro.
- Termómetro.
- Higrómetro.
- Clinómetro.
- Medidor de pH.
- GPS o DGPS.
- Guantes de jardinería o de látex y mascarillas.
- Lupas de 3x o 6x.
- Cuchillas / bisturí.
- Bolsas de nailon.
- Vidrios portaobjetos.
- Navaja / tijeras de podar.
- Berbiquí / pala / pico.
- Equipamiento de escalada (casco, cuerdas, arnés, descendedores, mosquetones, etc.).
- Lapicero / bolígrafo / goma.
- Cámara fotográfica réflex o compacta.
- Prismáticos.
- Papel de periódico / almohadillas absorbentes / prensa de campo.
- Macetas de plástico.
- Gel de sílice para conservar el material recogido para determinados estudios moleculares.

4.3 Procedimientos para casos particulares

4.3.1 Recolección fallida de germoplasma

Cuando no puede ser recogido material adecuado, conviene rellenar igualmente los campos básicos de la ficha de recolección, describiendo los motivos de la ausencia de recolección e indicando cómo suplir tal ausencia (determinar nuevas fechas de recolección, escoger otra localidad, recoger otro tipo de germoplasma, etc.). Cuando se realicen otro tipo de inventarios, cumplimentar en las fichas realizadas para tal efecto (ficha fenológica, demográfica, inventario florístico-sociológico, inventario edafológico, etc.) y adjuntarlas a la ficha de recolección que se entregará en el banco de germoplasma.

En el caso de no poder realizar una recolección repetitiva (por condiciones meteorológicas desfavorables, condiciones fitosanitarias precarias, ausencia de germoplasma, etc.), se podrá recoger una muestra de suelo en las proximidades de los ejemplares o, en el caso de infección por agentes patógenos, un ejemplar completo de la planta. Estos materiales se conservarán en bolsas de nailon con su correspondiente etiqueta de identificación.

4.3.2 Poblaciones de dimensiones extremadamente reducidas

Cuando se trabaja con taxones endémicos y/o en riesgo de extinción cuya distribución se encuentra restringida a localidades puntuales, es relativamente fácil que las poblaciones presenten un reducido tamaño poblacional. Tal es el caso *Ribes sardoum* Martelli, presente exclusivamente en una localidad (Oliena, Nuoro) de la isla de Cerdeña, o el endemismo *Ranunculus parnassifolius* L. subsp. *muniellensis* Bueno, Fern. Casado & Fern. Prieto, reducido a una única población en la Reserva de la Biosfera de Muniellos, en la Cordillera Cantábrica, en el norte de España (figura 4.7).

Cuando una población es muy pequeña (menos de 100 individuos), si hay material suficiente y la recolección no perjudica de ningún modo el futuro de la especie, conviene individualizar el material recogido de cada individuo, utilizando una bolsa para cada uno de ellos. En la ficha de recolección se debe anotar el número de lotes y las indicaciones para tratar de forma separada el material individualizado. Esto contribuye a la conservación de la diversidad genética de la población.

4.3.3 Daños biológicos en la población

La capacidad de observación del recolector es un elemento importante para individualizar los factores de perturbación o amenaza al hábitat y al taxón en cuestión. El recolector debería de verificar en todas las ocasiones las condiciones generales de la especie y de los individuos de los que se recoge el germoplasma. En el caso de que exista alguna infección por insectos, hongos u otros agentes patógenos, se hace necesaria la recolección de una muestra del hospedador y del patógeno, cerciorándose de conservarlos en una bolsa cerrada y hermética, que se mantiene separada del resto del material para que no se produzca contaminación alguna. Este material puede también ser conservado en botes de plástico o vidrio con formaldehído al 30% o alcohol desnaturalizado y glicerina en la proporción de 1:1.

4.3.4 Condiciones meteorológicas desfavorables

Cuando las condiciones meteorológicas son desfavorables (ej. lluvia, granizo, nieve) no se debería recoger el material. Si ha llovido los días anteriores a la salida de campo, debe valorarse con atención las condiciones de las semillas y en particular si éstas han sido ya dispersadas o si están muy húmedas y dañadas. En el caso de que el material sea apto para la recolección, será útil realizar este proceso prestando especial atención al secado del germoplasma al aire y no al sol, entregándolo con la mayor brevedad posible al banco de germoplasma.

4.3.5 Recolección de pliegos de herbario y/o material vivo

Excepto en el caso de poblaciones amenazadas, es necesario recoger siempre un pliego testigo de la población. Estos ejemplares de herbario deberán portar el mismo número de referencia de la correspondiente colección de semillas y lo ideal sería que fueran muestras completas que, en el caso de plantas herbáceas, incluyan flores, frutos, partes vegetativas y raíces (figura 4.8). Para la realización de un buen pliego de herbario se sugiere que, para excursiones largas, se complete el secado con la mayor brevedad de tiempo posible, utilizando papel absorbente (papel de periódico) o láminas de goma espuma y prensas de campo. Cuando esto no sea posible, los ejemplares se mantendrán en lugares secos, cambiando el papel de secado con frecuencia. Si no es posible realizar esta desecación, se aconseja prensar igualmente el material de herbario y conservarlo en bolsas de plástico, teniendo la precaución de vaporizarlo con alcohol desnaturalizado antes de cerrar las bolsas. Este es el procedimiento más frecuente en las expediciones y campañas de recolección que se llevan a cabo en lugares cálidos y húmedos (áreas tropicales) donde los procesos de fermentación pueden impedir la conservación. No se deberían recoger ejemplares de herbario para plantas muy raras o amenazadas, sobre todo si son bien conocidas desde el punto de vista taxonómico.

Un ulterior instrumento para el estudio, conservación y multiplicación del germoplasma de un taxón es la recolección de planta viva para conservar en maceta o en vivero. Este proceso sólo será efectuado por personal especializado, siempre y cuando no perjudique ni reduzca el potencial biológico de la población; resulta de gran utilidad en los casos en los que no se conoce la biología reproductiva y la fenología de la especie, o cuando el ejemplar recogido permita la multiplicación de forma vegetativa.

4.3.6 Recolección de muestras de suelo

En algunas ocasiones es importante tomar, anotándolo en la ficha correspondiente, una o más muestras de suelo, con las que se podrán realizar análisis fisicoquímicos o del banco de semillas del suelo. La información fisicoquímica proveniente del suelo ayuda a definir de forma más completa la ecología de una determinada unidad taxonómica. Para conseguir una completa caracterización se podrá determinar, según los casos, la composición de la textura, el pH en agua, el pH en cloruro potásico (KCl), los carbonatos, la materia orgánica, el carbono orgánico, el nitrógeno total, el fósforo asimilable, el índice de contenido de agua en campo (pF, entre 2.5 y 4.2), la acidez total, las bases de intercambio, la saturación en bases y la capacidad de intercambio catiónico. Una vez que se han obtenido estos datos, se podrá clasificar el suelo siguiendo los criterios de la Soil Taxonomy (SOIL SURVEY STAFF, 1998). Generalmente



Figura 4.7 – Frutos inmaduros de *Ranunculus parnassifolius* subsp. *muniellensis* Bueno, Fern. Casado & Fern. Prieto, endemismo cantábrico con una única población conocida. Debido a la variabilidad fenológica y a las vicisitudes meteorológicas, la recolección de semillas de 100 individuos requiere de varias campañas de muestreo en un único año.

bastará con una o varias muestras representativas del área de ocupación de la población para el análisis.

Para los estudios de carácter ecológico son de suma importancia los análisis realizados para determinar la cantidad de semillas en el suelo y poder así cuantificar la abundancia y la persistencia de las semillas en el terreno (ver apartado 3.3). En este caso es necesario realizar muestreos más completos y de mayor volumen, para su posterior cribado en el laboratorio.

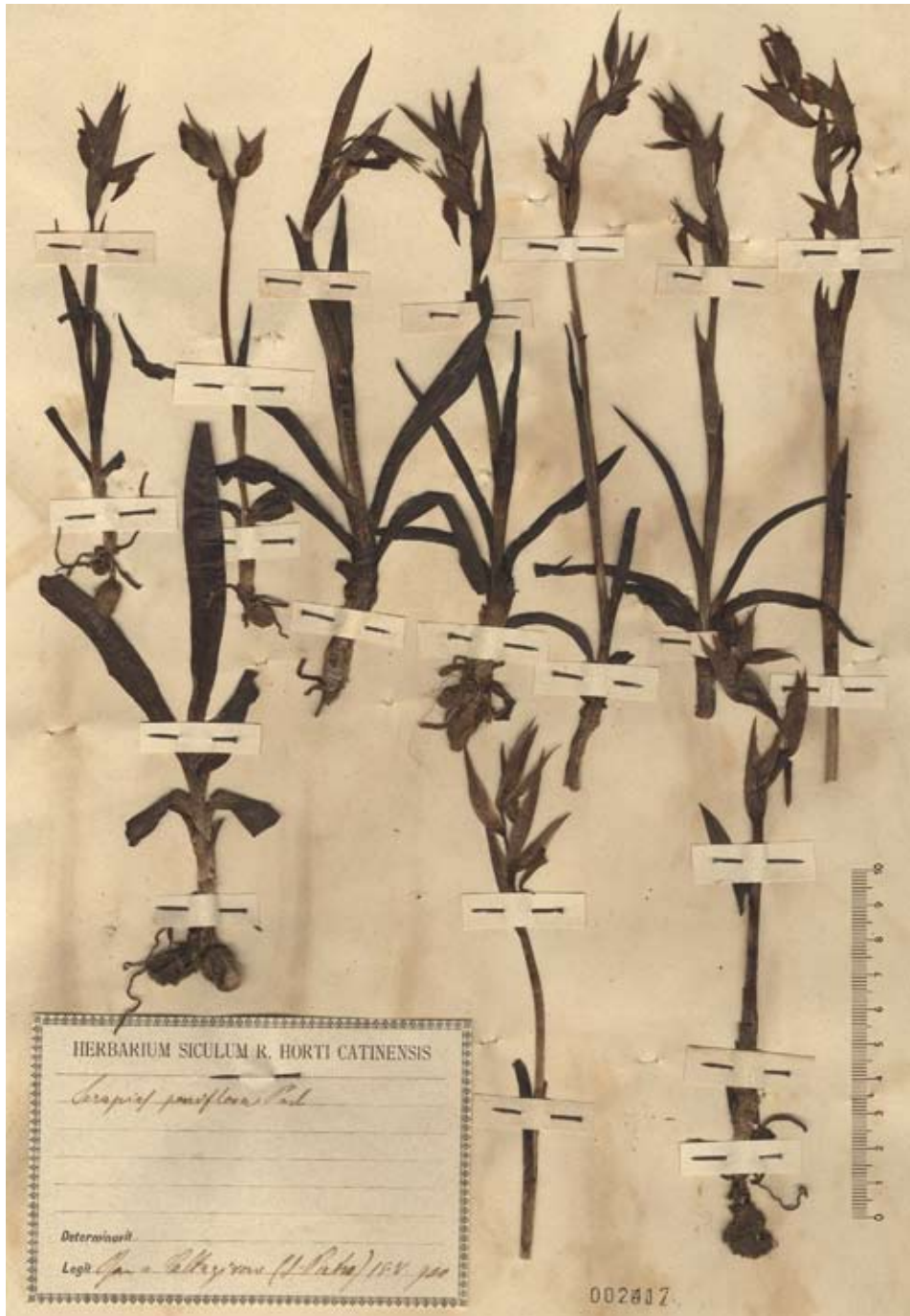


Figura 4.8. Pliego de herbario escaneado de *Serapias parviflora* Parl. (colección Tornabene) disponible en Internet a través de la web del *Dipartimento di Botánica di Catania* (www.dipbot.unict.it)

4.4 Recolección de polen

4.4.1 Introducción

El polen se desarrolla dentro de unas cavidades de las anteras denominadas lóculos, rodeados por un tejido efímero, el tapete, que tiene la función de nutrir y regular el desarrollo de los granos de polen (PACINI, 1997), las células germinales masculinas haploides. Cuando los granos están maduros fisiológicamente, la antera se abre para que queden expuestos a los agentes diseminadores. Previo a este proceso de apertura se produce una pérdida parcial de agua por parte de la antera, si bien los granos pueden también perder agua antes, durante o después de la apertura (PACINI, 2000).

En el momento de la apertura de la antera el polen puede ser:

- a) Expulsado de la antera, como ocurre en algunas plantas anemófilas (ej. *Morus*, *Parietaria*) y algunas entomófilas (ej., ciertas especies del género *Genista*).
- b) Dispersado en el momento en el que la antera se abre, puesto que no existen mecanismos que lo mantengan dentro, como ocurre en muchas plantas anemófilas (ej. *Poaceae*).
- c) Mantenido dentro de la antera con el cemento polínico, sustancia viscosa derivada de la degeneración del tapete (PACINI & HESSE, 2005) hasta que la fuerza de adhesión del polen a la antera sea vencida por el viento o el polen sea transportado accidentalmente por los animales que visitan las flores.

En los tres casos el polen, en el momento de la apertura de la antera, está siempre expuesto a oscilaciones de temperatura y humedad relativa. Si los granos no poseen mecanismos para sobrevivir a este estrés, pueden perder o ganar agua, ser invadidos por mohos y bacterias (sobre todo cuando la humedad relativa es muy alta) e incluso morir de forma más o menos rápida.

El espacio y el tiempo transcurridos entre el momento de la apertura de la antera y la llegada del polen a los estigmas en las *Angiospermae* o las gotas micropilares de *Gymnospermae* pueden oscilar mucho. Varían desde pocos centímetros y pocos segundos en las plantas sociales anuales (ej. *Poaceae*) a algunos kilómetros y pocos días, como sucede en muchos árboles anemófilos (ej. coníferas), así como grandes desplazamientos en pocos días, como ocurre en plantas entomófilas con un número muy bajo de individuos por unidad de superficie (ej. *Orchidaceae*).

4.4.2 Categorías de granos de polen

En el momento de la apertura de la antera se pueden diferenciar los granos de polen en función de distintas características: tamaño, forma, estructura, estado de desarrollo, contenido en agua o forma de agregarse. El tamaño de los granos de polen suele oscilar entre 30 y 200 micrómetros, existiendo gran cantidad de especies con tamaño de grano entre 60 y 80 micrómetros. La forma suele ser oval, a veces esférica y sólo en casos excepcionales con otra forma, como en muchas monocotiledóneas marinas: *Posidonia oceanica* (L.) Delile, por ejemplo, presenta granos de polen en forma de aguja con pocos milímetros de longitud y pocas decenas de micrómetros de anchura.

La estructura externa e interna del grano de polen es muy importante a la hora de su reconocimiento. Las dos paredes de diferente composición, *exina* e *intina*, determinan la geometría del grano y son caracteres importantes para su determinación. Además, la presencia o ausencia de almidón en su interior es a menudo carácter taxonómico (FRANCHI & al., 1996). Aunque durante su desarrollo siempre existe acumulación de almidón, el grano de polen maduro puede estar parcial o totalmente hidrolizado (PACINI, 1996). Si no existe almidón no significa que no haya carbohidratos de reserva, sino que se encuentran localizados en el interior de vesículas citoplasmáticas en vez de en amiloplastos (FRANCHI & al., 1996). En el grano maduro existen también reservas solubles de carbohidratos, fundamentalmente glucosa, fructosa y sacarosa (SPERANZA & al., 1997).

El grano de polen, en función del grupo taxonómico al que pertenezca, puede finalizar su desarrollo antes de la dispersión o bien durante la formación del tubo polínico. Los granos se clasifican en trinucleados o binucleados; los primeros son los que han completado su desarrollo y están compuestos de dos gametos masculinos y una célula del tubo; los binucleados, por su parte, deben todavía sufrir una división mitótica para la diferenciación de los dos gametos masculinos.

Recientemente se ha descubierto que, en analogía con lo que ocurre con las semillas, se pueden diferenciar dos categorías dentro de los granos de polen: los que están bastante deshidratados, análogos a las semillas ortodoxas, y los hidratados, análogos a las semillas recalcitrantes (FRANCHI & al., 2002; NEPI & al., 2001; PACINI & HESSE, 2004; PACINI & al., 2006). Del mismo modo que para las semillas, se adopta un límite del 30% del agua presente en el polen para clasificarlo en dichas categorías. Los granos que en la naturaleza se consideran parcialmente deshidratados, con un contenido en agua inferior al 30%, resisten bien el estrés de temperatura, humedad relativa y se conservan fácilmente; pero, por otro lado, germinan sobre el estigma de forma más lenta, empleando siempre más de una hora. Los granos de polen con un contenido en agua superior al 30% no soportan la deshidratación, pero germinan más rápidamente, incluso en cuestión de pocos minutos, ya que la rehidratación se produce de forma muy rápida.

Cuando la antera se abre, los granos de polen pueden presentarse de formas diversas para su dispersión, dependiendo de los mecanismos que posean para formar agregados. Con la denominación “unidad dispersora de polen” se hace referencia a la configuración en la que se produce la dispersión del polen. De hecho, los granos pueden dispersarse de manera individual, como ocurre en muchas plantas anemófilas, o agrupados. Los cuatro granos de polen que derivan de la meiosis pueden separarse, o bien permanecer juntos formando una tétrada.

PACINI & FRANCHI (1998) han descrito trece formas diferentes de unidades dispersoras de polen. Los granos de polen en mónadas o en tétradas pueden además diseminarse en unidades más complejas, ya que se adhieren mediante sustancias viscosas como el cemento polínico (*pollenkitt*) o los filamentos adhesivos de viscina. De esta manera los granos de polen puede ser que lleguen al estigma solos o agrupados, incluso en masas de centenares de miles, como ocurre en las *Orchidaceae*.

Desde un punto de vista genético, cuanto mayor sea el número de granos que compongan una unidad dispersora de polen que llega al estigma, mayor será el número de semillas pro-

cedentes del mismo padre. Por el contrario, si el polen se dispersa individualmente, será más fácil que sobre el mismo estigma lleguen granos provenientes de diferentes plantas, es decir, de padres distintos; en este caso se producirá una fuerte competencia masculina (selección gametofítica).

Todas estas características son importantes, directa o indirectamente, para la recolección del polen y para su posterior conservación.

4.4.3 Necesidad de recoger polen

El polen se recoge con fines de investigación básica o aplicada (HOEKSTRA, 1995; DAFNI *et al.*, 2004); en base a las motivaciones por las que se ha recogido, la forma y cantidad de polen puede variar en función de una o más de las siguientes razones:

- Para conocer la forma y el tipo de la unidad dispersora.
- Para comprobar su estado de hidratación, establecer si está parcialmente hidratado o deshidratado y poder así valorar las posibilidades y metodologías para su conservación.
- Para controlar si es viable, es decir, si es apto para la fecundación.
- Para saber si está formado por dos o tres células y valorar su estado de desarrollo.
- Para almacenarlo y usarlo en investigación de la biología vegetal.
- Para la obtención de individuos haploides.
- Para la experimentación y terapia en el campo de las alergias de polen.
- Para su almacenaje y posterior polinización de plantas interesantes desde el punto de vista económico, como ocurre con el kiwi, donde los frutos polinizados abundantemente son de gran tamaño y alcanzan los mayores precios en el mercado.
- Para conservar información genética (gametos masculinos) de una determinada especie.

4.4.4 Control de la viabilidad

Independientemente de las razones por las cuales se recoge el polen, al igual que ocurre con las semillas es importante conocer su viabilidad, es decir, si posee la capacidad de fecundar en el tiempo. Esta característica es importante cuando se produce la apertura de la antera, pero también en el momento de la recolección y en las posibles fases posteriores. Si se trata de polen parcialmente hidratado, por lo tanto particularmente vulnerable, se debería saber durante cuánto tiempo permanece viable si se expone a condiciones de baja humedad.

Básicamente existen cinco aproximaciones para valorar si el polen es viable, por medio de distintas metodologías con las que se obtienen resultados tanto directos como indirectos. Los resultados directos son los que derivan de la medida de la actividad de fecundación, mientras que los resultados indirectos ofrecen información que induce a pensar si el polen es más o menos viable.

Entre los métodos directos de valoración de viabilidad del polen figuran los siguientes:

- Se analiza el polen para verificar la presencia y abundancia de moléculas que participan en el proceso de la respiración, de cuya presencia se deduce que el polen está vivo.
- Se tiñe el citoplasma o algunas moléculas genéricas que indiquen su presencia o actividad metabólica, aunque estas características no garantizan que el polen esté vivo.

- Se hace germinar el polen *in vitro*, en medio sólido o líquido. Si los granos emiten el tubo polínico esto significa que están vivos.
- Se utiliza el polen para polinizar y se observa la formación de los frutos y el número de semillas maduras. Este método requiere de semanas e incluso meses, debiendo considerar en todo momento la posible existencia de barreras post-zigóticas que, después de la fecundación, impidieran la formación de semillas.

El método indirecto más usado es el de la reacción fluorocromática (HESLOP-HARRISON & al., 1984). Esta metodología utiliza el colorante apolar “diacetato de fluoresceína” que penetra en el interior de los granos de polen. En su citoplasma, por la actividad enzimática (esterasas) se produce la liberación de fluoresceína, un compuesto polar fluorescente que permanece en el interior de los granos sólo si la membrana está intacta. Por tanto, mediante esta técnica se evidencia la presencia de enzimas activas y también la integridad de la membrana plasmática. Si se observa con un microscopio con luz ultravioleta, los granos viables que han acumulado en su interior la fluorescencia aparecen intensamente fluorescentes, mientras que los que están muertos poseen una fluorescencia débil o ausente. Para obtener datos fiables es aconsejable observar al menos un centenar de granos por preparación y hacer al menos tres réplicas para poder realizar el análisis estadístico. Mediante este método se puede valorar la viabilidad de una muestra en menos de una hora, aunque requiere la disponibilidad de un microscopio de fluorescencia.

En el caso de poder disponer únicamente de un microscopio óptico de luz visible, se pueden utilizar otros métodos indirectos que evidencian actividad enzimática, como las deshidrogenasas o las perosidasas que, aunque son también simples y útiles, pueden dar lugar a falsos positivos (DAFNI & al., 2004). Otro método que utiliza el microscopio de luz visible es el de PÁLFI & MIHALIK (1985) en el que mediante un colorante específico se marca la prolina, un aminoácido que está siempre presente en las células que son viables.

No todos los granos de polen conservan su viabilidad en el tiempo, ya que depende en gran medida del contenido en agua y en carbohidratos (PACINI & al., 2006). Los granos parcialmente deshidratados normalmente conservan dicha viabilidad durante más tiempo, puesto que son capaces de hacer variar la presión de turgencia interna al producirse un cambio en las condiciones externas. El mecanismo relacionado en este tipo de homeostasis consiste en la polimerización y despolimerización de sacarosa, glucosa, fructosa y almidón. Cuando la temperatura se eleva se produce una despolimerización de sacarosa y almidón, aumentando la presión de turgencia y el agua de los coloides del citoplasma no se evapora. También, cuando la temperatura se aproxima a los 0° C, se produce un aumento en la presión de turgencia, que impide la formación de cristales de hielo. De igual modo, se produce un aumento de presión de turgencia cuando la humedad relativa disminuye considerablemente, evitándose de este modo la evaporación. Al contrario, cuando la humedad relativa es muy alta, incluso superior al 90%, la presión de turgencia disminuye por la polimerización de glucosa y fructosa a sacarosa y de almidón con la glucosa (VESPRINI & al., 2002; PACINI & HESSE, 2005).

Los granos de polen parcialmente hidratados normalmente están desprovistos de mecanismos homeostáticos, por lo que muchos pierden agua, disminuyen de volumen y mueren a las

pocas horas de producirse la apertura de la antera, sobre todo si se conservan en ambientes secos. Este proceso se ha puesto en evidencia con distintos experimentos realizados sobre *Cucurbita pepo* L., en los que la exposición del polen a los agentes diseminadores dura únicamente seis horas (NEPI & PACINI, 1993). Las *Poaceae* poseen granos de polen parcialmente hidratados y son muy difíciles de conservar durante periodos largos. Naturalmente, su viabilidad se prolonga un poco en el tiempo si se conservan en condiciones de elevada humedad relativa (PACINI & *al.*, 1997). BARNABAS & RAJKI (1981) han desarrollado un método para conservar a largo plazo los granos de polen de maíz haciendo disminuir muy lentamente su contenido en agua, método no muy extendido por el momento.

4.4.5 Métodos de recolección

Puesto que el polen puede abandonar la antera en el momento en el que ésta se abre, o bien permanecer dentro de ella, las formas de recogerlo pueden variar. Es necesario individualizar el tiempo inicial (t_0), después del cual algunas características de los granos pueden verse modificadas en función de las condiciones externas, en particular en el caso de los granos de polen parcialmente hidratados (PACINI, 2000). Se debe tener en cuenta cuánto tiempo después de la apertura de la antera debe pasar para realizar la recolección, o bien recolectar inflorescencias o flores prematuras para su secado en bandejas o botes que posteriormente serán filtrados. En este caso, es necesario esterilizar a la llama todo el instrumental utilizado.

El polen, cuando cae de las anteras, se recoge con hojas de papel con parafina. Si se trata de plantas que expulsan el polen de la antera o si éste sale en el momento en el que la antera se abre, se recogen las plantas o fragmentos de las plantas con las flores o inflorescencias masculinas, en el momento más próximo posible a la dehiscencia de las anteras, y se colocan en una maceta situada en el centro de un papel con parafina, intentado que queden todas las flores fuera de la maceta. Se aconseja realizar esta operación por la tarde. La mañana siguiente, si el papel no se encuentra en un lugar donde penetra la luz del sol, es mejor iluminar la maceta con las flores usando una lámpara para facilitar un aumento en la temperatura y la consiguiente apertura de la antera. Es también aconsejable recoger el polen día tras día y repetir la operación cada tarde. La recolección se debe realizar en ambientes sin corrientes de aire ni contaminantes dispersos en el aire.

Se puede utilizar el mismo método en el caso de que el polen se quede en el interior de las anteras, por ejemplo por la presencia del cemento polínico (*Pollenkitt*); también se obtienen buenos resultados cuando las flores han sido cortadas, poniéndolas boca abajo sobre el papel, como en las *Asteraceae*. En cualquier caso tampoco se deben dejar las flores de las que se recoge el polen más de un día, ya que se puede producir la liberación de polen aún inmaduro.

En algunos casos se pueden recoger las anteras cortando los filamentos, en particular cuando son muy largos, dejarlos un poco de tiempo en una atmósfera seca que facilite la apertura de las anteras, y después pasarlos por un tamiz con mallas algo mayores que el diámetro del polen. En estos casos, sobre todo si los granos están rodeados de *pollenkitt*, el rendimiento de la recolección puede ser muy bajo y además, si las mallas son demasiado grandes, pueden pasar pelos o residuos de las anteras. Un método que está dando resultados buenos es el de usar una

pequeña bomba que aspire los granos directamente de la antera recién abierta. En este caso los granos se recogerán en un recipiente que servirá para la posterior conservación.

Cualquiera que sea la metodología utilizada en la recolección del polen, se debe siempre verificar su pureza, evitando la presencia de partículas extrañas provenientes de la misma planta o de otro origen, incluso polen distinto. Este proceso es particularmente importante si los granos de polen van a ser utilizados en la elaboración de sueros usados en alergología (COUR & LOUBLIER, 1980). Si el polen va a ser usado en investigación, es necesario también comprobar su viabilidad.

4.5 Recolección de esporas

4.5.1 Introducción

La metodología para obtener un buen número de esporas y en las mejores condiciones de desarrollo, viabilidad y esterilidad, está bastante consensuada a través del trabajo de diferentes autores (DYER, 1979; FORD, 1992; AGRAWAL *et al.*, 1993; BERI *et al.*, 1993; CONSTANTINO *et al.*, 2000; PENCE, 2000; QUINTANILLA *et al.*, 2000; BALLESTEROS *et al.*, 2006).

Como se indica en el capítulo 2, es importante elegir poblaciones silvestres genéticamente diferenciadas y en los momentos óptimos de maduración. Para ello, y debido a las diferencias de esporulación de las especies en sus diferentes poblaciones, de las que hay muy pocos datos concretos y fiables en la bibliografía, se debe realizar un trabajo previo de revisión de herbarios, bibliográfico y de campo en el que se establezca la corología y fenología precisa de las especies y poblaciones a recolectar. Es muy importante determinar exactamente los momentos de esporulación de los taxones con los que queremos trabajar, ya que aunque algunos de ellos lo hacen durante meses (ej. *Equisetum* sp. pl.), otros realizan la esporulación en cuestión de unas semanas (ej. *Thelypteris palustris* Schott o *Notholaena marantae* (L.) Desv). Para ello será de gran ayuda establecer una base de datos de anteriores recolecciones, a la hora de predecir los meses de trabajo de campo. El conocimiento de todos estos datos será previo a plantear la recolección de los materiales vegetales y evitar llegar cuando las frondes ya han liberado las esporas.

4.5.2 Recolección de frondes de pteridófitos para la obtención de esporas

Como norma general, la recolección debe ceñirse a las frondes sanas, fértiles y con los esporangios maduros. En función de las especies con las que estemos trabajando, se recolectarán frondes completas o fragmentos de éstas donde la maduración de los esporangios sea uniforme. Habrá que evaluar, según la disponibilidad de plantas y el estado de conservación de la población, la cantidad de frondes por individuo a recolectar para no alterar la dinámica poblacional. Si se trata de una población bien conservada, con ejemplares de gran tamaño (ej. *Dryopteris*, *Polystichum*, *Athyrium*, etc), y con buen número de individuos, se recolectará de cada una de las muestras una fronde de al menos 20 individuos de la misma población. (PANGUA *et al.*, 1994; BALLESTEROS *et al.*, 2006). En el caso de taxones de menor tamaño, y siempre que la población sea abundante, es mejor recolectar más de una fronde fértil por individuo. En el caso de poblaciones de tamaño más reducido se recolectarán tantos individuos como sea posible para asegurar captar la mayor variabilidad genética de la población. Para ello pueden servir como referencia los 10 y 15 individuos contemplados en QUINTANILLA *et al.* (2002) y ARAGÓN *et al.* (2004), respectivamente.

Las frondes a recolectar deberán estar libres de insectos y parásitos, barro y otras impurezas que puedan contaminar las muestras. Es importante recoger las frondes de plantas vigorosas y en momentos de crecimiento y desarrollo óptimo, ya que las esporas de plantas sometidas a estrés o que crezcan en los límites de su distribución geográfica pueden llegar a estar abortadas o germinar mal.

Con el fin de evitar la apertura prematura de los esporangios y la liberación de las esporas durante el transporte, QUINTANILLA *et al.* (2002) recomiendan envolver las frondes en papel

humedecido, lavando posteriormente las hojas con abundante agua corriente en el laboratorio, secándolas antes de la extracción de las esporas. Otra forma de hacerlo sería lavando las frondes en el campo y transportándolas en bolsas de plástico cerradas, sacando las frondes y poniéndolas a secar en cuanto se llegue al laboratorio, para evitar pudriciones o el crecimiento de hongos.

No todos los helechos tienen los esporangios localizados en las frondes. En el caso de especies de los géneros *Equisetum*, *Psilotum*, *Ophioglossum* o *Botrichium*, los esporangios se localizan en estróbilos, en sinangios o agrupados en una espiga terminal, que son los órganos que se recolectarán.

4.5.3 Elección de frondes adecuadas

Las frondes recolectadas deben tener los esporangios maduros, lo cual puede verificarse mediante un examen detallado, a través de una lupa de campo. En general, los soros con esporangios maduros suelen tener un aspecto granulado con un color brillante, mostrando los esporangios apiñados. Cuando las esporas están inmaduras los soros presentan un color verdoso o blanquecino. Cuando las esporas ya se han liberado los soros tienen un color mate y un aspecto deshilachado, con los esporangios abiertos y caedizos.

En el caso de especies con indusio, éste servirá de ayuda para ver el estado de maduración de los esporangios. Los indusios cubren totalmente el soro cuando los esporangios están inmaduros, y su coloración es verdosa. A medida que maduran el color verde desaparece, dando pie a una coloración amarillenta o marrón, destacando los esporangios, por debajo, con un color brillante y un aspecto granulado. El estado óptimo de recolección será cuando los esporangios más viejos de la fronde (los más alejados al ápice) se han empezado a abrir y en el resto siguen cerrados. Sin embargo, esta norma no debe aplicarse de forma general, ya que en algunas especies los esporangios van madurando a medida que la fronde se desarrolla. En estos casos se recogerán las partes de la fronde con los esporangios de maduración más uniforme, como se ha indicado anteriormente.

En los casos de especies de los géneros *Equisetum*, *Psilotum*, *Ophioglossum*, *Botrichium* y *Osmunda*, habrá que evaluar la maduración de los esporangios de manera diferente. Por ejemplo, en el caso de *Equisetum* el momento óptimo de recolección es cuando se observa que los estróbilos se abren mostrando los esporangios de un color verde intenso. El color blanquecino es indicativo de que ya se han liberado las esporas, y si los estróbilos están cerrados las esporas pueden estar aún inmaduras. En los casos de *Psilotum*, *Ophioglossum* o *Botrichium* y *Osmunda*, el momento óptimo de recolección es cuando los esporangios situados en la parte inferior de la espiguilla comienzan a abrirse.

4.5.4 Obtención de las esporas

Para obtener las esporas, las frondes recolectadas en el campo se deben depositar en pliegos de papel (lo más satinado posible), con un ligero peso encima y en un lugar seco (humedad relativa ambiental inferior al 65%) y a temperatura ambiente (25°C). Si son espiguillas o estróbilos pueden dejarse secar en placas petri o sobre de papel, sin necesidad de prensarse ligeramente.

Tras dos o tres días, las frondes habrán liberado ya una gran cantidad de esporas, y tras cinco o siete días prácticamente todos los esporangios se habrán abierto y tendremos a nuestra disposición todas las esporas de cada fronde prensada. Las esporas se observan como polvo fino sobre el papel, si bien también se liberan trozos de esporangios, restos del indusio, tricomas, páleas, etc. Las esporas verdes deben recogerse lo más pronto posible (uno o dos días) ya que pierden viabilidad rápidamente (LLOYD & KLEKOWSKI, 1970). Las esporas se retirarán de los pliegos, y antes de guardarlas en recipientes herméticos adecuados se pasarán por un tamiz de luz de ca. 0,074 mm, o por varias capas de papel para limpiar lentes y así eliminar impurezas como restos de paleas, esporangios, etc.

Por lo general las esporas no se han tratado previamente a su almacenado en seco, aunque se está comenzando a estudiar los efectos del desecado controlado y el contenido de agua de las esporas en su conservación (BALLESTEROS & WALTERS, 2007A,B). En los casos en los que se desee desecar las esporas con gel de sílice y mantener una atmósfera seca, se debe evitar el contacto directo del gel de sílice con las esporas.

4.5.5 Esterilización

En muchos trabajos en los que se han sembrado esporas de Pteridófitos se ha procedido a la esterilización de éstas con diferentes sustancias, para eliminar o reducir las contaminaciones producidas por hongos y bacterias (DYER, 1979 y referencias; FORD, 1992; AGRAWAL & *al.*, 1993; BERI & BIR, 1993; SIMABUKURO & *al.*, 1998; WHITTIER & PINTAUD, 1999; CONSTANTINO & *al.*, 2000; PENCE, 2000). Sin embargo, en diversos estudios se indica que la esterilización química de esporas afecta a su viabilidad (SIMABUKURO & *al.*, 1998; CAMLOH, 1999), por lo que este aspecto debe ser tenido en cuenta, si se pretende conservar material sin mermar su capacidad de germinación.

SIMABUKURO & *al.* (1998) muestran los efectos de diferentes sustancias empleadas para la esterilización sobre la viabilidad de esporas, concluyendo que lavar con agua, tratar con hipoclorito de calcio, incubar, filtrar y volver a lavar con agua, es la opción menos dañina y que mejor esteriliza las esporas. En algunos trabajos las esporas son sembradas sin esterilizar, o pasándolas simplemente por varias capas de papel para limpiar lentes y así eliminar restos de paleas o esporangios (WHITTIER, 1973; COLLI AUREA & PEREZ SONIA, 1999; QUINTANILLA & *al.*, 2002; ARAGÓN & PANGUA, 2004), sin que haya efecto manifiesto de contaminaciones, o sin que éstas hayan afectado a la germinación o al desarrollo inicial de los gametófitos.

En conclusión, un proceso de extracción de las esporas que se realice en condiciones de asepsia y limpieza, y un tamizado que elimine impurezas, será suficiente para obtener esporas limpias para su conservación y futuros usos. Otra cosa es que, con posterioridad, las esporas se quieran sembrar en esterilidad total para su cultivo *in vitro*, para lo cual el método de SIMABUKURO & *al.* (1998) arriba descrito es el más recomendado.

4.6 Conservación preliminar de germoplasma

4.6.1 Conservación de las accesiones recolectadas en el campo

Las muestras de germoplasma, lotes o ejemplares recolectados en el campo deben de ser conservados en un lugar fresco y sombrío, antes de ser enviados al banco. A continuación se detallan algunas recomendaciones a seguir para una correcta conservación de las muestras:

- No dejar el germoplasma en lugares con altas temperaturas (vehículo, etc.). La exposición a temperaturas elevadas y la radiación directa del sol puede dañar y estropear la muestra.
- Mantener siempre una buena ventilación en torno al germoplasma; utilizar sólo y exclusivamente bolsas de papel o sacos de algodón que garanticen una correcta transpiración.
- Comprobar siempre que las bolsas y sacos estén bien cerrados con el fin de evitar la pérdida y/o la contaminación del germoplasma que se ha recogido.
- Cerrar las bolsas preferiblemente con clips; en caso de usar cinta adhesiva se debe tener la precaución de aplicarla únicamente en el exterior del envoltorio puesto que, al abrir la bolsa, el material puede quedar pegado al adhesivo y ser inservible.
- En ningún caso congelar el germoplasma antes de entregarlo al banco de germoplasma.
- Si se han recogido frutos carnosos en el momento óptimo de maduración, se aconseja quitarles las partes carnosas lo más rápidamente posible tras la recogida, para evitar fermentaciones que puedan dañar la germinación. Este proceso debería llevarse a cabo en el banco. Cuando no es posible entregar los frutos inmediatamente al banco, ni limpiarlos, se pueden conservar en un frigorífico a pocos grados centígrados (0-5° C).

4.6.2 Extracción de semillas de los frutos

En la mayor parte de los casos es aconsejable delegar las operaciones de limpieza al banco o al personal especializado. Si las semillas han sido recogidas completamente maduras y se encuentran dentro de los frutos o en cápsulas secas, se puede proceder de manera rápida y segura a la apertura de los frutos y extracción manual de las semillas.

En los frutos carnosos la tolerancia a la desecación se manifiesta de forma tardía en las semillas. Los indicadores morfológicos de este proceso no siempre se manifiestan en el fruto, permaneciendo las semillas con elevada humedad interna. En el caso de que la entrega al banco se posponga durante algunos días, se recomienda extender las semillas en una capa sobre papel absorbente con el fin de maximizar la aireación y permitir la deshidratación, para alcanzar un equilibrio con las condiciones ambientales que rodean a las semillas. Estas condiciones deben de mantenerse lo más constantes que sea posible, al menos en lo referente a la humedad relativa y a la temperatura, controlándolas diariamente.

4.7 Entrega al Banco

4.7.1 Aceptación de las accesiones

Cuando se trata de plantas espontáneas, muy a menudo las muestras recolectadas son modestas y de calidad heterogénea. El banco aceptará el lote y, en años sucesivos, se incrementará la cantidad de germoplasma recogida de esa determinada localidad. No se aceptará el material en el caso de que no venga acompañado de su correspondiente ficha de recolección u otras fichas de campo, o cuando no sea posible su determinación (ej. ausencia de pliego testigo para el herbario, de información bibliográfica sobre la planta, etc.), salvo que por su interés se decida germinar parte del material para una identificación posterior.

4.7.2 Documentación adjunta a las accesiones

Para el registro y la posterior elaboración de la información, las fichas específicas para la recogida del germoplasma deberían ser cumplimentadas en todos sus campos, y utilizadas siempre que se recoja material de una determinada planta, en una localidad de muestreo (estación o microestación) y en una fecha concreta. A esta ficha el banco le atribuirá un número o código que identificará ese lote, identificando cada “entrada” o “accesión”. Por lo tanto, al efectuar la recogida del material, es muy importante indicar claramente en las etiquetas o fichas los datos fundamentales para facilitar el reconocimiento de la muestra y reducir las dudas de identificación que puedan surgir. Para las muestras de semillas del suelo, se llevará a cabo el mismo procedimiento. Si el material proviene de otros estudios realizados *in situ* (inventarios florísticos, de vegetación, demográficos, fenológicos y/o indicaciones) se hace necesario adjuntar, junto a la ficha de recolección, una copia del resto de fichas cumplimentadas durante el trabajo de campo.

Las muestras deberían estar siempre acompañadas de una lista compendio que recopile el contenido de los lotes, indicando todo el material que se ha recogido y los datos del recolector, con el fin de poder localizarlo en el caso de que surjan dudas sobre el material producido, o se solicite un certificado fitosanitario. Será responsabilidad del responsable técnico del banco de germoplasma vigilar el contenido de cada paquete y su correspondencia con la documentación adjunta.

Para cumplimentar las fichas, las etiquetas y la lista compendio, se pueden seguir los siguientes consejos:

- No usar abreviaturas para los nombres comunes y binomios científicos que puedan inducir a interpretaciones erróneas.
- Escribir de forma clara y preferiblemente en mayúsculas.
- Utilizar lapicero o bolígrafos indelebles.
- Evitar realizar tachones o correcciones que puedan dificultar la lectura y su comprensión.

4.7.3 Estado fitosanitario del material recogido

El transporte del germoplasma puede difundir distintas patologías o agentes patógenos. Por ello, en muchos países se ha elaborado una legislación que regula el ingreso e incluso también

el movimiento interno de las plantas. La difusión de agentes patógenos puede comprometer de forma muy seria la viabilidad de las semillas recogidas. Si el material se multiplica puede además difundir infecciones a otras especies o territorios.

Puesto que este tipo de riesgos son reales, se debe documentar la presencia de patologías y el estado sanitario de la población de la que se ha recogido el material, además de los posibles tratamientos a los que haya podido estar expuesto el germoplasma (ej. fumigación, pretratamientos fungicidas u otras sustancias biocidas). Por ello, puede ser necesaria la ayuda y experiencia de un fitopatólogo o de un entomólogo (FRISON & JACKSON, 1995). Por regla general, el riesgo de transmitir enfermedades es mayor cuando se transportan también las raíces de las plantas, ya que muchos agentes patógenos permanecen en el suelo, siendo de esta manera transportados con la muestra. Para los especímenes que se regeneran de forma vegetativa, la transferencia del germoplasma *in vitro* reduce de manera considerable este tipo de inconvenientes. Las patologías presentes en el germoplasma deberán siempre ser anotadas, así como las enfermedades existentes en la región de muestreo. Es igualmente importante indicar si las plantas están sanas en zonas que, de manera importante, han estado históricamente sujetas a determinadas infecciones.

Antes de realizar un envío de material con fines científicos o de conservación, hay que asegurarse de que no sea necesario acompañarlo de un certificado fitosanitario; actualmente, la normativa comunitaria permite la libre circulación de germoplasma dentro de la Unión Europea, mientras que para el material proveniente de terceros países se requieren certificados de procedencia, así como documentación fitosanitaria. En concreto, la Directiva de la Comisión Europea del 15 de octubre de 2004, determina los modelos de certificados fitosanitarios oficiales o de certificados fitosanitarios de exportación que acompañan a los vegetales, productos vegetales u otro tipo de material vivo proveniente de terceros países, que se encuentran incluidos en la Directiva 2000/29/CE.

4.7.4 Modalidades para el envío de las accesiones

Como ejemplo, tomamos las normas generales, para cualquiera que sea el destino del germoplasma, utilizadas por el Banco de Germoplasma del *Royal Botanic Gardens* de Kew, que se detallan a continuación.

Los embalajes que contienen las semillas deben estar etiquetados tanto en su interior como en el exterior y estar perfectamente cerrados. Se recomiendan los siguientes tipos:

- Sacos de algodón o tela.
- Sacos de nailon transpirable o tejido de PVC.
- Cajas de cartón resistentes, dentro de las cuales se disponen los sacos con el material.
- Se desaconseja embalar las semillas dentro de contenedores o bolsas no transpirables de plástico o PVC.

Para el envío del material se deberían seguir los siguientes pasos:

- Embalar las semillas en el último momento antes de realizar el envío.
- Adjuntar los datos inherentes al material y el número de sacos contenidos en cada caja, guardando una copia de esta información.

- Utilizar polietileno u otro material para rellenar los huecos y así impedir la movilidad del germoplasma dentro de la caja.
- Adjuntar el certificado de envío correspondiente, conservando una copia.
- Cerrar herméticamente las cajas y etiquetar con la dirección, tanto del destinatario como del remitente.
- Medir y pesar las cajas.

La documentación fotográfica, pliegos de herbario y otro material útil, pueden ser enviados posteriormente.

4.7.5 Gestión de accesiones provenientes de otros centros

Todo lo dicho hasta este momento acerca de la forma de conservación y del envío del material, es válido también para el germoplasma que no proviene directamente de la recogida *in situ*, sino de otros centros como pueden ser otros bancos de germoplasma, jardines botánicos o viveros.

Para la correcta gestión del material proveniente de otros centros es de gran importancia recopilar toda la información acerca de la gestión y de los tratamientos a los que han sido sometidas las semillas antes de ser enviadas. Es una buena norma proveer al responsable del banco de germoplasma de la historia cronológica del material que recibe, de una fotocopia de la ficha original de recogida y de todos los datos que le permitan contactar con los recolectores y responsables de otros bancos de germoplasma.

Cuando se envían varios lotes o varias especies, es aconsejable elaborar una lista de todo el material contenido en el envío. Será responsabilidad del personal del banco de germoplasma conservar y gestionar el lote siguiendo la metodología más adecuada en cada caso. Se debe siempre acompañar los lotes que llegan al banco de las fichas de recogida de campo, la información sobre tratamientos antiparasitarios, la forma de conservación y la existencia de protocolos de germinación o de reproducción en vivero. En el caso de no disponer de este tipo de información se debe de indicar el número de teléfono, dirección de correo electrónico o postal, de la persona responsable de dicho material con anterioridad a su llegada al banco.

4.8 Gestión general del material

Una vez que se verifica el material recibido y su documentación, el banco se convierte en el responsable de su correcta gestión y debe elegir la metodología más adecuada para su limpieza, conservación y multiplicación, a no ser que esté ya especificada. Los responsables del banco deben valorar si se debe trabajar con todo el lote o con parte de él, en función de las prioridades del banco, la importancia del material y la cantidad recibida.

4.8.1 Gestión de datos y muestras

La gestión cotidiana de un banco de germoplasma prevé el control y el seguimiento de diversas estructuras, equipamientos y parámetros. Periódicamente se realizan controles de los lotes conservados, con el fin de verificar que los contenedores mantengan una perfecta hermeticidad; para este fin es importante observar, con frecuencia, si el indicador de humedad presenta cambios determinados por una excesiva humedad (ver capítulo 6).

Algunas instituciones como IPGRI (actualmente *Bioversity International*) proponen que se efectúen cada 5-10 años pruebas de germinación o viabilidad sobre el material conservado (después de haberlo re-equilibrado a temperatura y humedad ambiente durante algunos días) para testar el estado del material. Cuando el nivel de viabilidad desciende de un cierto valor (que depende de la calidad inicial del lote y de la especie tratada), se hace necesario proceder a una nueva recolección o, en algunos casos, a la regeneración en vivero/laboratorio, profundizando en el conocimiento del taxón. Como referencia suelen tomarse en consideración los estándares de regeneración propuestos por IPGRI, variables entre el 65%-95% para accesiones de 10-20 años conservadas en colecciones activas (FAO/IPGRI, 1994). Sin embargo, este tipo de procedimiento está diseñado principalmente para los bancos de semillas cultivadas, por lo que su aplicación en plantas silvestres debe valorarse en función del tipo de germoplasma y la cantidad disponible, supeditada en cualquier caso al desarrollo de unas buenas prácticas de conservación (ver capítulo 6 y cuadro 6 para más información).

La mejor opción para la gestión de los datos generados en un banco de germoplasma es la informatización de los mismos, incluso en el caso de los centros que manejen un número reducido de muestras. Una primera aproximación puede realizarse mediante una hoja de cálculo, si bien el uso de software específico para la gestión de datos es un instrumento muy valioso para la administración de accesiones. Por este motivo, muchos bancos han decidido con el tiempo desarrollar instrumentos concretos relacionados con las bases de datos relacionales. Como ejemplo, el *Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles* (CBNMP) ha desarrollado un software de gestión para el banco de germoplasma, denominado VANDA (figura 4.9). Este instrumento se divide en dos partes: una que gestiona el almacenamiento de los datos y otra que permite búsquedas según criterios de *multi query*. El software utiliza menús ramificados y jerárquicos, los cuáles permiten abrir una serie de ventanas en cascada. Los archivos de datos se guardan como tablas base que se incrementan cada vez que se introducen nuevos datos. Las tablas base están constituidas por: localidad de recogida, nomenclatura (que incluye las características biológicas de los taxones y la información sobre su protección legal), bibliografía y protocolos de germinación. Las accesiones generan fichas únicas que permiten una búsqueda de carácter jerárquico por ensayo de germinación y por tipología de tratamiento.



Figura 4.9. VANDA, software de gestión del Banco de semillas del Conservatoire Botanique Méditerranéen de Porquerolles (M. Virevaire).

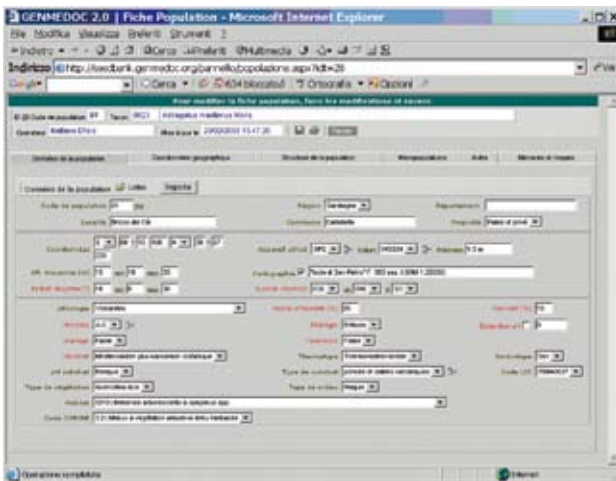


Figura 4.10. Aspecto de la base de datos del proyecto INTERREG IIIb GENMEDOC

A partir de esta experiencia, en el proyecto GENMEDOC han sido elaboradas fichas de campo y de laboratorio específicas para la gestión de la información generada durante el proyecto (figura 4.10), las cuales se adjuntan de forma sintética en este apartado (cuadro 4). El software utilizado en dicho proyecto permite el archivo, la búsqueda y la actualización del sistema directamente en línea, existiendo un sistema de seguridad de los datos en tiempo real, gracias a un servidor virtual que permite a un número ilimitado de operadores el acceso simultáneo y la interacción entre ellos.

4.8.2 Gestión del material vegetativo

Los procedimientos relativos a la recolección y entrega al banco de material para la propagación vegetativa (rizomas, tubérculos, bulbos, bulbillos, esquejes, etc.) no se alejan excesivamente de los procedimientos estándar expuestos anteriormente. De hecho, cada accesión debe ser complementada con la correspondiente ficha de recolección y eventualmente de otras fichas de campo (ej. ficha de muestreo fenológico, demográfico, florístico-sociológico, etc.), además de una lista enumerativa sobre el elenco de todas las fichas producidas e información sobre los recolectores.

Por el contrario, la conservación y multiplicación del material vegetativo presenta sustanciales diferencias respecto a las accesiones constituidas por semillas, por lo que se hace necesaria la adopción de protocolos específicos según el tipo de material entregado al banco. Después de haber completado los datos referentes a la ficha de recolección en la base de datos, aportando la información a través de la ficha del material vegetativo, se procede a la verificación del tipo y la cantidad de material producido. Es necesario adoptar las debidas precauciones en el manejo, ya que se trata en general de material más sensible a la manipulación, con tendencia a una rápida deshidratación si no se conserva bajo condiciones ambientales adecuadas. Si fuese necesario, se indicaría el tratamiento inicial más idóneo (ej. empleo de fungicidas, eliminación de la parte basal de los esquejes con hojas, tiempo y condiciones de conservación para la formación de callos en algunos esquejes, etc.), recogiendo en la ficha los procedimientos adecuados para la conservación que deben realizarse sobre el material. También debería indicarse el número de muestras producidas, por ejemplo cuántos esquejes han sido preparados, y cuántos de ellos son viables. Finalmente, se entrega a cada muestra producida un código, indicando para cada uno la localización y las técnicas utilizadas para su plantación.

Los bancos de esporas del suelo

Los helechos son unas plantas que se dispersan generalmente a través de la producción de enormes cantidades de pequeñas diásporas, las esporas, que son transportadas mayoritariamente por el viento. Aunque la dispersión de las esporas es anemófila (TUOMISTO & *al.*, 2003), muchas de éstas suelen caer en las zonas próximas a sus progenitores (dispersión leptocúrtica, WOLF & *al.*, 2001), ayudando así a conservar el pool genético de la población de la que provienen. Estas esporas al depositarse en el suelo permanecerán en estado latente hasta que las condiciones de humedad, luz y temperatura sean las óptimas para poder germinar.

Desde hace prácticamente dos décadas se conoce la existencia de los bancos de esporas naturales en el suelo, y del papel tan importante que juegan en la regeneración y establecimiento de las poblaciones de helechos (HAMILTON, 1988; SCHNELLER, 1988; LINDSAY & DYER, 1990; SCHNELLER & *al.*, 1990; DYER & LINDSAY, 1992; LINDSAY & *al.*, 1992A).

Los bancos de esporas del suelo naturales tienen un potencial considerable como fuente de material para la conservación (DYER, 1994). Además, incluso aún siendo las muestras de suelo pequeñas, éstas recogen una diversidad genética que puede dar lugar a un elevado número de esporofitos genéticamente diferentes (SCHNELLER, 1998). Diversos trabajos constatan su posible uso para la obtención y propagación de los helechos que habitan en los ecosistemas donde son recogidas, aunque no siempre haya sido posible propagar o determinar todas las especies presentes en esos territorios (SIMABUKURO & *al.*, 1998, 1999; BALLESTEROS & *al.*, 2002).

El banco de esporas del suelo es de interés por su potencial como recurso para la restauración *in situ* de poblaciones en peligro crítico o incluso extintas (SIMABUKURO & *al.*, 1999). Un ejemplo de su efectividad lo podemos encontrar en el trabajo de ESTRELLES & *al.* (2001), donde se pudo propagar con éxito la especie *Marsilea quadrifolia* L. tras la localización de los esporocarpos que aún se conservaban en el banco del suelo de zonas que antaño había habitado. Otro importante trabajo, donde se ha conseguido recuperar a partir de las esporas obtenidas de muestras de suelo una especie incluida el catálogo nacional de flora amenazada, fue el realizado por la Junta de Andalucía con *Christella dentata* (Forsskal) Brownsey & Jermy en sus poblaciones ya extintas del Parque Natural de los Alcornocales (RODRÍGUEZ-HIRALDO & *al.*, 2006).

La idea de una conservación de las esporas en estado hidratado y en oscuridad, como ocurre en el banco de esporas del suelo, es la que dio pie a la metodología de conservación húmeda para las esporas (LINDSAY & *al.*, 1992B), desarrollada en trabajos como el de QUINTANILLA & *al.* (2002) para especies protegidas a nivel mundial como *Culcita macrocarpa* C. Presl. y *Woodwardia radicans* (L.) Sm., y las especies del género *Dryopteris*: *D. corleyi* Fraser-Jenk., *D. guanchica* Gibby & Jermy y *D. aemula* (Aiton) Kuntze, incluidas como vulnerables en la Lista Roja de la Flora Vasculare Española (VV.AA., 2000).

Atendiendo a estas experiencias de conservación húmeda de las esporas, y a las propias de los investigadores y gestores presentes en el "I Taller de Conservación de Helechos" realizado en Diciembre de 2006 en el Jardín Botánico El Aljibe (Alcalá de los Gazules, Cádiz), se podría deducir de las conclusiones que muestras de bancos de esporas de suelo podrían ser



foto A. Bueno

Culcita macrocarpa C. Presl.

foto A. Bueno

Dryopteris corleyi.

recolectadas y almacenadas en bancos de germoplasma (en oscuridad y a 4°C) para la conservación y posterior propagación de las esporas que allí se encontrasen. Por todo ello, los bancos de esporas de suelo además de servir como fuente de material genético *in situ* para su propagación, podrían valorarse como otra forma de recolectar y conservar *ex situ* esporas en condiciones de almacenado húmedo en los bancos de germoplasma. Es una alternativa natural a tener en cuenta.

5. Tratamiento del germoplasma antes de su conservación

En este capítulo se resumen los procedimientos estándar elaborados por una buena parte de los bancos de germoplasma europeos dedicados a plantas silvestres, en relación con el tratamiento del germoplasma que ingresa en el banco, y de cara a optimizar su conservación *ex situ*. Los protocolos que se detallan se basan principalmente en el tratamiento de semillas, dado que este material es el que con mayor frecuencia se ha trabajado hasta el momento. Los procedimientos indicados se han recopilado a través de la experiencia madurada por algunos bancos de germoplasma representativos, principalmente los de Cerdeña (BG-SAR, *Centro Conservazione Biodiversità* – CCB), Porquerolles (*Conservatoire Botanique National Méditerranéen*), Kew (*Royal Botanic Gardens, Millenium Seed Bank Project*) y Valencia (CIEF, *Centre d'Investigació i Experiències Forestals* – Generalitat Valenciana), lo que no excluye que se hayan incorporado, como procedimientos complementarios, los desarrollados en otros centros afines.

5.1 Ingreso del germoplasma en el banco

Una vez que el material se encuentra en el banco de germoplasma y se han realizado los controles fitosanitarios necesarios, se procede a la introducción de la información en la base de datos, comprobando si existe la necesidad de adoptar determinadas precauciones en su manipulación. En las dependencias donde se almacena el material, se comprueba la validez e integridad del germoplasma recogido, efectuando la “prueba del corte” en el caso de que no haya sido ya efectuada en el campo (ver apartado 4.1.3) y determinando el porcentaje de semillas frescas.

El registro de las entradas de material es una operación rutinaria fundamental para la correcta gestión del germoplasma y para el inicio de todos los procedimientos realizados sobre el material que ingresa en el banco. El banco controla la correspondencia entre la relación de entradas que entrega el recolector y las bolsas con las que se acompaña, anotando las posibles dudas y ausencias de información.

Por tanto, es de fundamental importancia indicar en el registro la siguiente información:

- Nombre del taxón.
- Número de entrada del lote.
- Fecha de ingreso en el banco.
- Calidad de la limpieza de las semillas o el tipo de tratamientos a los que han sido sometidas.
- Procedencia del lote: nombre de la localidad de muestreo y nombre o código del recolector o del centro del que proviene el material.
- Objetivo o proyecto para el cual se ha llevado a cabo la recolección.

El número de entrada puede ser un código alfanumérico. Por ejemplo, en la *Banca del germoplasma delle Alpi Sud-Occidentali, Chiusa Pesio* (Cuneo), se utiliza un código compuesto del siguiente modo:

“NA/06/89”, donde:

- NA es el número de accesión o número de entrada en el banco
- 06 indica el año (2006)
- 89 es un número secuencial que se incrementa cada vez que llega nuevo material.

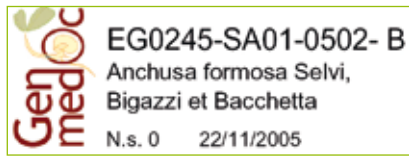


Figura 5.1- Ejemplo de etiqueta automática desarrollada desde la base de datos GENMEDOC.

En el 2007 variará la fecha (07) pero el número final continuará creciendo. De esta manera, se consigue una intuitiva indicación de la procedencia del material, de su antigüedad y de su número identificativo entre todos los demás lotes.

Dentro del proyecto GENMEDOC se ha utilizado la siguiente codificación:

GM 1234 SA01 00/00A,

donde:

- GM = identifica el proyecto para el cuál se ha recogido el lote.
- 1234 = corresponden al código de la unidad taxonómica que se ha recogido.
- SA = identifican el miembro del proyecto.
- 01 = código de la población de la que se ha recogido material.
- 00/00 = dos cifras (año)/dos cifras (número sucesivo de recolección) que identifica la recolección.
- A = una letra para identificar cada muestra producida para su almacenamiento después de su tratamiento.

Así, el código GM0245SA010502 – B (figura 5.1), identifica la muestra B de la recogida número 2 del 2005, realizada en la población 01 “Monte Lattias – Uta (CA)”, por el equipo SARDEGNA, del taxón *Anchusa formosa* Selvi, Bigazzi & Bacch., para el proyecto GENMEDOC.

El número de entrada acompañará siempre al germoplasma al que hace referencia, permitiendo de este modo reconstruir la historia cronológica de dicho material incluso después de realizar el ensayo de germinación, la deshidratación, la congelación, el envío a otros centros o la posible regeneración en vivero o en laboratorios de investigación. Todas las fichas de papel, etiquetas (figura 5.1), informes, análisis de datos o fichas de la base de datos, deberán siempre hacer referencia a este código, que aparecerá en toda la documentación digital, ya que su presencia facilita en gran manera la catalogación y manipulación de los datos. De forma complementaria a estos sistemas, los códigos de barras pueden resultar eficaces para la identificación de las accesiones, por lo que se están ya aplicando en algunas colecciones, como las de la *Banca di Germoplasma Onlus di Palermo* o el *Banco de Germoplasma Vegetal de la Universidad Politécnica de Madrid*.

5.2 Cuarentena

Antes de introducir en las dependencias del banco el material recogido en el campo, se debe respetar un periodo de cuarentena, de tiempo variable, en el que el germoplasma se almacena en un ambiente externo y aislado del banco. Este procedimiento permite valorar el estado fitosanitario del material y determinar la presencia de hongos o parásitos fitófagos o dañinos (figura 5.2). De hecho, no es raro encontrar, incluso en material perfectamente tratado y limpio, semillas que presentan daños u organismos dañinos que pueden estropear el germoplasma.



foto: E. Mattana

Figura 5.2- Semillas parasitadas de *Astragalus nitidiflorus* Jiménez Mun & Pau.

5.3 Pruebas iniciales para la valoración de los lotes de entrada

Si las condiciones del lote lo permiten, se puede realizar una serie de pruebas (germinación, viabilidad, cálculo de la humedad interna, estimación del número y del peso inicial de las semillas, etc.) al material fresco (semillas, frutos, etc.) para recopilar los datos necesarios y poder así planificar su destino, el número de réplicas de las pruebas y el número de semillas por réplica, además de monitorizar la productividad de la población. Los resultados de cada prueba se registran en una ficha específica (figura 5.3), que acompañará a la ficha de limpieza y a toda la documentación relativa al material.

FICHA TEST INICIALES				ID progresivo:	Fecha de ingreso:
N°	Taxon			Operario:	
4	Fecha		Precisión		
5	Número total frutos		Peso fresco de la aceción	#DIV/0! 0	
6	Estado de los frutos		Tipo de fruto capsula		
PESO DE LOS FRUTOS			VOLUMEN DE LOS FRUTOS		
	X: Réplica (n° frutos)	A: Peso tot (g)	B: Peso medio de frutos por réplica	A: Réplica (n° frutos en 100 ml)	B: n° frutos por litro
39	1		#DIV/0!	1	0
40	2		#DIV/0!	2	0
41	3		#DIV/0!	3	0
42	4		#DIV/0!	4	0
43	Peso medio de los frutos		#DIV/0!	Volumen de los frutos 0	
44	Número de frutos por Kg		#DIV/0!	Procedencia	
45	Nota			Nota	

Figura 5.3 – Ejemplo del registro informático de datos iniciales sobre un lote de semillas en una hoja de cálculo.

5.4 Frutos carnosos

La pulpa de los frutos carnosos se debe eliminar manualmente y/o mecánicamente (primera limpieza), preferiblemente en las 48 horas posteriores a la recogida, con agua corriente (figura 5.4) para limitar el desarrollo de micosis y procesos fermentativos que reducirían la capacidad de germinación de las semillas, comprometiendo su viabilidad. En los casos en los que este proceso no se pueda realizar en el tiempo deseado, se debe conservar el material en una cámara frigorífica a temperaturas entre 0° C y 5° C.

Si en el momento de la recolección los frutos se encuentran demasiado deshidratados, antes de quitarles la pulpa se deben sumergir en agua durante un periodo de tiempo comprendido entre unas pocas horas o incluso días, para facilitar la limpieza y separación de las semillas. Después de eliminar la pulpa, las semillas deben de contener sólo impurezas de pequeño tamaño; si no es así, será necesario realizar una segunda limpieza manual (más selectiva que la primera) en un contenedor lleno de agua donde se puedan eliminar hasta los residuos carnosos más pequeños.

El agua en exceso de las semillas se elimina, secándolas durante un periodo de tiempo variable de entre uno y siete días, en función del tipo de semilla y de las condiciones ambientales. Posteriormente se procede a la eliminación manual de los residuos inertes que aún estén presentes y a la deshidratación, siguiendo los procedimientos descritos más adelante para los frutos no carnosos. Cuando las cantidades de material a procesar son grandes, este proceso se puede realizar mecánicamente con máquinas que extraen las semillas de la pulpa.



foto B. Jiménez-Alfaro

Figura 5.4 – Extracción de semillas de *Rosa* sp. mediante lavado de frutos sobre tamices y agua corriente.

5.5 Post-maduración

Se denomina post-maduración al proceso de maduración fisiológica que se desarrolla en las semillas y en los frutos después de haber sido recogidos. Es un proceso necesario para que las semillas inmaduras adquieran la capacidad de germinación (SCHIMDT & JØKER, 2001). De hecho, aunque la recolección se realice con atención, es muy frecuente recoger semillas en diferentes estados de maduración. El periodo de post-maduración tiene como objetivo obtener una muestra homogénea, permitiendo que las semillas aptas lleguen al estado de maduración. Para conseguirlo, se conserva el material temporalmente en recipientes de plástico, cartón, aluminio o acero (figura 5.5) por un periodo variable, desde algunas semanas hasta un máximo de un mes, dependiendo del taxón (se debe eliminar la pulpa en los frutos carnosos). La temperatura ambiental se debe mantener por debajo de 20°C y la humedad relativa por debajo del 40%. Para periodos superiores a un mes, se debe bajar aún más la temperatura. El riesgo que se corre es el de acelerar el proceso de envejecimiento de la muestra, y esto dificultará la posterior interpretación de los ensayos de germinación, a la vez que provocará una reducción en el tiempo de conservación (PROBERT, 2003).

En esta fase se eliminarán las impurezas (ramas secas, hojas o detritos del suelo) del material almacenado, pero sin ser manipulado. De esta manera las semillas no se deshidratan rápidamente; en función de las condiciones de la recogida y del tipo de fruto, se determina el tiempo que debe transcurrir antes de que el germoplasma pueda ser manipulado. El material, distribuido homogéneamente en el fondo de los contenedores, se mezcla cada 2-3 días, para asegurar la uniformidad del tratamiento y favorecer una mejor aireación y la consiguiente deshidratación, cubriendo los contenedores con una malla para impedir la contaminación con semillas de otras muestras.

foto: L. Podda



Figura 5.5- Lotes de semillas en proceso de post-maduración, en las dependencias de la Banca del Germoplasma della Sardegna, BG-SAR.

5.6 Limpieza y manejo del germoplasma

De las semillas que cumplen los requisitos adecuados, se extrae una pequeña cantidad que será testada para estimar el porcentaje de germinación y la validez del material recogido. Los procedimientos de trabajo serán considerados como válidos y las semillas podrán continuar siendo manipuladas, si el porcentaje de germinación es mayor del 50%, excluyendo los casos en los que sea difícil conseguir cantidades suficientes de germoplasma, cuando la población esté en riesgo de extinción o cuando la capacidad de germinación típica de la especie sea muy baja. Los resultados de estos ensayos de germinación no son comparables con los que se realizan con el material ya deshidratado y/o conservado, ya que, en el momento de la recogida, no todas las semillas presentan el mismo estado de maduración (ej. *Fabaceae*) y necesitan un periodo de post-maduración.

La calidad del lote puede ser también estimada a través de observaciones directas (de color, tamaño, presencia de parásitos) o mediante pruebas de viabilidad como la “prueba del corte”, si no ha sido ya realizada en el campo en el momento de la recolección. Además, deben eliminarse las impurezas presentes en las semillas: polvo, residuos resinosos, semillas vacías o abortadas, semillas dañadas por insectos y/o infectadas. Estos trabajos pueden realizarse mecánicamente, manualmente o de ambas formas.

5.6.1 Extracción manual

En muchos casos, el uso de técnicas mecánicas puede dañar las semillas, exponerlas a infecciones fúngicas y deteriorar el tegumento. El trabajo manual, a pesar de ser muy laborioso, casi siempre es imprescindible a la hora de desarticular los frutos o las infrutescencias. Para esta labor generalmente se utiliza una base construida con plástico blando, sobre la que se depositan pequeños trozos de los frutos o inflorescencias. El operario, utilizando un tampón de madera (revestido en su parte inferior con el mismo plástico que la base sobre la que se trabaja), ejerce fuerza de forma más o menos perpendicular al plano de trabajo, para desmenuzar y separar las semillas de otras estructuras de la flor o del fruto, para luego ser cribadas mediante tamices con diferentes mallas (figura 5.6).

En los casos en los que no se pueda desarrollar esta técnica, el trabajo manual se podrá llevar a cabo con utensilios y/o instrumentos de laboratorio (ej. pinzas, agujas, etc.). Cuando las dimensiones de las semillas sean muy pequeñas, incluso microscópicas (ej. *Plumbaginaceae*, *Scrophulariaceae*, *Orchidaceae*), no se pueden separar utilizando estos instrumentos, por lo que se debe recurrir al uso de microscopios estereoscópicos y lupas binoculares.

5.6.2 Extracción en frío

Esta técnica se utiliza con el género *Abies*, *Cedrus* y algunas especies del género *Pinus*, con procedimientos algo particulares para cada especie. Al finalizar la post-maduración, las brácteas de los conos se abren mucho y las semillas pueden ser extraídas con una simple máquina cribadora. Puesto que se trata de especies ricas en resina es necesario esperar a que ésta se seque, antes de utilizar la criba. El paso por la cribadora da lugar a una mezcla de semillas aladas, polvo, escamas rotas, semillas vacías, fragmentos de acículas, pecíolos, pequeñas ramas, etc.,



Figura 5.6. Batería de tamices

de la que se deben seleccionar las semillas limpias. Se obtiene mayor éxito cuando se recogen los conos en el momento en el que las brácteas comienzan a separarse unas de otras (GORIAN, 2001). A veces es necesario realizar algún trabajo de tipo manual, tanto antes como después de efectuar la criba.

5.6.3 Extracción con calor

Este procedimiento se aplica a los géneros *Cupressus* y *Pinus*, con pocas excepciones, aunque también puede ser utilizado en la extracción de las semillas de *Fagus* y *Alnus*. En el caso de las coníferas, los conos bien cerrados y poco resinosos se limpian con máquinas y posteriormente se extienden sobre una superficie de madera para su post-maduración. En esta última fase se mezclan cada cierto tiempo, facilitando su deshidratación mediante corrientes de aire. Transcurrido cierto tiempo, que varía en función de la especie, los conos comienzan a abrirse, momento en que se empieza a aplicar calor mediante hornos, a temperatura y tiempo variables en función de la especie y del contenido en agua de los estróbilos. Para no arriesgar la viabilidad de la especie, la temperatura no debe en ningún caso superar los 50°C (GORIAN, 2001).



foto: E. Mattiana

Figura 5.7- Máquina para la selección gravimétrica de germoplasma utilizada en BG-SAR

Después de la extracción, sigue una fase de selección y limpieza de las semillas para eliminar impurezas como polvo, residuos, semillas vacías o abortadas y semillas dañadas por insectos, que ya no son conservables. Estos procesos pueden realizarse mecánicamente, manualmente o de ambas formas.

5.6.4 Métodos mecánicos

El trabajo con pocas cantidades de semillas normalmente se lleva a cabo con pequeños aparatos en el laboratorio (GORIAN, 2001.). Los más comunes realizan una selección de tipo gravimétrico (figura 5.7), emitiendo un flujo de aire que separa las impurezas de las semillas y las semillas viables de las vacías, estandarizando las semillas por dimensiones y peso.

Cada grupo de semillas necesitará de un número de ciclos directamente proporcional a la homogeneidad del material y al tipo de germoplasma que se está limpiando. Regulando los flujos de aire, en los primeros ciclos se eliminan las impurezas y el polvo y, a continuación, se seleccionan las semillas. Si estas operaciones no se realizan de forma correcta, se puede producir un empobrecimiento genético de la muestra respecto a la población de la que proviene, ya que se podrían perder todas las semillas que, aún siendo viables, no poseen un peso diferente



Figura 5.8 a- Máquina de flujo de aire con cilindro dentado para la separación de semillas utilizado en el CNINGF “El Serranillo”; b- Máquina de flujo de aire para la limpieza de grandes lotes de semillas utilizada en el Banc de Llavors Forestals, CIEF.

respecto al del material de desecho. Al finalizar el trabajo se puede valorar de forma aproximada el porcentaje del material de desecho respecto a las semillas y el rendimiento de la campaña de recolección por cada muestra recogida.

Si se trabaja con cantidades muy grandes de semillas y no es imprescindible un grado muy elevado de limpieza, como por ejemplo en los lotes destinados a la hidrosiembra, se puede recurrir a maquinaria industrial (figura 5.8).

5.6.5 Métodos manuales o mixtos

En algunos casos, las técnicas automatizadas no pueden desarrollar perfectamente el trabajo, por ejemplo cuando el tamaño de las semillas es tan pequeño que es parecido a las dimensiones del polvo o de los tejidos fragmentados o reducidos a polvo. Con este fin, se utiliza una batería de tamices (figura 5.6) con diámetro de malla variable entre 1 cm y 0.1 mm, para ir selectivamente eliminando las impurezas. En los casos más complejos las semillas se separan manualmente ayudándose con pinzas y otros utensilios de laboratorio. El uso combinado de técnicas manuales y mecánicas se utiliza cuando a una primera limpieza manual, más grosera, le sigue una posterior limpieza mecánica y, para finalizar, una tercera limpieza manual muy precisa.

5.7 Cuantificación de las accesiones y análisis del germoplasma

Una vez que ha sido verificado el grado de pureza y el estado de limpieza del material, las semillas se cuentan valorando el peso total de cada lote y el peso medio de una semilla. Para ello se pueden utilizar sistemas de análisis de imagen que permiten cuantificar el peso y el número de semillas presentes en una muestra sin tener que contarlas previamente, siempre que el lote no presente impurezas. Otras observaciones sobre el germoplasma (tegumento, endosperma, cotiledones, embriones, etc.) deben realizarse al microscopio, estereoscopio o negatiscopio, con el fin de poder detectar anomalías o caracteres peculiares del taxón que se analiza.

La humedad interna (*moisture content* o mc %) de las semillas es un dato indispensable para determinar el tiempo y modo de deshidratación para su posterior conservación. El porcentaje de humedad es un factor que determina, en gran medida, la intensidad de la respiración, influyendo así en la velocidad de los procesos metabólicos y por tanto en la longevidad de la semilla. En general este dato (mc %) se obtiene siguiendo los protocolos estándar ISTA y aplicando unas reglas generales de tratamiento de las semillas, que en el caso de plantas cultivadas se basan en los siguientes aspectos (IBPGR, 1982):

- Minimizar el tiempo durante el cual las semillas están expuestas a las condiciones ambientales del laboratorio.
- La determinación se realiza sobre dos réplicas provenientes de muestras previamente mezcladas.
- Para las muestras de semillas muy húmedas puede ser necesaria una deshidratación previa.
- Algunas semillas deben ser molidas o trituradas (ej. *Poaceae* y *Fabaceae*).
- Los contenedores utilizados en el desecado deben ser de vidrio o metal, con tapaderas herméticas que impidan las variaciones de humedad. Antes de utilizarlos se deben secar en la estufa durante una hora a 130° C y colocarlos en un desecador para su enfriamiento.
- Se deben pesar 4,5 – 5 g de semillas por réplica en los contenedores (que se han pesado previamente). Para las muestras con un número muy reducido de semillas, aunque es menos preciso, debería bastar con pesar dos réplicas de 0,5 g cada una.
- Las semillas con elevado contenido en aceites y las semillas de las especies arbóreas se deben secar a temperaturas más bajas para evitar la volatilización de las esencias: 103° ± 2°C durante 17 ± 1 horas (tratamiento a baja temperatura). Las semillas del resto de especies a 130° - 133°C durante una hora (tratamiento a alta temperatura), con la excepción del maíz y otros cereales para los cuales el periodo de exposición es respectivamente de 4 y 2 horas. La desecación debe realizarse en estufas con ventilación forzada. Después de la desecación, los contenedores se cierran y son enfriados en un desecador durante 30 – 45 minutos y repesados.

El contenido de humedad en base húmeda se calcula como la pérdida en peso y se expresa como un porcentaje de una cifra decimal. Si M_1 es el peso del contenedor (con la tapadera), M_2 es el peso del contenedor con las semillas antes de la desecación y M_3 el peso del contenedor con las semillas después de la desecación, el mc % se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{mc \%} = 100 \times (M_2 - M_3) / (M_2 - M_1)$$



fotos: E. Mattana

Figura 5.9. Ejemplos de analizadores electrónicos de humedad o termobalanzas utilizadas en la Banca del Germoplasma della Sardegna, BG-SAR (a) y en el Banc de Llavors Forestals, CIEF (b).

El significado de este parámetro varía en función del estadio fisiológico en el que se encuentran las semillas en el momento del análisis y se utiliza para saber si son aptas para poder ser conservadas o si deben volver a ser deshidratadas.

La humedad presente en las semillas se puede también calcular con determinados instrumentos electrónicos, denominados analizadores de humedad o termobalanzas (figura 5.9), que pesan y deshidratan la muestra mediante una regulación computerizada (SUSZKA & al., 1994; ISTA, 2006). Las réplicas se fragmentan para favorecer la pérdida de agua a través del tegumento y se introducen en el interior del aparato. La temperatura utilizada, que puede ser seleccionada por el operador, generalmente es de 105°C, para evitar la evaporación de sustancias orgánicas como los aceites. El instrumento pesa y calienta las muestras, generalmente mediante radiación infrarroja, y se apaga automáticamente cuando la pérdida de peso se estabiliza (salvo que se haya determinado un tiempo de ejecución).

5.8 Caracterización del germoplasma

La caracterización de germoplasma es una función comúnmente atribuida a los bancos de semillas de plantas cultivadas, que en el caso de especies silvestres debería corresponderse con una actividad de investigación complementaria, de gran utilidad para la conservación, pero que requiere de una infraestructura y recursos no siempre disponibles. Entre los principales factores que condicionan la calidad de las semillas figuran: el patrimonio genético, la edad y el tipo de gestión a la que se ha sometido la planta madre, las condiciones climáticas y fisiológicas de la planta madre durante la formación de la semilla, el grado de madurez en el momento de la recogida, la técnica de recolecta y los métodos de conservación (PIOTTO *et al.*, 2001).

La calidad del germoplasma se puede expresar mediante parámetros que midan el comportamiento de la semilla *in situ* y *ex situ*. Antes de ser conservadas, las semillas deben ser sometidas a pruebas cualitativas, para determinar su capacidad de germinación y viabilidad; existen otras pruebas que caracterizan genéticamente la semilla y otros aspectos importantes de su fisiología que no son evidenciados con las pruebas de germinación. En el presente capítulo no se describen con profundidad estas pruebas, puesto que se detallan perfectamente en trabajos como el *International Rules for Seed Testing* (ISTA, 2006), aunque sí se ponen de manifiesto los aspectos críticos y los objetivos de las diversas pruebas. A continuación se describen los parámetros más estudiados y las pruebas empleadas de manera más general en la valoración de las características cualitativas de las semillas.

5.8.1 Capacidad germinativa

La capacidad germinativa es el porcentaje de semillas germinadas (normales y anómalas). Es considerado el parámetro más útil para valorar un lote de semillas, aunque no explica otros componentes de su calidad. El ISTA define la germinación como el proceso que lleva a las semillas a un estado en el cual su aspecto puede indicar si serán capaces de desarrollarse en una planta normal, siempre que las condiciones ambientales lo permitan (ISTA, 2004). Algunos autores consideran la germinación como el proceso de desarrollo de la planta mediante la emisión de 1 mm de la radícula, límite mínimo para la observación macroscópica de la germinación. La velocidad es un aspecto importante en la germinación, ya que puede proporcionar importante información acerca de la calidad de la semilla, aunque no resulta indicadora de la presencia de posibles taras genéticas, como por ejemplo los fenómenos de introgresión (ej. *Orchidaceae*). En relación con las recomendaciones del ISTA, es necesario tener en cuenta que la disponibilidad de semillas de plantas silvestres es casi siempre inferior a la de los bancos de especies cultivadas (por ejemplo, frente a las 4 (réplicas) x 100 (semillas) recomendadas en los ensayos de germinación, en el caso de plantas raras puede reducirse a 4 x 25 ó 3 x 20, sin disminuir la validez de los resultados).

5.8.2 Pruebas de vigor germinativo

El vigor germinativo de las semillas se define como la suma total de las propiedades que determinan el nivel de actividad y el comportamiento de los lotes durante la germinación en una amplia gama de ambientes (ISTA, 2004). El vigor no se puede medir a través de un solo

parámetro porque es un concepto que agrupa diferentes aspectos del comportamiento de las semillas, como la velocidad y la uniformidad de la germinación y el desarrollo de la plántula; la capacidad de emergencia de la plántula en condiciones desfavorables; o el comportamiento tras la conservación (en particular la capacidad de conservar su poder germinativo inicial). Las semillas vigorosas son potencialmente capaces de tener un comportamiento óptimo en condiciones que no son consideradas como las ideales para la especie a la que pertenece la muestra.

Las diferencias en el vigor germinativo se pueden manifestar en los procesos bioquímicos y en las reacciones que se desarrollan durante la germinación (reacciones enzimáticas, actividad respiratoria, etc.), en la velocidad y uniformidad de emergencia de las plántulas, en el crecimiento durante el desarrollo y después de ser trasplantada y en la capacidad de germinación en condiciones ambientales desfavorables. El grado de vigor puede condicionar también el crecimiento de las plantas adultas, su fructificación y producción. La definición de vigor hace referencia a la semilla y al comportamiento inicial de la plántula, pero no considera la posible dormición y la composición genética. Las pruebas que se basan en aspectos específicos del comportamiento de la semilla durante la germinación, como la prueba del envejecimiento acelerado, el *cold-test* (PIOTTO & al., 2001) y la prueba de la conductividad, generalmente son empleadas para la valoración de determinados componentes específicos del vigor (PIOTTO & al., 2001; ELIAS & al., 2006).

5.8.3 Viabilidad

Se considera que una semilla es viable cuando presenta las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas fundamentales para su germinación. La pérdida de viabilidad generalmente viene acompañada de la reducción de la capacidad respiratoria, del contenido de ácidos grasos insaturados, de lípidos de membrana, de actividad enzimática y del contenido de ARNm. Las pruebas para determinar la viabilidad sólo dan una estimación de la calidad de las semillas (indicando si la semilla está “viva” o no), pero son muy rápidos (24 / 28 horas) en relación a las pruebas de germinación.

La viabilidad no debe ser confundida con la capacidad germinativa, de hecho las semillas viables durmientes no necesariamente germinan. Aunque erróneamente utilizados como sinónimo de viabilidad, los ensayos de germinación nos permiten cuantificar la capacidad germinativa de los lotes de semillas analizados, pero poco o nada nos aportan sobre las semillas que no han germinado. La utilización paralela de ensayos de germinación (incluyendo pruebas para romper la dormición, ver capítulo 7) y de ensayos de viabilidad nos aporta información más fiable sobre el estado de las semillas que pretendemos conservar o estamos conservando.

Principalmente se utilizan 4 métodos para analizar la viabilidad (FREELAND, 1976): (1) tetrazólio; (2) catalasa; (3) sustancias reductoras; (4) electrolitos. Los dos primeros son los más fáciles de ejecutar en cualquier laboratorio y no representan costes elevados siendo por ello los más generalizados y los que desarrollamos en este apartado.



Figura 5.10: Resultados de la coloración por tetrazólio en semillas de *Narcissus cavanillesii* A. Barra. & G. López. (a) Control positivo: semillas recientes con un mes; (b) Semillas estudiadas, con 5 meses; (c) Control negativo: semillas muertas.

Prueba del tetrazolio

La prueba del tetrazolio es una prueba 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. La utilización de tetrazolio permite obtener una medida directa de la actividad mitocondrial. Los enzimas celulares (deshidrogenasas situadas en las mitocondrias) reducen las sales incoloras del tetrazolio a formosán, una sustancia de color rosa-rojizo. La intensidad del color producida está directamente relacionada con la actividad deshidrogenasa de las mitocondrias de cada célula, de esta forma los tejidos muertos ya no presentan esta actividad y por lo tanto no se tiñen.

Esta prueba colorimétrica es utilizada cuando existe la necesidad de determinar en poco tiempo la viabilidad del lote o cuando se debe comprobar la viabilidad de las semillas después de un ensayo de germinación que no ha producido resultados satisfactorios. También se realiza cuando se trabaja con semillas de taxones que presentan una profunda dormición o un periodo de germinación muy largo. La coloración final tras la prueba puede variar desde un tono de rojo más o menos marcado para los tejidos sanos y viables, hasta la ausencia de color para los tejidos muertos o dañados que no se tiñen. La prueba del tetrazolio tiende a sobrestimar la viabilidad aproximadamente un 10% por encima del valor que se obtiene con las pruebas de germinación (PIOTTO *et al.*, 2001).

En general se recomienda embeber las semillas 24 horas antes del ensayo. Únicamente después de que las semillas estén embebidas, se realiza un corte longitudinal y posteriormente se sumergen en una solución del 1% de tetrazolio. Para facilitar la penetración del tetrazolio en los tejidos puede utilizarse una bomba de vacío. Los embriones que se tiñen corresponden a semillas vivas mientras que los que no se tiñen a semillas muertas, si bien debe tenerse en cuenta que una mala manipulación de la semilla puede provocar un daño en el tejido, impidiendo la tinción. Por tratarse de un ensayo de observación morfológica, esta prueba presenta algunos aspectos de carácter subjetivo, por lo que debe ser realizado de forma muy minuciosa y por personal experimentado. Por otro lado, el hecho de ser un ensayo basado en el cambio de color provoca muchas veces dudas sobre el resultado obtenido, dado que se pueden teñir otros teji-

dos diferentes del embrión, como el endospermo. Debe tenerse presente, además, la variabilidad en la reacción de las distintas especies, debida principalmente al color de los tejidos típico de cada taxón (blanco, marfil, etc). Este tipo de ensayo es ideal para semillas grandes como las alubias o el maíz, pero en semillas pequeñas el factor subjetivo puede ser mayor. Para intentar eliminar este problema se utilizan muestras de control: (1) control positivo: semillas recogidas recientemente y (2) control negativo: semillas muertas en una estufa durante 24h a 150°C. La comparación de la muestra estudiada con los 2 controles permite eliminar una buena parte de subjetividad (figura 5.10).

Ensayo de la catalasa

Al contrario que en el análisis anterior, cuyas semillas viables o no viables pueden ser cuantificadas, el ensayo de la catalasa es un análisis cualitativo que distingue lotes de semillas viables de lotes de semillas no viables. Una muestra determinada de peso conocido (generalmente se utiliza un peso de 1 g en el caso de semillas pequeñas) se sumerge en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 hora para eliminar cualquier microorganismo. Posteriormente se lava la muestra con agua destilada y se dejan embeber durante 6 horas, añadiendo posteriormente una gota de peróxido de hidrógeno de 20 volúmenes de concentración y se determina la concentración de peróxido con ayuda de una etiqueta indicadora de peróxido. Estas mediciones se efectúan cada 6 horas anotándose la concentración de peróxido. Las mediciones se realizan hasta que no se produzcan alteraciones de concentración indicando que todo el peróxido se ha reducido. Generalmente (para muestras de 1 g), en lotes viables el peróxido se reduce en 6-12 horas mientras que en lotes no viables no se elimina el peróxido, incluso después de 18- 24 horas.

Índigo-carmin

El índigo-carmin es una prueba colorimétrica que se utiliza en algunos países como alternativa al tetrazolio, por ser más económico y de metodología relativamente sencilla. Se trata de un procedimiento que usa una solución de dextrosa y de hidróxido de sodio. Se necesita eliminar los tegumentos de las semillas después de dejarlas embebidas en agua destilada durante 24 horas. A continuación se extraen los embriones y se introducen, en función de la especie, durante 1 – 2 horas en una solución de índigo-carmin diluido al 1/2000, a 20°C, en oscuridad; pasado este tiempo, se examinan. Los tejidos muertos se colorean de azul, mientras que los tejidos vivos no se colorean (SUSZKA *et al.*, 1994).

Solución de Lugol

Es una solución de yoduro de potasio y de yodo. El colorante reacciona con el almidón provocando el paso al azul de los tejidos del embrión que contienen almidón por lo que, presumiblemente, son viables.

Prueba de conductividad

Se trata de una prueba que valora la integridad de los tejidos y de las membranas celulares, e indirectamente la calidad. Las semillas con la membrana dañada, en imbibición sufren una

pérdida del contenido celular (iones, carbohidratos, etc.) que modifica las características de la solución en la que están inmersas, lo que aporta una medida de la conductividad eléctrica. La ventaja de esta prueba, puesta a punto para un número limitado de especies, es la rapidez y simplicidad en su ejecución (PIOTTO *et al.*, 2001).

Prueba con diacetato de fluoresceína

Es una prueba colorimétrica para la estimación rápida de la viabilidad de las semillas. Se utiliza también para determinar la viabilidad del polen, raíces de árboles, cultivos meristemáticos y semillas de *Orchidaceae*. El diacetato de fluoresceína penetra rápidamente en el interior de las células viables con membranas íntegras; este compuesto es transformado por esterasas en un producto fluorescente que se difunde dentro de las células. Utilizando un microscopio de fluorescencia, con fuentes especiales de luz y filtros, es posible cuantificar los embriones y tejidos viables además de los que estén dañados (PIOTTO *et al.*, 2001).

Análisis radiográfico

Es una técnica que ofrece información bastante precisa acerca del desarrollo del embrión y el grado de maduración de la semilla, además de la posible presencia de larvas u otros patógenos. La radiografía es un método de investigación no destructivo, que resulta muy útil para el germoplasma de plantas de las que se dispone de poco material o que estén en peligro de extinción. Es un método muy utilizado para las semillas de las coníferas. Puesto que el coste de los instrumentos necesarios es relativamente elevado y que deben de tomarse ciertas precauciones, actualmente su uso está bastante restringido (SUSZKA *et al.*, 1994; MARTÍN *et al.*, 1998; GUDIN *et al.*, 1992; TERRY *et al.*, 2003).

Resonancia magnética

En algunos casos, los resultados obtenidos con la radiografía no reflejan fielmente la calidad de los tejidos, sobre todo cuando se valoran semillas completamente embebidas. Los tejidos viables embebidos pueden confundirse con los que no lo son, así que es mucho más fácil distinguirlos cuando la cantidad de humedad de las semillas es reducida. La resonancia magnética es una técnica no destructiva que ofrece imágenes de protones (H^+) unidos al agua de los tejidos y a las cadenas de ácidos grasos. De esta manera, permite seguir el movimiento de los metabolitos resultando particularmente útil para valoraciones relativas a la fisiología de la semilla. Utilizando ciertos programas informáticos se pueden obtener imágenes de alta resolución para el estudio de la estructura y de la distribución de los lípidos en las semillas (PIOTTO *et al.*, 2001).

5.8.4 Análisis de imagen

El germoplasma puede ser caracterizado a través de parámetros cualitativos como la forma, las dimensiones y el color. Estos parámetros son difícilmente mesurables, tanto que en algún caso tan solo es posible una estimación, más que una medida exacta y objetiva. Las características espaciales (dimensiones) de las semillas son por norma estimadas manualmente, con

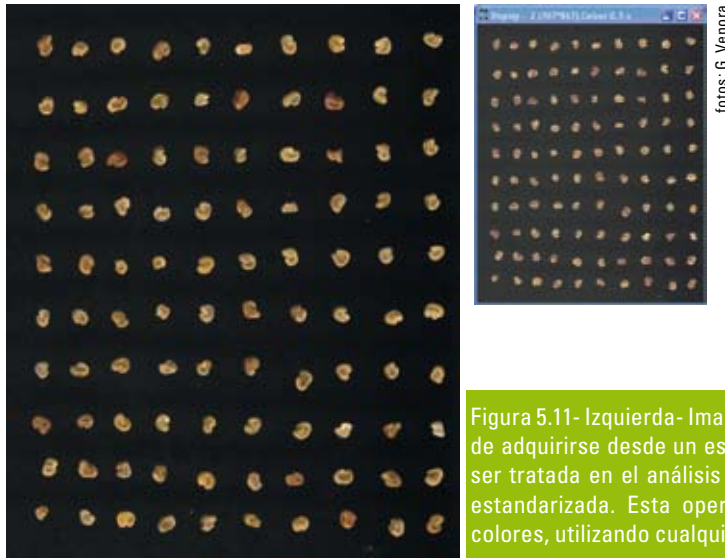


Figura 5.11- Izquierda- Imagen original. Esta imagen puede adquirirse desde un escáner remoto para más tarde ser tratada en el análisis de imagen; derecha- Imagen estandarizada. Esta operación permite uniformar los colores, utilizando cualquier tipo de escáner.

gran gasto de tiempo. El color es en muchos casos definido a partir de una estimación intuitiva del observador, confrontando colores estándar mediante tablas fotográficas de referencia, de las cuales es posible llegar a definir valores correspondientes de RGB (*Red*- rojo, *Green*- verde, *Blue*- azul) o HLS (*Hue*- tonalidad, *Lightness*- luminosidad, *Saturation* - saturación) (FAGUNDEZ & IZCO, 2003). Dicho método resulta subjetivo y no reproducible. De hecho, dos personas pueden atribuir colores diferentes a la misma muestra, y una misma persona puede asignar colores diferentes en diferentes momentos. Por otro lado, a menudo no se llega a estimar pequeñas diferencias existentes entre semillas de una misma muestra. También la forma suele ser definida de manera visual, no pudiendo obtener así valores objetivos.

Las limitaciones recién expuestas en relación con el estudio morfo-colorimétrico de las semillas pueden ser ampliamente superadas con mediciones reales y objetivas tanto de las dimensiones como de la forma y el color. De hecho, actualmente se dispone de métodos, no destructivos y veloces, basados en la tecnología de análisis de imagen (VENORA & al., 2007A,B). A continuación se muestra un ejemplo de aplicación de la tecnología de análisis de imagen para la caracterización morfo-colorimétrica de semillas y posterior clasificación estadística. La validación de esta herramienta ha sido realizada sobre diversas accesiones de judías y lentejas cultivadas (VENORA & al., 2007A,B). Las imágenes de las semillas que se desea analizar son adquiridas mediante un escáner plano adecuadamente estandarizado (figuras 5.11 y 5.12). A continuación o al mismo tiempo, las imágenes son tratadas mediante una función Macro, debidamente desarrollada en lenguaje KS400 (Sistema de análisis de imagen de Zeiss), con la cual es posible medir los siguientes parámetros:

- área
- perímetro
- diámetro máximo

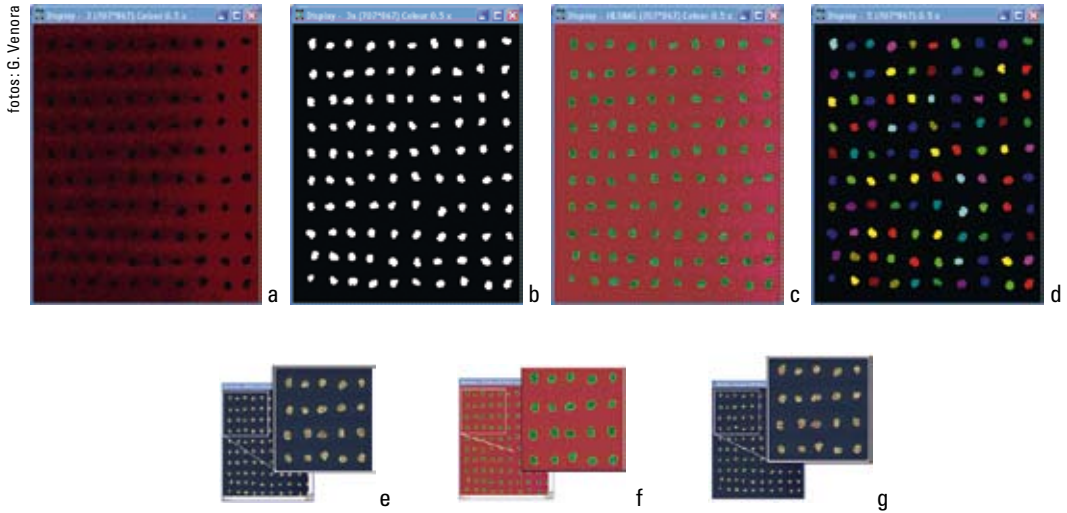


Figura 5.12

- a. Imagen contrastada. Sirve para delimitar con claridad el contorno de los objetos que deben ser medidos;
- b. Imagen segmentada. Es el resultado de la separación de las muestras respecto al fondo, y representa la imagen que servirá de referencia o plantilla para distinguir los objetos de interés;
- c. Imagen en HLS. Creada a partir de la imagen estandarizada para convertir los colores del modelo RGB (*Red, Green, Blue* = rojo, verde, azul) al modelo HLS (*Hue, Lighness, Saturation* = tono, brillo, saturación), obteniendo una imagen sobre la cual es posible medir otros tres parámetros colorimétricos;
- d. Imagen con las muestras identificadas. Esta imagen tiene el objetivo de confirmar visualmente que todas las muestras a analizar han sido discriminadas, y que dos o más objetos no hayan sido identificados como una sola semilla;
- e. Imagen para la medida de los parámetros morfométricos. Permite la selección interactiva de los objetos a los cuales realizar mediciones de forma y dimensión;
- f. Imagen de medida. Permite seleccionar de modo interactivo los objetos a los que realizar medidas colorimétricas;
- g. Imagen numerada. Esta es la imagen que permanece al terminar el análisis, con los números que indican el orden seguido por el sistema para la medición de cada objeto. Esto permite establecer correlaciones entre otras características de las semillas (capacidad germinativa, vitalidad) y las medidas realizadas en el análisis de imagen.


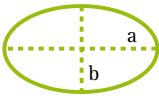
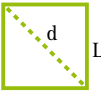
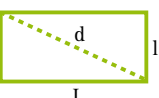
		Forma	Redondez	Radio
	$r=x$	1	1	1
	$a=6$ $b=4$	0.67	0.67	0.67
	$L=2$ $d=2.828$	0.785	0.64	0.71
	$L=5$ $l=2$ $d=5.385$	0.16	0.44	0.37

Figura 5.13- Parámetros morfométricos aplicados a la forma, redondez y radio de las semillas.

- diámetro mínimo
- forma
- redondez
- relación entre diámetros

La forma se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Forma} = \frac{4 \times \pi \times \text{Area}}{\text{Perímetro}^2}$$

Este factor incluye valores comprendidos ente 0 y 1, donde 1 es el índice de perfecta homogeneidad de forma.

La redondez viene dado por la siguiente fórmula:

$$\text{Redondez} = \frac{4 \times \text{Area}}{\pi \times \text{Diámetro}_{\max}^2}$$

Este factor incluye valores que van de 0 a 1, donde 1 es el índice de perfecta circularidad.

La relación ente diámetros (m/M) es el valor del aspecto, es decir, la relación entre el diámetro menor y mayor, según la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Diámetro}_{\min}}{\text{Diámetro}_{\max}}$$

También en este caso los valores varían de 0 a 1, donde el 1 indica que los dos diámetros son idénticos.

En la figura 5.19 se muestran algunos ejemplos de los valores de estos tres factores en relación a cuatro diferentes formas geométricas. En cuanto a los parámetros colorimétricos, los valores de R, G, B y H, L, S (modelos de colores) indican respectivamente el valor medio de los canales rojo, verde, azul, así como la tonalidad, luminosidad y saturación del objeto examinado, expresándose en una escala de gris con valores que van de 0 (negro) a 255 (blanco). Si las semillas presentan manchas u ornamentos en el tegumento, es posible determinar el área media ocupada por ellos, el número de manchas por semilla y el área porcentual ocupada en cada semilla. El área ocupada por las manchas es un parámetro que indica la superficie total de estos ornamentos en cada objeto, expresada en mm². En cuanto a los parámetros colorimétricos, en presencia de manchas u ornamentos en la semilla, puede distinguirse el color del fondo (color dominante > 50%) y el color de las manchas.

Los datos originales así obtenidos son integrados, para cada una de las imágenes, en una tabla u hoja de cálculo, pudiendo considerarse como características intrínsecas a las semillas, o bien ser utilizadas para la definición de procesos estadísticos de clasificación (VENORA & al., 2007A,B; BACCHETTA & al., 2008; MATTANA & AL., 2008). En las figuras 5.10 a 5.18 se muestra la secuencia de imágenes elaboradas, según son utilizadas para efectuar las mediciones morfológicas y colorimétricas de las semillas, utilizando como ejemplo una imagen de *Astragalus verrucosus* Moris, cuyas semillas no presentan ornamentos.

5.9 Desecado

5.9.1 Tolerancia a la deshidratación y categorías de conservación

Las semillas pueden ser clasificadas en dos categorías principales en base a su respuesta frente a la deshidratación y a su comportamiento durante la conservación. El primer grupo, definido como semillas “ortodoxas”, son aquellas cuya conservación depende esencialmente del contenido de humedad y de la temperatura. Este grupo de semillas pueden ser sometidas sin problemas a bajos valores de humedad (incluso a niveles muy inferiores a los que se alcanzan en condiciones naturales); su longevidad aumenta al disminuir la temperatura y el contenido en humedad, y puede ser calculada mediante la ecuación de viabilidad de las semillas (ROBERTS, 1973; ELLIS & ROBERTS, 1980; ELLIS, 1988; PRITCHARD & DICKIE, 2003). Actualmente las semillas ortodoxas son también denominadas como “tolerantes a la deshidratación”. Pertenecen a este grupo la mayor parte de las semillas de climas templados y mediterráneos (HONG & *al.*, 1998). Las posibles alteraciones a que se pueden ver sometidas las semillas ortodoxas durante la conservación se muestran en la Tabla 7.

Contenido de humedad	Posibles alteraciones durante la conservación
Inferior al 5%	Oxidación de lípidos
Entre 5 y 6%	Prácticamente ninguna (nivel óptimo para la conservación de semillas de numerosas especies)
Entre 10 y 18%	Marcado desarrollo de la actividad de criptógamas
Superior al 18%	Aumento de la respiración
Superior al 30%	Germinación de semillas no durmientes

Tabla 7. Comportamientos de las semillas ortodoxas durante la conservación a bajas temperaturas, en función del contenido de humedad.

La tolerancia a la desecación está ligada a las propiedades del protoplasma celular. 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. Además, deben poner en marcha, durante la fase de rehidratación, los mecanismos necesarios para la posible reparación de los tejidos (BLACK & PRITCHARD, 2002). De forma específica, algunos de los mecanismos que permiten la desecación están relacionados con la capacidad de simplificar las estructuras intracelulares (en particular las mitocondrias), la capacidad de inhibir la actividad metabólica, la eficiencia de los sistemas antioxidantes, la facultad de elaborar las proteínas de la membrana celular (proteínas LEA), la existencia de proteínas hidrófobas que rodean los cuerpos grasos e impiden que se aglomeren durante la deshidratación y la capacidad de vitrificar durante la deshidratación algunas sustancias como los azúcares (BERJAK & PAMMENTER, 2002).

El segundo grupo, el de las semillas “recalcitrantes”, también llamadas “sensibles a la deshidratación”, agrupa a las semillas que no toleran una deshidratación significativa respecto al contenido de humedad presente en el momento de la diseminación (en general variable entre un 20% y un 70%, aunque más frecuentemente entre el 30% y 50%). Estas semillas no pueden conservarse con altos niveles de humedad porque tienden a germinar en poco tiempo, ni pueden mantenerse a temperaturas inferiores a 0° C, ya que los tejidos sufrirían daños por congelación del agua contenida en ellas. Para la conservación de este tipo de semillas se están desarrollando técnicas alternativas que prevén la criopreservación en nitrógeno líquido de los embriones, estructuras muy pequeñas bastante resistentes a la desecación y relativamente uniformes en dimensiones y contenido en humedad y, por tanto, en grado de ser sometidas a una deshidratación “crioprotectora” controlada. Se han realizado varios experimentos con éxito con varias especies de los géneros *Quercus*, *Arthocarpus*, *Calamus*, *Elaeis*, *Hevea*, *Nephelium* y *Shorea*. Las semillas recalcitrantes acumulan un mayor número de reservas (razón por la que presentan un mayor peso y dimensiones), y generalmente un mayor contenido en humedad. El porcentaje de agua en el momento de la dispersión es un buen índice de la aptitud para la conservación: un valor elevado caracteriza las semillas de difícil conservación.

Si se considera el comportamiento de las semillas durante la conservación (prácticamente la respuesta a la deshidratación), el 7% de las casi 7000 especies estudiadas hasta la actualidad, pertenecientes a 65 familias, presentan semillas recalcitrantes (HONG & al., 1998). Por falta de mayor información sobre el conjunto de la flora mundial, especialmente en áreas tropicales, esta cifra está destinada a aumentar. Son recalcitrantes las semillas de muchas plantas tropicales (coco, mango, aguacate, cacao, etc.) e importantes especies arbóreas de regiones templadas y mediterráneas (ej. *Quercus*, *Castanea*). Entre las semillas más sensibles a la deshidratación se encuentran las consideradas “vivíparas” ya que inician la germinación cuando todavía se encuentran en la planta madre (o simultáneamente a la dispersión), como ocurre en algunas plantas acuáticas de gran importancia ecológica, como el manglar. *Fagaceae*, *Moraceae*, *Sapotaceae* y *Lauraceae* son familias con un número elevado de especies con semillas sensibles a la deshidratación. De todo lo expuesto, se evidencia que las especies con semillas recalcitrantes no forman banco de semillas en el suelo, característica ligada únicamente a las especies con semillas ortodoxas.

Una tercera categoría es la de las “semillas intermedias” (DICKIE & PRITCHARD, 2002) que agrupa las semillas que soportan mejor la deshidratación que las recalcitrantes, pero peor en comparación con las ortodoxas. En este caso, las semillas parcialmente deshidratadas no toleran el estrés producido por bajas temperaturas (inferiores a 0°C), pero se comportan mejor si son expuestas a temperaturas más benignas (en torno a los 15°C). En general, esta tipología de semillas tolera una deshidratación hasta valores de humedad comprendidos entre el 10% y el 20% (HONG & al., 1998).

Hay que considerar que la identificación de las categorías descritas ayuda en la gestión del germoplasma, pero que no son rígidas; de hecho, existe un *continuum* de condiciones entre las semillas más ortodoxas y las más recalcitrantes. Como ejemplo de variabilidad, sirva comentar que las semillas de tomate se pueden conservar durante más de 25 años (a -18°C y 5% contenido de humedad), mientras que las de la planta del té (*Camellia sinensis* Kuntza) permanecen



Fotos: E. Mattana



Figura 5.20. Equipamiento para la deshidratación del BG-SAR: medidor con los valores ambientales de humedad relativa y temperatura (a), deshumidificador químico (b) y material almacenado (c).

viables sólo durante 2-8 semanas (WALTERS, 2004). A pesar de que existe una tendencia de los bancos de germoplasma a unificar los criterios de trabajo, los protocolos aplicados para definir las categorías de las semillas no son aún lo bastante homogéneos. Esto puede dar lugar a que una misma especie sea considerada como recalcitrante por algunos y ortodoxa o intermedia por otros. Además es frecuente que, para una determinada especie con semillas recalcitrantes, la tolerancia a la desecación sea más elevada en las poblaciones que se desarrollan en las zonas menos húmedas de su área de distribución.

A escala global, la gestión de los recursos genéticos de las especies de zonas tropicales húmedas es uno de los problemas más complejos. En este ámbito, la difícil conservación y la limitada longevidad de las semillas de algunas especies son los factores que producen mayor preocupación. La rápida caducidad de las semillas de algunas especies ha sido ya documentada desde el siglo VI d.C., cuando un científico chino se refiere a la mejor forma de conservar las castañas (probablemente *Castanea mollissima* Blume). Desde los años 70 se han desarrollado profundas investigaciones en relación a la conservación de las semillas recalcitrantes de algunas *Fagaceae* de importancia tanto ecológica como económica en Europa, además de muchos estudios sobre semillas no tolerantes a la desecación (SUSZKA & al., 1994; PIOTTO & AMADEI, 2004; BLACK & PRITCHARD, 2002). Lamentablemente, el conocimiento y la tecnología hoy dis-

ponibles no permiten aún programar afinadamente la conservación y gestión de los recursos genéticos ligados a especies con semillas muy perecederas.

5.9.2 Cámaras de desecado

La disminución de la humedad de las muestras de semillas se puede realizar de diferentes formas, mediante la exposición al aire en ambientes secos, ventilados y sombríos. Los bancos de germoplasma generalmente utilizan cámaras de deshidratación que, aunque son bastante costosas, producen óptimos resultados. El material destinado a la deshidratación se almacena en una cámara (figura 5.20) que, mediante deshumidificadores y aire acondicionado, mantienen valores de humedad relativa del 10-15% y temperaturas entre los 10° C y 25° C (FAO/IPGRI, 1994), para evitar que los tegumentos seminales sufran bruscas fracturas y/o arrugamientos. Este tratamiento tiene una duración variable en función de las características de las semillas y puede oscilar entre 30 y 180 días. Es importante que los lugares donde se realiza la desecación permitan una buena circulación de aire, garantizando 10 recambios de aire por hora (IPGRI, 1982). Otra alternativa, más económica e igualmente eficiente, es la utilización de cámaras, generalmente de metacrilato, con gel de sílice en su interior, el cual se recambia periódicamente.

Los lotes se someten a la deshidratación dentro de sobres de papel, sacos de tejido transpirable o bandejas y son pesados regularmente para monitorizar la disminución de peso; si W_f es el peso que corresponde al $5\pm 1\%$ de contenido de humedad interna (o *moisture content*) final (mc_f), y W_o es el peso de la accesión al inicio de la deshidratación, se puede determinar el peso final (peso objetivo) que debe de alcanzar la accesión al terminar el proceso, según la fórmula siguiente (IBPGR, 1982):

$$W_f = W_o \times (100 - mc_o) / (100 - mc_f)$$

con $mc_o = \% mc$ al inicio; y $mc_f = 5\pm 1\%$

En cada momento es posible verificar el contenido en humedad de la accesión (mc_f) con la fórmula inversa:

$$mc_f = 100 - [(W_o / W_f) \times (100 - mc_o)]$$

con mc_f y $W_f = mc \%$, peso de la accesión en el momento de ser pesado.

Una vez que se ha comprobado que el contenido de humedad esté comprendido entre el 3,5% (para las semillas con un alto contenido en aceites) y el 6,5% (para las semillas con bajo contenido en aceites), estos valores de $mc\%$ corresponden a una humedad relativa al equilibrio (ERH) del 15% a 15°C (LININGTON, 2003) y las semillas están preparadas para la conservación a largo plazo a bajas temperaturas (ROBERTS, 1973; ELLIS & ROBERTS, 1980), generalmente mediante congelación a temperaturas por debajo de los -18° C (FAO/IPGRI, 1994). Además, las semillas pueden ser conservadas en cámaras frigoríficas a temperaturas entre -5°C y 5°C.

En los últimos tiempos se está desarrollando un método alternativo para controlar la humedad interna de las semillas durante la deshidratación, el cual presenta una enorme ventaja frente al cálculo del $mc\%$, ya que no es destructivo y se basa en la determinación de un parámetro denominado “actividad del agua” (a_w , activity water) que, en una escala del 0 al 1, representa la humedad relativa medida en condiciones de equilibrio (ERH) entre el contenido de agua en el interior de la semilla y el ambiente (figura 5.21).



foto G. Bacchetta

Figura 5.21- Instrumentos para la medición de la actividad del agua (a_w) y humedad relativa en equilibrio utilizado en el *Mediterranean Agronomic Institute of Chania*. (Creta).

Los valores de a_w y de mc% se correlacionan mediante una curva isoterma (PROBERT, 2003) que varía en función de la composición de la semilla y de la temperatura. Por este motivo, la exacta correlación entre ambos parámetros sólo se puede determinar empíricamente muestreando los dos valores para cada tipo de semillas. La determinación de a_w , y por tanto de ERH, por sí misma representa una medida bastante ajustada para valorar, aunque de forma indirecta, el contenido de agua en las semillas.

5.9.3 Desecantes artificiales

También se puede conseguir la deshidratación de las semillas utilizando desecantes artificiales como el gel de sílice, (figura 5.22) poniéndolo en contacto con las semillas dentro de contenedores herméticos. Con su poder de absorción este compuesto disminuye el contenido de humedad interna de los lotes de semillas hasta valores que garantizan su conservación a medio y largo plazo (PROBERT, 2003). La cantidad de desecante que se debe usar varía en función de la composición de las semillas, de la cantidad de material y, sobre todo, de su contenido en aceites (ver capítulo 6).

foto: E. Mattana



Figura 5.22- Ejemplos de diferentes tipos de gel de sílice autoindicadores presentes en el mercado.

Protocolo de tratamiento de semillas en BG SAR (Cerdeña, Italia)

El Banco de Germoplasma de Cerdeña (BG-SAR)

El proyecto de creación del Banco de Germoplasma de Cerdeña (*Banca del Germoplasma della Sardegna, BG-SAR*) se inició en el año 1997, como una iniciativa del Departamento de Botánica de la Universidad de Cagliari y la administración provincial de la capital de Cerdeña, y con la subvención del MIUR (*Ministerio dell'Università e della Ricerca*) en el año 2003, para la adquisición de la infraestructura técnica necesaria. (MATTANA & al., 2005). La actividad del Banco se encuadra en el seno del programa del CCB (*Centro Conservazione Biodiversità*) de la Universidad de Cagliari, dedicado a estudio, gestión y conservación de la diversidad vegetal de Cerdeña y, en general, las islas mediterráneas. El objetivo principal del BG-SAR es la recolección, multiplicación y gestión de germoplasma de especies endémicas, raras y amenazadas presentes en la isla de Cerdeña, así como aquellas con un especial interés biogeográfico en el contexto de los territorios insulares mediterráneos (CONTI & al., 1992, 1997; PIGNATTI & al., 2001, SCOPPOLA & SPAMPINATO, 2005; MONTMOLLIN DE & STRAHM, 2005).

La estructura de BG-SAR incluye un local para la cuarentena, en el que el germoplasma traído del campo es almacenado antes de su procesado y almacenamiento, y un espacio con temperatura y humedad relativa controladas para la postmaduración, además de dos locales para la limpieza y dos laboratorios para la caracterización de semillas y elaboración de los test de viabilidad y pruebas de germinación. También se dispone de una cámara de deshidratación y una cámara frigorífica para la conservación a largo plazo (-25°C). Como espacio complementario se dispone también de un invernadero con camas calientes para la multiplicación y estudio de plantas obtenidas a partir de semillas. Para la gestión *ex situ* del germoplasma se siguen los procedimientos y protocolos estándar a nivel internacional, como los de FAO/IPGRI (1994) y el ISTA (2006).



foto: EM

Locales del Banco de Germoplasma de Cerdeña (BG-SAR).

Recolección y procesado de germoplasma

foto: EM



Medida de la actividad del agua.

Las campañas de recolección se planifican en función de la fenología de los taxones objetivo, a partir de los estudios existentes y el conocimiento botánico. El momento idóneo para la recolección, la cantidad de material y los métodos de recolección se basan en criterios ético-científicos, garantizando en todo momento la obtención de material de calidad (GUARINO & *al.*, 1995; BACCHETTA & *al.*, 2006A). El BG dispone de las autorizaciones del *Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio*, para la recolección de taxones incluidos en la Directiva 92/43/CEE (aplicación DPR. 357/97, mod. DPR. 120/03). Junto a la recolección del material, en el campo se toman datos relativos a las poblaciones mediante el estudio fenológico, demográfico, florístico-sociológico y ecológico (BACCHETTA & *al.*, 2006A).

Después de haber registrado los lotes y superada la cuarentena, la información de cada accesión se almacena en la base de datos, y el material es transportado a un local de ambiente controlado, a 20°C

y 40% de HR, ralentizando así la post-maduración. Posteriormente se procede a la limpieza del material mediante métodos manuales y mecánicos, utilizando procedimientos estándar como tamices o separadores gravimétricos. Cada accesión es analizada desde el punto de vista cuantitativo, calculando el peso total, el peso medio y el número de las semillas; y desde el punto de vista cualitativo, mediante el análisis de imagen de una muestra de 100 semillas para la adquisición de los parámetros morfométricos y colorimétricos del lote.

Una vez seleccionadas y verificada la calidad, las semillas se almacenan en una cámara de secado a 15°C y 15% HR (IBPGR, 1982), utilizando dos deshumidificadores de absorción química y un acondicionador para el control de la temperatura, controlados electrónicamente mediante un sensor de humedad. La humedad de las semillas se mide regularmente mediante el análisis de la actividad de agua, con el fin de evaluar el grado de desecación hasta alcanzar los parámetros óptimos para la conservación a -25°C.

Una muestra de semillas es conservada a una temperatura de entre 0°C y 5°C para la posterior realización de estudios y test de germinación. Parte de este material producido, y siempre en el caso de que el número de semillas sea suficiente, se pone a disposición de instituciones



foto: EM

Test de germinación de *Helicodiceros muscivorus* (L. f.) Engl.

científicas sin ánimo de lucro, a través del Index seminum (<http://www.ccb-sardegna.it/html/seminum.html>). Los protocolos de germinación se desarrollan siguiendo un esquema direccional que incluye un análisis bibliográfico preliminar, la consulta de algoritmos de germinación ya realizados para taxones afines (IBPGR, 1985), la aplicación de eventuales pretratamientos (ISTA, 2006) y la ejecución de pruebas de germinación con parámetros ambientales variables.

Para todas las pruebas realizadas se determinan los siguientes parámetros:

- Capacidad germinativa, en % de los individuos germinados
- Retardo de germinación, representado por el tiempo necesario (en días) para la primera germinación
- El valor T50, o tiempo necesario para alcanzar el 50% de la capacidad germinativa final (CÔME, 1970)
- Duración total del test

En el caso de accesiones en las que se disponga de poco material, y para las cuales no se conoce un protocolo de germinación o no es posible realizarlo, la vitalidad del lote es estimada mediante el test del tetrazolio, y sobre las semillas no germinadas.



foto: EM

Test del tetrazolio en semillas de *Astragalus maritimus* Moris.

Aplicaciones de las colecciones *ex situ*

La individualización del protocolo de germinación para cada taxón permite poder valorar la capacidad germinativa de las accesiones, además de regenerar individuos de un modo óptimo, en los campos experimentales del CCB. La gestión del material vegetativo sigue un proceso diferenciado según su tipología (esquejes, bulbos, rizomas, etc.). Para la multiplicación y el estudio del material vegetativo de taxones de especial interés, el BG dispone de bancales termoregulados. La conservación de este material se realiza utilizando la infraestructura del *Orto Botanico di Cagliari*, a través de los parterres de biodiversidad, campos experimentales y colecciones en maceta, los cuales sirven como base para las actividades de translocación de poblaciones especialmente amenazadas. Por ejemplo, se está llevando a cabo la duplicación de la única población conocida del endemismo de Cerdeña *Ribes sardoum* Martelli, mediante el uso de esquejes leñosos y su multiplicación *ex situ*, con el fin de disponer de material suficiente para reforzamiento y recuperación de poblaciones *in situ*.

Estrategias de conservación

A escala regional, desde el CCB se desarrollan convenios con entidades locales y gestores de las principales áreas protegidas, mediante proyectos específicos destinados al estudio *in situ* y la conservación *ex situ* del germoplasma de la isla. Un ejemplo de ello se debe al proyecto de “Conservación de la Biodiversidad vegetal en el área marina protegida de Cabo Carbonara”, promovido desde el CCB y el municipio de Villasimius (Cagliari), y financiado por el Ministerio de Medio Ambiente y Protección del Territorio y el Mar. La iniciativa tiene múltiples objetivos: por un lado, profundizar en la investigación sobre especies y hábitats amenazados y/o particularmente sensibles; por otro lado, y tratándose de un proyecto de investigación aplicada, la recolección de germoplasma y su conservación *ex situ*, el seguimiento de poblaciones y hábitats, y la definición de medidas para la planificación y gestión del territorio (BACCHETTA & *al.*, 2006B).

A escala nacional e internacional, el BG-SAR constituye un nexo de referencia para Cerdeña en el marco de la red italiana de bancos de germoplasma (RIBES), y participa en la red europea GENMEDOC, en cuyo ámbito se desarrolla el proyecto SEMCLIMED (ver Cuadro III). De forma complementaria, el CCB colabora con el *Millenium Seed Bank (Kew Gardens)* para la conservación de duplicados de semillas de endemismos amenazados de Cerdeña.

6. Conservación y almacenamiento

6.1 Conservación *ex situ* de semillas

6.1.1 Introducción

Comparada con la espora, que es una simple célula haploide, la semilla es una estructura que puede contener varios miles de células diploides, pero también haploides y triploides, con un embrión preformado, una cubierta seminal protectora (epispermo) y uno o más tejidos de reserva (endospermo, perispermo, etc.). Evolutivamente, la semilla deriva de un esporangio dentro del cual se ha desarrollado toda la fase haploide femenina del ciclo de la planta y parte de la diploide. Fisiológicamente es una estructura destinada a resistir y a durar, para facilitar la dispersión de la especie en el espacio y en el tiempo. Como ya se ha tratado en el apartado dedicado al desecado (5.9), a efectos de conservación suelen distinguirse dos tipos de semillas: ortodoxas y recalcitrantes. Las semillas ortodoxas admiten que se las deseque hasta un 4-7% de contenido de humedad e incluso que se las ultra-seque hasta un 1-3%. Con ello, el factor humedad puede utilizarse sin trabas para conseguir una máxima longevidad. Las semillas recalcitrantes toleran mal la desecación, razón por la cual es necesario utilizar otros procedimientos de conservación. Como se verá más adelante, los límites entre ambos tipos no son precisos, existiendo semillas con un comportamiento intermedio (semi-recalcitrantes), o recalcitrantes sólo en apariencia (pseudo-recalcitrantes).

Con el fin de garantizar una buena conservación a largo plazo de semillas ortodoxas, lo más importante es verificar el bajo contenido de humedad en la semilla, por ser éste, con gran diferencia, el parámetro más esencial entre los que pudieran influir en el éxito del proceso. Es necesario tener en cuenta que las semillas se secan de forma natural para frenar su metabolismo y durar más tiempo, por lo que los procesos a los que se las somete deben parecerse lo más posible al secado natural. A este respecto, hay dos puntos principales a considerar:

- El envase a utilizar debe tener una hermeticidad probada, en el sentido de no permitir el paso de vapor de agua a su interior. Si el envase no es hermético, la humedad de la semilla tenderá a equilibrarse con la humedad ambiental exterior, por lo que las ventajas de las bajas temperaturas apenas se notarían en semillas húmedas. Debe tenerse en cuenta que la humedad relativa en una cámara fría suele ser muy alta, que las semillas secas son fuertemente higroscópicas, y que por lento que fuera el paso de humedad al interior del envase, se cuenta con muchos años por delante para que ello termine ocurriendo.
- La ultra-desección hasta niveles entre un 1,0 - 3,0% de contenido de humedad en la semilla puede prolongar su vida hasta entre 4 y 32 veces (HARRINGTON, 1972) en relación con la desecación hasta niveles de un 5,0 - 7,0%. A pesar de que algunos autores consideran la ultra-desección como un proceso perjudicial para la semilla (VERTUCCI & ROOS, 1990, WALTERS & ENGELS, 1998), otros estudios consideran que, al menos en el caso de semillas ortodoxas, ésta no provoca necesariamente una alteración o merma de su viabilidad (ELLIS, 1998, PÉREZ-GARCÍA & *al.*, 2007). Un ejemplo representativo se ha podido verificar en el banco de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM), donde las semillas han mantenido su viabilidad prácticamente intacta (valor medio = 98,4%) después de cuarenta años ultrasecas. Por el contrario, en bancos de germoplasma donde las semillas no se han mantenido lo suficientemente secas suelen detectarse pérdidas de viabilidad importantes.

Respecto a la baja temperatura, y sin dejar de tener su importancia, quizás se le ha concedido tradicionalmente un papel mucho mayor del que realmente tiene. Ello no implica que se deba prescindir de ella, pero sí es necesario considerar que pueden ahorrarse grandes cantidades de energía eléctrica si se utilizan valores sólo moderadamente bajos. Por otro lado, las temperaturas próximas a la del nitrógeno líquido (-196 °C) proporcionan un método alternativo de conservación (crioconservación) apto para semillas ortodoxas, y que pudiera llegar a jugar un papel importante en el futuro para las semillas recalcitrantes (ver capítulo 7).

Un tercer factor – la presencia o ausencia de oxígeno – generó una literatura contradictoria durante muchos años, razón por la que se ha venido ignorando en la práctica. Sin embargo, investigaciones recientes de ELLIS & HONG (2007) sugieren que las semillas ultrasecas pudieran ser más sensibles al oxígeno, por lo que es necesario tener en cuenta este aspecto. De igual modo, se sabe que el proceso de envejecimiento de las semillas produce gases tóxicos, de los que es preciso librarse, si se desea aumentar al máximo la longevidad de la muestra.

6.1.2 Selección de envases

Durante muchos años se ha mantenido la falsa creencia de que los envases adecuados para mantener bebidas refrescantes o alimentos durante unos meses, son también adecuados para conservar semillas a largo plazo. GÓMEZ-CAMPO (2002) realizó una prueba de hermeticidad sobre cuarenta envases distintos – algunos de ellos ampliamente utilizados en los bancos de semillas – concluyendo que en treinta y seis de ellos (el 90%) entraba humedad, en mayor o menor medida, en menos de tres años. Los envases menos herméticos fueron los elaborados con materiales plásticos, y una gran parte de los de cristal o metal. La explicación de ello se atribuye a que la molécula de agua es lo suficientemente pequeña como para pasar por los poros que dejan entre sí los polímeros utilizados en los materiales plásticos y, aunque a corto plazo esto no es nada aparente, a medio y largo plazo termina ocurriendo inexorablemente. Particularmente permeables a la humedad son las bolsitas de polivinilo. Una razón adicional para el fracaso en envases con tapa radica en que las dos piezas son casi siempre de distinto material y se dilatan o contraen en distinta medida con los cambios de temperatura, permitiendo el paso de la humedad. Este último mecanismo actúa no solamente en envases de plástico sino también en muchos envases de cristal con tapa de rosca. Incluso en los tarros de mermelada tipo “twist-off” con tapa plastificada aparecen con el tiempo manchas de óxido y, aunque quizá no en todos, en la mayoría de los modelos termina entrando la humedad.

Mención aparte merecen los sobres termo-sellados de aluminio plastificado (*foil bags*), por el uso masivo que aún tienen en los bancos de semillas de especies cultivadas. Si bien los bi-laminados (plastificados por un solo lado) se han desechado hace mucho por resultar ineficaces, los tri-laminados (plastificados por ambos lados) tienen todavía una amplia aceptación. De ellos, hasta el 80% de un determinado conjunto podrían mantenerse herméticos después de bastantes años, si bien la incertidumbre de sufrir un 20% de pérdida o humedecimiento de semillas puede resultar un riesgo poco asumible para determinados bancos, especialmente los dedicados a plantas amenazadas. Una colección de 100.000 muestras donde comprobamos que un 20% (20.000) de ellas no conservan su hermeticidad, y que por añadidura no podemos saber cuáles son sin una revisión concienzuda, puede provocar una situación realmente angus-



foto: C. Gómez Campo

Figura 6.1: Envases que resistieron la entrada de humedad en los experimentos de GÓMEZ-CAMPO (2002), tras mantenerlos en una cámara húmeda durante un periodo de tres años.

tiosa para el responsable de la colección. Hacer pruebas masivas de germinación con el total de las muestras, o aunque fueran simples determinaciones de humedad para ver si conservan la inicial, no son soluciones prácticas. Añadamos que al ser opacos no permiten un control desde el exterior y que al estar soldados con plástico, arrastran a la larga los inconvenientes de éste último material.

En el experimento de GÓMEZ-CAMPO (2002) tan sólo se mostraron herméticos cuatro envases (figura 6.1):

- a) Tubos de vidrio cerrados a la llama. Utilizados desde 1966 en el banco de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM), en ellos sólo muy excepcionalmente (0,2%) aparecen casos de entrada de humedad por rotura de la punta soldada, que puede evitarse protegiéndola con una mezcla de pez y cera, como se indica más adelante. Sin duda es la mejor opción para muestras pequeñas de especies silvestres o bien cultivadas con semillas no demasiado grandes (especies amenazadas, colecciones de especial interés, etc).
- b) Tarros de appertización (*Kilner* o *Scotch*) con junta de goma y tapa apalancada, de uso bastante común en las cocinas domésticas. Sólo en una de entre veinticinco unidades entró humedad después de doce años. Su tamaño permite utilizarlos con muestras ya casi de cualquier tamaño, incluyendo las más o menos voluminosas que son comunes en los bancos de especies cultivadas. Debe cuidarse de que la junta de goma ajuste bien y de que nada se interponga entre el vidrio y la junta (cinta adhesiva, semillas, granitos de gel). Entra sin embargo dentro de lo posible que algunas de las juntas de goma deban reponerse pasados varios años.
- c) Frascos de vidrio con tapa de plástico, como los comúnmente utilizados en los laboratorios para guardar productos químicos, si bien en el experimento comentado frascos muy parecidos se comportaron de muy diferente modo. La diferencia radicaba en la calidad de la junta de plástico existente debajo de la tapa. Entre los inconvenientes de estos frascos figura la estrechez de la apertura exterior, que los hace incómodos, y el hecho de que las piezas de plástico pueden no ser aconsejables para muy largo plazo.

- d) Latas metálicas termosoldadas y plastificadas en su interior. Esta plastificación interna pudiera ser beneficiosa para evitar posibles efectos nocivos de los vapores del metal, en contacto con la semilla durante años. La soldadura es también con plástico. Sin embargo, estos envases son opacos y, al contrario de los tres anteriores, no permiten un control visual desde el exterior.

No se probaron en este experimento los viales con tapa de goma sujeta con una envoltura de aluminio que antiguamente se utilizaban en farmacia para contener penicilina, si bien los usuarios actuales de este tipo de envase aseguran que mantienen una alta hermeticidad. En otro experimento análogo, MANGER *et al.* (2003) recomiendan la utilización de envases muy parecidos, incluyendo otros de reducido tamaño. En cualquier caso, este tipo de experimentos no son definitivos, por lo que es posible que, con los años, puedan detectarse otros envases válidos. Por otro lado, modelos muy parecidos entre sí exteriormente (caso del “c” y también con algunos “b” de la figura 6.1) pueden comportarse de forma muy diferente, por lo que conviene realizar pruebas preliminares antes de adoptar uno concreto.

Dado que en los bancos de semillas del mundo se han venido utilizando demasiado a menudo envases no herméticos, ésta parece ser la causa principal por la que la conservación actual de semillas (sobre todo de especies cultivadas) ofrezca tan importantes limitaciones, para las cuales GÓMEZ-CAMPO (2002) sugiere posibles soluciones. Concretamente, el mayor volumen que proporciona la solución “b” abre el paso para que en los bancos de especies cultivadas se aplique la metodología del gel de sílice (ver apartado 6.1.3), la cual lleva utilizándose cuarenta años con gran éxito en especies silvestres (GÓMEZ-CAMPO, 1972, 2006; PÉREZ-GARCÍA *et al.*, 2007).

Por otro lado, la hermeticidad de los envases va ligada, en la práctica, a la necesidad de una manipulación más o menos frecuente de los lotes de semillas. Las ampollas de vidrio obtenidas a partir de tubos de laboratorio cerrados a la llama (figura 6.2) no pueden abrirse si no es rompiéndolos y por ello son especialmente recomendables para colecciones a muy largo plazo de material valioso dirigido al futuro (colecciones “caja-negra”). También pueden usarse para conservar en casos más generales haciendo varios tubos por cada accesión. Para colecciones-base (a largo plazo) pueden valer bien los tarros de appertización (b) y también las demás opciones que se señalaron más arriba. Las colecciones activas (para distribución) que requieren un acceso más frecuente necesitan envases que se puedan abrir y cerrar con facilidad, por lo que los tarros de appertización pueden cumplir muy bien esta función (incluso la doble función para colección base y activa si la operación de sacar submuestras se hace con suficiente rapidez y en un ambiente seco). Lo que no parece tener mucho sentido es diferenciar entre conservación “a medio plazo” y conservación “a largo plazo”, dado que el esfuerzo viene a ser el mismo y, al no haberse obtenido demasiado éxito hasta la fecha con las colecciones a largo plazo (WALTERS *et al.*, 2005; GÓMEZ CAMPO, 2006), resulta difícil definir una estrategia “a plazo medio” (ver cuadro 6).

Finalmente, algunos tubos de ensayo con tapa de rosca de plástico (figura 6.2) pueden ser interesantes para colecciones activas de especies con semillas pequeñas, aunque no son fiables al 100% para periodos largos de tiempo, debiendo cambiarse el gel en aquellos donde el cam-



Figura 6.2 (a) De izquierda a derecha: tubo de vidrio cerrado a la llama; tubo con rosca para colecciones activas. (b) De izquierda a derecha: gel de sílice sin indicador; gel con indicador de Cl_2Co anhidro; idem hidratado; gel con indicador de violeta de metilo anhidro; idem hidratado.

bio de color indique entrada de humedad. En cualquier caso, la transparencia de los envases pasa a ser una cualidad fundamental si se quiere aprovechar las ventajas que el método del gel de sílice proporciona para una monitorización fácil y directa de las muestras desde el exterior.

6.1.3 Ultradesección

El procedimiento estandarizado en la mayor parte de los bancos de germoplasma actuales consiste en secar las semillas hasta contenidos de humedad del 5 al 7% aproximadamente, colocarlas en envases de hermeticidad (muchas veces no contrastada), y someter el material a bajas temperaturas. Quizá sólo un centenar de bancos, sobre todo de semillas silvestres, entre los más de 1.400 que existen en el mundo, han utilizado hasta la fecha la ultradesección, procedimiento contrastado en el caso del banco de la UPM (Madrid) para un ultrasecado de hasta un 1-3% de contenido de humedad en semillas ortodoxas (PÉREZ-GARCÍA *et al.*, 2007), indicando además la relativa menor importancia de la temperatura en semillas ya ultrasecas. Debe hacerse notar que un contenido de humedad algo más alto (4% y hasta 5%) puede bastar para una efectiva conservación de algunas especies ortodoxas, sobre todo leguminosas (ELLIS *et al.*, 1988), pero, como indican estos mismos autores, dichas semillas no sufren si se las sigue secando hasta un 1-3%. En un banco donde se manejen cientos o miles de accesiones, lo deseable es no individualizar los métodos, por lo que la ultradesección puede aplicarse con carácter general, siempre que se trate de semillas ortodoxas. La ultradesección puede conseguirse con distintos procedimientos, como las sustancias absorbentes de la humedad, la liofilización, la inmersión en gases secos o los filtros moleculares.

Ultradesección con gel de sílice

La forma más práctica de conseguir la ultradesección es quizás colocar las semillas con gel de sílice deshidratado hasta conseguir un equilibrio con éste último. La forma práctica de asegurar este equilibrio se comenta algo más adelante. Almacenando gel junto a la semilla dentro

del recipiente hermético, el indicador coloreado que acompaña al gel nos avisará de cualquier entrada accidental de humedad. En la Tabla 8 se resumen las ventajas de utilizar gel de sílice con un indicador. Aparte de las relativas al mismo ultrasecado, vale la pena llamar la atención sobre la última (6), referida a un mecanismo protector completamente independiente. En las muestras de semillas que envejecen confinadas en un recipiente cerrado, se produce al final un “efecto de población” negativo por la acción de ciertos gases perjudiciales que se generan durante el proceso de envejecimiento y que terminan siendo letales para el conjunto. La mortalidad, que podría suponerse “a priori” probabilística para cada semilla individual, se acelera sin embargo por la acumulación de tales gases en los espacios intermedios (LEE *et al.*, 2001). Al ser capaz de absorberlos, el gel de sílice retrasa muy significativamente el envejecimiento y el momento de la muerte.

1	Proporciona un método práctico para desecar las muestras de semillas.
2	Consigue niveles de contenido de humedad de un 1-3% (ultradesecación), inferiores a los que se consiguen con otras sustancias.
3	En envases herméticos mantiene estos niveles indefinidamente.
4	Acompañado de un indicador coloreado, avisa sobre posibles anomalías (entradas de humedad) en el envase.
5	Puede regenerarse deshidratándolo de nuevo por el calor después de su uso.
6	Retrasa el envejecimiento absorbiendo los gases tóxicos que se producen en el proceso.

Tabla 8. Ventajas del uso del gel de sílice.

El gel de sílice no es más que un anhídrido silícico, SiO_2 , amorfo (no cristalino) obtenido por procedimientos industriales. Es de textura granulosa, blanco y muy poroso, siendo esto último lo que le confiere sus propiedades absorbentes. Una vez bien deshidratado y colocado en el platillo de una balanza, comprobaremos que puede absorber de la atmósfera hasta el 20% de su propio peso de agua, mientras que colocado en el fondo de un envase cerrado (un tarro de appertización, por ejemplo) se equilibra con la atmósfera confinada hasta que se llega en ésta a una humedad relativa inferior al 5%.

El nombre de “gel” se utiliza aquí incorrectamente, dado que un gel debe ser de naturaleza coloidal, que no es el caso, si bien el uso del término para este material hace que su denominación se mantenga por conveniencia. El color que normalmente exhibe el gel de sílice se debe a un indicador que se le añade para distinguir a simple vista cuándo está deshidratado y cuándo ha absorbido humedad. Durante muchos años se ha utilizado el cloruro de cobalto (Cl_2Co) que da un color azul fuerte al gel deshidratado y pasa a un rosa pálido cuando ha absorbido humedad. No hace mucho tiempo, la Unión Europea prohibió su uso al considerarlo tóxico por inhalación (reglamento CE 1907/2006). Posteriormente se buscaron varias alternativas con sales de hierro, donde el viraje de color apenas se distingue, llegando al indicador actualmente más



Figura 6.3: Liofilizador utilizado en el CBNM de Porquerolles.

aconsejable, de violeta de metilo, que confiere un color naranja al gel deshidratado y verdoso al que ha absorbido humedad (figura 6.2).

El gel se fabrica con distintos tamaños de grano. Este tamaño no es indiferente porque para uso en tarros de appertización puede ser más cómodo el de grano > 4 mm, mientras que dentro de ampollas de vidrio puede serlo el de 1-2 mm. Existen métodos para reducir el tamaño de las partículas, como triturar, moler o hidratar gel de grano grueso (este último procedimiento debe realizarse con cuidado, ya que lleva asociada la emisión de calor). Además, el gel hidratado puede regenerarse con calor para su reutilización. Los fabricantes de gel suelen recomendar regeneraciones a temperaturas entre 60 y 120°C. Cuanto más calor se aplique, podrán realizarse menos ciclos de regeneración. El proceso, según la masa a regenerar, puede durar dos y cinco horas.

Otros métodos para ultra-secar las semillas

También se ha utilizado con bastante éxito la liofilización, proceso que consiste en congelar súbitamente el agua de una muestra y sublimar posteriormente el hielo. Al final se llega igualmente a valores de contenido de humedad comprendidos entre el 1 y el 3%. Esta técnica se ha utilizado a partir de la década de los ochenta para la conservación a largo plazo del polen, con el fin de reducir la pérdida de viabilidad (SCHOENIKE & BEY, 1981). Esta metodología se ha puesto a punto en el Laboratorio de Palinología del Centro Nacional de Historia Natural de París (Francia) y se aplicó a semillas en el *Conservatoire Botanique National Méditerranéen* (CBNM) de Porquerolles (figura 6.3).

Se considera que las semillas liofilizadas no sufren reducción de su viabilidad, si bien parece que esto no puede asegurarse con carácter general para todas las especies, pues los detalles al aplicar esta técnica deben optimizarse para cada tipo de semilla, lo cual a su vez puede consumir grandes dosis de trabajo y atención. La liofilización podría tener la ventaja de conseguir una ultradesecación directa y no por etapas, como ocurre en general con el gel de sílice, que debe regenerarse cada vez que actúa. Sin embargo, la liofilización necesita de un aparato relativamente caro, y si al final el gel de sílice va a tener que jugar un papel imprescindible para el mantenimiento posterior de la baja humedad y para una buena monitorización, puede resultar mucho más práctico y económico desecar directamente con gel, evitando el doble proceso de

congelación/sublimación. En otras palabras, la liofilización ultraseca, mientras que con el gel podemos ultrasecar, conservar y monitorizar. En cambio, la liofilización podría jugar un papel importante para mantener la estructura interna en semillas grandes donde la desecación brusca pudiera resultar dañina y reducir la viabilidad (ver más adelante al tratar de semillas recalcitrantes).

Otras formas de ultrasecar consisten en la adición de CO₂ a los envases (el gas comercial es suficientemente seco) o la desecación con filtros moleculares, cada vez más presentes en el mercado, pero con escasa aplicación actual en bancos de semillas.

6.1.4 El factor baja temperatura

El uso de bajas temperaturas ha sido algo muy generalizado en la conservación de semillas a largo plazo. Los estándares publicados conjuntamente por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y el Instituto Internacional para los Recursos Genéticos Vegetales (IPGRI, hoy *Bioversity International*) recomiendan una temperatura de almacenamiento de -18°C o inferior (FAO/IPGRI, 1994). Esta recomendación se ha mantenido hasta nuestros días, de modo que la planificación de un banco de semillas moderno incluye siempre la utilización de una cámara fría capaz de conseguir al menos -15° ó -20°C. La localización de las nuevas instalaciones del Banco Nórdico en una región de “permafrost” responde a esa misma idea.

Sin embargo, y desgraciadamente, el poner énfasis en las bajas temperaturas puede llevar a descuidar el factor de baja humedad (sea por no secar lo suficiente o por utilizar envases inadecuados), haciendo que una gran parte de los actuales bancos de germoplasma estén ya preocupados por la baja capacidad germinativa de sus semillas y por la necesidad de regenerar un material prematuramente envejecido. Semillas ultradeseccadas por liofilización en el *Conservatoire Botanique National Méditerranéen* (CBNM) de Porquerolles, y mantenidas a temperatura ambiente durante 10 años, mostraron un comportamiento ligeramente mejor que las conservadas a baja temperatura. A un plazo mucho más largo, semillas ultradeseccadas con gel de sílice en el banco de la UPM (Madrid) y mantenidas 40 años en un armario a temperatura ambiente (PÉREZ-GARCÍA *et al.*, 2007, 2008) no se comportaron de forma distinta que las conservadas en cámara fría. En conclusión, parece claro que el papel preponderante que se ha dado al factor temperatura, al menos en la práctica, debe sustituirse por una atención mucho más decidida hacia el factor humedad. No obstante, parece evidente que la baja temperatura complementa, por lo que sería poco sensato prescindir de ella. Sin embargo, temperaturas moderadamente bajas, entre -5°C y 5°C, pueden ser más que suficientes para las semillas ortodoxas y ultrasecas, ahorrándose con ello enormes cantidades de energía. Por su implicación práctica y fisiológica, no debe confundirse la criopreservación con las bajas temperaturas, como se detallará en el capítulo 7.

6.1.5 La práctica de la conservación de semillas a largo plazo

Como alternativa al control de humedad en envases, en ocasiones se controla la humedad de la cámara misma, convirtiendo las cámaras frías existentes en cámaras secas. Manteniendo



foto: M.E. Tortosa

Figura 6.4. Tarro de apertización con gel de sílice en el fondo. En el espacio libre pueden almacenarse varias muestras de semillas en cualquier otro envase o sobre, a largo plazo y con plenas garantías si previamente se ha equilibrado su humedad con la del gel.

la temperatura alrededor de 0°C (más que suficiente, como se acaba de comentar) no resulta difícil ni caro conseguir en el interior una humedad relativa de aproximadamente el 15% y tal solución sería en cualquier caso mucho más eficaz que disponer de una cámara a -20°C donde se descuide la hermeticidad de los envases. Sin embargo, el control de la humedad dentro de los envases mismos con gel de sílice es a la larga mucho más práctico y eficaz porque permite alcanzar niveles de ultrasecado más idóneos y una mejor monitorización, permitiendo además un traslado rápido del material a otras cámaras, en caso de mudanza o problemas técnicos.

Aunque la ultradeseccación con gel de sílice se consigue fácilmente poniendo las muestras en un envase cerrado en presencia de gel deshidratado (figura 6.4), la muestra suele tener inicialmente un contenido de humedad más o menos alto (normalmente 10-12%), por lo que el gel se hidratará a costa de la muestra y cambiará de color. Necesitaremos entonces sustituir el gel por otro nuevo deshidratado, operación que a veces debe repetirse varias veces. Sólo cuando el gel no cambie de color, la semilla estará ultraseca, tendrá un contenido de humedad entre el 1 y 3% (dependiendo del tipo de semilla) y se mantendrá en equilibrio con el gel indefinidamente, si el envase permanece hermético. Como la reposición repetida del gel puede resultar laboriosa, conviene antes desecar al máximo las semillas con algún procedimiento distinto (exposición al sol, corrientes de aire seco, otros desecantes, etc.) o, en otras palabras, conviene iniciar la ultradeseccación con semillas que ya estén lo más secas posible. Sobra decir que la velocidad de desecación dependerá de la relación de masas entre el agente desecante y las semillas, si bien esta relación pierde su importancia cuando se alcanza el equilibrio final.

Otra forma de obviar o reducir las sustituciones del gel podría ser la ya mencionada adición de CO₂ a los envases. Este último procedimiento tiene la ventaja de desplazar el oxígeno presente en el envase. En otros casos, unas cámaras de plástico, no herméticas a largo plazo, pero sí lo suficiente para esta operación (figura 6.5) pueden albergar una serie de cajas abiertas con gel y otras con semillas. Cambiando el gel las veces que sea necesario, podremos ultradese-

foto: C. Gómez-Campo



a



b

foto: E. Mattana

Figura 6.5. (a) Cámaras para ultradesecar semillas en presencia de gel de sílice. (b) Máquina de desecación basada en un circuito con gel de sílice, utilizada en el *Centro Conservazione Biodiversità* de Cagliari.

car en ellas un número alto de muestras en unas pocas semanas. Si se dispone de fondos para afrontar la compra de nuevos equipos, es ventajoso disponer de un liofilizador y de una desecadora basada en una pequeña cantidad de gel que se regenera automáticamente por la acción de una resistencia eléctrica. La desecadora parece, por muchas razones, mucho más recomendable y versátil que el liofilizador. Así por ejemplo, un equipo donde se pudiera regular además la velocidad de desecación del material sería la opción ideal, porque valdría para ultrasecar con éxito las semillas pseudo-recalcitrantes y para investigar sobre ellas.

Desecadoras con gel regenerable existen ya en el mercado (figura 6.5) aunque los fabricantes cuentan en general con que la cámara donde se colocan las muestras a ultrasecar deba proporcionarla el usuario. Cuando la cámara es una habitación de fábrica, aun alicatada, grande o pequeña, es inevitable que entre humedad por las paredes, de modo que resulta difícil situarse por debajo de una humedad relativa de un 25%, sobre todo con temperaturas bajas. Añádase que se trata de un sistema dinámico donde hay varias piezas, juntas, etc. muy lejos de la simplicidad del tarro de la figura 6.5. En habitaciones bien aisladas de la humedad (sólo hay dos sistemas: con vidrio o metal) se puede llegar a un 15% de humedad relativa. Empiezan a aparecer sistemas compactos con cámara incorporada para colocar encima de una mesa de laboratorio aunque nunca garantizan una humedad relativa inferior al 15%. No obstante, si el objetivo final es almacenar la semilla en tarros de appertización, lo anterior puede ser suficiente para reducir mucho las sustituciones del gel.

El mismo sistema (tarros de appertización con gel de sílice en el fondo) puede valer para frenar el envejecimiento de colecciones de semillas no dispuestas en conservadores herméticos. Bastaría colocar las muestras a granel o con su envase original dentro de los tarros y regenerar el gel las veces que sea necesario hasta que no cambie de color. En el caso particular de los sobres termosoldados de complejo aluminio-plástico, pueden caber varios sobres en cada tarro, numerándose éstos últimos y anotando la situación de las accesiones en la base de datos.

foto: C. Gómez-Campo

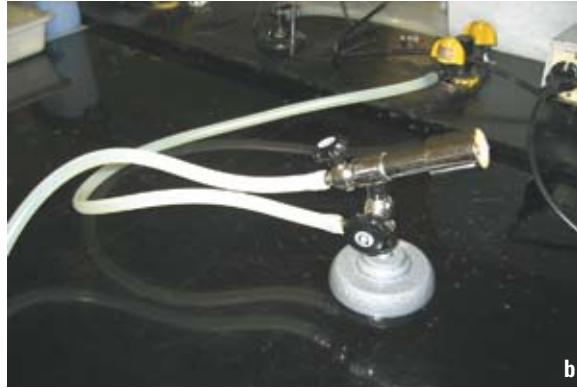


foto: M. E. Tortosa

Figura 6.6 (a) Fases en la elaboración de ampollas de vidrios con semillas y gel de sílice a partir de un tubo de laboratorio que se cierra a la llama.
(b) Soplete con doble entrada (para gas y aire) para cerrar tubos de vidrio .

El uso de ampollas cerradas a la llama - obtenidas a partir de tubos estándar de laboratorio- tiene una eficacia comprobada (figura 6.2). Existen diferentes alternativas de tamaño, si bien el tubo estándar de 20 ml (en el cual son aprovechables cerca de 8 ml) ofrece una capacidad representativa que puede resultar adecuada para material especialmente valioso: especies raras, endémicas o amenazadas, colecciones caja-negra, etc. A continuación se detallan las fases para elaborar ampollas de 20 ml, según el procedimiento que se viene utilizando con éxito desde 1966 en el banco de la UPM (figura 6.6), y que puede aplicarse (ajustando las cantidades y medidas oportunas) a otros tamaños de recipientes.

- 1) Los tubos de ensayo de que partimos deben ser de vidrio alcalino, reconocible por cierto tono verdoso en su reborde. Otros tipos de vidrio se reblandecen con menos dificultad al calentarlos, pudiendo llegar incluso a resquebrajarse.
- 2) Cuando se pretende conservar a largo plazo, es prudente colocar una etiqueta interna con el número de la accesión porque cualquier etiqueta exterior podría borrarse o desprenderse con el tiempo. El número se escribe con un bolígrafo sobre la parte engomada de una etiqueta alargada, ésta se desliza hasta la parte inferior del tubo y se aplica después contra el vidrio con una varilla.
- 3) La semilla limpia, y cuanto más seca mejor, se introduce con un embudo o desde otro tubo. Si bien pueden introducirse hasta 8 ml de la misma, es frecuente introducir menos (3, 4 ó 5 ml) para disponer de más material cuando en el futuro convenga romper alguno.
- 4) Un trozo de algodón, preferentemente hidrófobo y previamente deshidratado, servirá para separar la semilla del gel de sílice que se va a colocar encima.
- 5) Se añaden a continuación unos 3-4 ml de gel de sílice deshidratado. Antes de proceder al paso siguiente es prudente colocar sobre el tubo un tapón de goma y esperar unos 15 ó 20 días. Si la semilla no está debidamente seca, se verá un cambio de color en la parte infe-

rior del gel, pero puede bastar un solo cambio de éste último para que el conjunto quede en equilibrio. En este aspecto, y por el menor volumen de la muestra, las cosas son aquí más sencillas que con los tarros de appertización.

- 6) Otro trozo de algodón como el usado en el punto 4) contribuirá a mantener fijo el conjunto. Por encima deberán quedar unos 5 cm de tubo libres para facilitar el cierre a la llama.
- 7) El cierre a la llama se realiza con toda comodidad con un soplete (figura 6.6) alimentado con aire u oxígeno. La llama de un mechero “Bunsen” normal de laboratorio podría no ser suficiente para cerrar los tubos, pero sí lo es si se le dota de una doble entrada y se aplica una corriente de oxígeno o simplemente de aire. El cierre anterior puede hacerse con relativa rapidez en cuanto se adquiere un poco de práctica. Sujetando el tubo por su base con los dedos (no se nota ningún calor) y usando una pinza larga en su borde superior, concentrando la acción de la llama y girando para que se distribuya el calor alrededor, pueden cerrarse bien unos cien tubos por hora.
- 8) Someter los tubos cerrados en condiciones de alta humedad durante varios días permitirá detectar si hay alguno que no se cerró bien -el gel cambiará su color- para repetir con él la operación (se puede reducir el tiempo de espera sumergiendo el tubo en agua, si bien teniendo cuidado de no humedecer excesivamente la muestra).
- 9) Faltaría colocar alguna etiqueta externa con más datos según las preferencias de cada banco y proteger de algún modo la parte más delicada del conjunto, la punta cerrada a la llama. Ambos objetivos pueden combinarse. Una etiqueta larga y engomada, se enrolla por la parte superior y sirve de molde o “encofrado” para verter en su interior algún tipo de líquido solidificable, como cera fundida, resinas epoxy, etc., si bien lo más práctico es una mezcla de cera (2/3) y pez (colofonia o resina) (1/3) para endurecer la cera. Se funde el conjunto y se vierte con un cuentagotas en el hueco de la etiqueta donde se encuentra la punta del vidrio a proteger.
- 10) Finalmente, y para que la superficie superior no pueda rallarse, puede aplicarse sobre ella alguna sustancia plástica protectora (ej. laca de uñas). En el estirado a la llama y la colocación de la etiqueta debe tenerse en cuenta que los tubos que constituyen el producto final tengan una longitud homogénea.

En el banco de la UPM, las ampollas así obtenidas se han guardado tradicionalmente en tarros de appertización, donde pueden alojarse hasta 25 tubos por tarro, obteniendo una doble seguridad frente a la humedad. El protocolo indicado puede parecer complicado y laborioso, pero no es así cuando se pone a punto y se organiza bien el trabajo en serie. Las semillas se conservarán así sin pérdida significativa de su viabilidad durante al menos cuatro décadas (PÉREZ-GARCÍA & *al.*, 2007) lo cual puede significar una conservación satisfactoria de por lo menos un siglo o dos. La ventaja e inconveniente a la vez es que los tubos sólo pueden abrirse rompiéndolos, contrariamente de lo que ocurre con los tarros de appertización.

Conservar bien las semillas ortodoxas con los procedimientos descritos puede significar un enorme ahorro económico, dado que: (a) las tediosas pruebas de viabilidad pueden extenderse en el tiempo desde cada 5-10 años, como ahora se recomienda, hasta quizá 60 u 80 años;

(b) los ciclos de regeneración o rejuvenecimiento de las muestras que ahora son cifrables en no más de 20-30 años pueden extenderse a 1-2 siglos o quizá más; (c) utilizar temperaturas sólo moderadamente bajas puede llegar a suponer un ahorro de energía de muchos megawatios/hora en sólo unos pocos años; (d) lo verdaderamente caro en un banco de germoplasma son las pérdidas irreversibles del material genético almacenado.

6.1.6 Semillas recalcitrantes

Caracteriza a estas semillas un contenido inicial de humedad relativamente alto (15-25%) y una manifiesta intolerancia a la desecación. En general son reconocibles morfológicamente por su tamaño grande y tegumento liso, si bien semillas de apariencia más normal podrían ser también recalcitrantes. En la región mediterránea no son comunes (quizá un 3-5% de las especies) pero son más frecuentes en especies forestales (*Quercus*, *Castanea*) y especies riparias (*Salix*). En cambio, en las selvas ecuatoriales predominan las especies con semillas recalcitrantes. Ecológicamente siguen una estrategia de “durar” en plántula y no en semilla, con lo cual esta última elude secarse demasiado en un ambiente húmedo, donde le resultaría más difícil. De este modo mantienen la viabilidad durante poco tiempo, generalmente entre unos pocos meses y 2-3 años. Que una semilla sea ortodoxa o recalcitrante no es, sin embargo, una cuestión de todo o nada (BERJAK & PAMMENTER, 1994) porque existen semillas de comportamiento intermedio (semi-recalcitrantes) que admiten algo la desecación, aunque sólo hasta determinados niveles.

Para conservar las semillas recalcitrantes puede hacerse bien poco, si no es situarlas en su límite inferior de tolerancia en cuanto al contenido de humedad y temperatura, o recurrir al cultivo *in vitro* o a la crio-conservación de los embriones extraídos de ellas. Al vivir en lugares húmedos, es frecuente que mueran prematuramente por ataques de hongos y bacterias, por lo que tratarlas con algún producto fitoterapéutico adecuado podría prolongar su vida. Quizá lo más práctico sean los bancos de plántulas, pues éstas suelen ser bastante longevas cuando se colocan en condiciones de baja iluminación. Aparte, naturalmente, de las colecciones vivas de plantas adultas o de la ineludible conservación *in situ*.

En las especies cultivadas y en las espontáneas que no sean de ribera, el tamaño de las semillas parece determinante para su condición de ortodoxa o recalcitrante. Las semillas de sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.), por ejemplo, o las de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) son ortodoxas, pero las de calabaza (*Cucurbita sp.*) y de algunas especies de *Phaseolus* (como *P. lunatus* L.), con semillas más grandes, pueden sufrir total o parcialmente con la desecación. En semillas de igual tamaño, la composición interna podría marcar diferencias. Así, cuando trabajamos con semillas pequeñas podremos casi siempre confiar en que serán mayoritariamente ortodoxas, mientras que cuando aumenta su tamaño debemos relativizar nuestra confianza y hacer las pruebas correspondientes.

Es muy fácil diseñar un protocolo para distinguir las semillas ortodoxas de las recalcitrantes, en función de la tolerancia a la desecación de las primeras. Este protocolo consistiría, sucesivamente, en (1) una prueba inicial de germinación, (2) la desecación de un lote equivalente y (3) una nueva prueba de germinación con las semillas desecadas. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que un valor bajo en las pruebas de germinación no significa que la muestra esté

muerta o moribunda, porque pudiera deberse a dormición. Es por ello que cualquier valor bajo debe inducirnos inmediatamente a tratar la semilla (mediante escarificación, inmersión en soluciones de ácido giberélico, etc.) para liberarlas de su posible dormición.

Antes de decidir sobre si una semilla es o no recalcitrante, sobre todo en los límites inferiores de tamaño, es muy conveniente hacer una prueba que nos podría permitir ultrasecarla y conservarla a largo plazo. Muchas semillas parecen tolerar la desecación e incluso la ultradesecación si estas operaciones se realizan lentamente, sin saltos bruscos. A estas semillas, que denominamos aquí “pseudo-recalcitrantes”, conviene equilibrarlas antes en sucesivas atmósferas con humedad relativa decreciente (obtenidas por equilibrio con glicerina o con soluciones salinas de concentración creciente) para ir las desecando muy gradualmente, y sólo entonces equilibrarlas con gel. A efectos de conservación, el resultado será el mismo que si operamos con semillas ortodoxas. La investigación extensiva de estos casos resultará muy útil porque ampliará considerablemente el número de especies que pueden conservarse a largo plazo.

6.2 Conservación *ex situ* de esporas de pteridófitos

6.2.1 Introducción

Los helechos disponen de dos tipos de esporas, en función de si contienen o no pigmentos fotosintéticos activos en los cloroplastos de su citoplasma (esporas clorofilicas o esporas verdes, y esporas no clorofilicas o esporas no verdes). Las esporas verdes pierden la viabilidad de manera muy acelerada, encontrando especies en las que sus esporas, a temperatura ambiente, han muerto en unas semanas (*Equisetum sp.*) o un mes (*Osmunda regalis L.*), aunque algunas de los géneros *Onoclea* y *Matteuccia* llegan a durar un año (LLOYD & KLEKOWSKY, 1970).

Las especies que disponen de esporas no clorofilicas, tienen una viabilidad en condiciones ambientales que oscila desde unos pocos meses (*Gleicheniaceae*, *Thyrsopteris elegans* Kunze, *Culcita macrocarpa* K. Presl.), entre 1 año y una década (la mayoría de las especies), y en algún caso extraordinario (*Pellaea sp.*, *Asplenium serra* Langsd. & Fisch, *Marsilea sp.*) hasta algunas décadas (LLOYD & KLEKOWSKY, 1970; DYER, 1979; PAGE, 1979; WINDHAM & *al.*, 1986; LINDSAY & *al.* 1992; QUINTANILLA & *al.*, 2002). Pero estos tiempos de viabilidad, en condiciones ambientales, no aseguran la viabilidad de todo el lote de esporas conservado (muchos de los datos son a nivel cualitativo y casos extraordinarios). Además, aunque germinen, se producen efectos negativos sobre el desarrollo del gametofito que no aseguran su capacidad de crecimiento y su integridad genética (SMITH & ROBINSON, 1975; BERI & BIR, 1993; CAMLOH, 1999).

Cuando hablamos de conservar esporas hay que tener en cuenta para qué van a ser destinadas estas esporas. Si su uso está reservado a la producción inmediata o a corto plazo de planta, o se desea tener al alcance un material didáctico, o incluso son lotes de esporas que son renovados y gastados continuamente en investigación u otros usos, no será rentable dedicar esfuerzos energéticos y económicos a unos métodos de conservación costosos y que requieren un mantenimiento constante. Además hay que tener en cuenta que no todas las instituciones poseen dotaciones económicas elevadas que puedan permitir la compra y el mantenimiento de aparatos específicos (como pueden ser ultra-congeladores, tanques de nitrógeno líquido, etc.). Sin embargo, si las esporas van a ser almacenadas a largo plazo, o se requiere mantener intactas todas sus características para futuras investigaciones, deberán utilizar las metodologías más adecuadas en su conservación. Por todo ello, las metodologías de conservación a emplear dependerán del uso final de esas esporas en cada banco de germoplasma y en cada caso concreto.

6.2.2 Contenido en agua y conservación de esporas de helechos

Controlar el contenido de agua de los materiales destinados a su conservación a largo plazo en bancos de germoplasma es un paso previo muy importante. Este contenido en agua ha sido determinado en diferentes tipos de explantos, semillas y pólenes por diversos autores, los cuales recomiendan unos óptimos para su correcta y más duradera conservación. Alcanzar esos contenidos de agua se realiza manipulando la humedad relativa ambiental del material a conservar previamente a su sellado y almacenado (ELLIS & *al.*, 1990; FAO/IPGRI, 1994; BUITINK & *al.*, 1996; WALTERS, 1998; GÓMEZ-CAMPO, 2001).

La práctica totalidad de los trabajos de conservación de esporas de helechos que existen almacenan las esporas en las bancadas del laboratorio, tras ser liberadas de los esporangios, y en

condiciones de temperatura y humedad marcadas por la situación geográfica del laboratorio y sus sistemas de ventilación y regulación térmica (ej. desde humedades relativas (RH) ca. 30% en Fort Collins, CO, EEUU, hasta RH ca. 65% en Valencia, España o superiores en zonas tropicales costeras). Esto supone que los resultados obtenidos no puedan considerar el contenido de agua de las esporas almacenadas, a excepción de los trabajos realizados con desecado en gel de sílice o con las técnicas de conservación húmeda expuestas anteriormente.

Respecto al desecado con gel de sílice, no hay muchos trabajos que hayan estudiado los efectos sobre diferentes tipos de especies. CONSTANTINO & al. (2000) observaron en tres especies de helechos arborescentes que el desecado con gel de sílice era ventajoso para la conservación de *Lophosoria quadripinnata* (J.F. Gmelin) C. Chr a 4°C, mientras que era perjudicial en la conservación de *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook y *Cyathea caracasana* (Klotzsch) Domi, achacando esta diferencia entre especies al mayor tamaño y contenido en agua de las esporas de *L. quadripinnata*.

Recientes estudios desarrollados en los laboratorios del *National Center for Genetic Resources Preservation* (ARS) en Fort Collins, CO, EEUU, están demostrando la importancia del control del contenido en agua de las esporas de helechos para su conservación a largo plazo y a diferentes temperaturas (BALLESTEROS & WALTERS, 2007A,B). Estos resultados, junto con otros experimentos aún en desarrollo, ayudarán a la comprensión de los mecanismos de envejecimiento de las esporas, permitiendo optimizar las técnicas de conservación expuestas en este capítulo.

6.2.3 Conservación húmeda

Diversos autores han estudiado la conservación de las esporas de helechos en estado hidratado y en oscuridad (tal y como estarían en el banco de esporas del suelo) concluyendo que este método de conservación mantiene intacta la viabilidad de las esporas con el tiempo y es mejor que conservarlas en estado deshidratado, tras al menos 12 ó 24 meses refrigeradas o a temperatura ambiente (LINDSAY & al., 1992; SIMABUKURO & al., 1998; QUINTANILLA & al., 2002; ARAGÓN & PANGUA, 2004). Para la conservación a corto o medio plazo de esporas destinadas a la obtención de gametófitos para experimentación, o para la producción de planta, este protocolo de conservación húmeda pueda ser una buena metodología, ya que incluso esporas clorofilicas o de especies no tolerantes a la desecación han permanecido sin perder viabilidad durante mucho tiempo. Otra ventaja viene dada por lo económico de esta técnica, ya que no se necesita más que una nevera (4-5°C), o incluso se pueden almacenar las placas a temperatura ambiente en un lugar fresco (ca.20°C). El problema de esta técnica viene dado por diferentes aspectos relacionados con el manejo y la comodidad de uso. Se requiere un mayor espacio para la conservación de los lotes de esporas, además del tiempo que hay que emplear en sembrar todos los lotes recogidos en diferentes réplicas. Por otro lado, hay problemas de pérdidas de placas por contaminaciones de hongos y bacterias que no siempre podemos evitar, así como por el desecado del agar en placas mal selladas o simplemente por el paso del tiempo. Cabe recordar que especies que germinan en oscuridad no pueden ser conservadas con esta técnica, ya que con el paso del tiempo perderemos aquellas esporas que germinen.

Por último, y lo que hace esta técnica no recomendable para la conservación a largo plazo, está el hecho de que este tipo de preservación se fundamenta en que, al estar las esporas hi-

dratadas, existe un metabolismo de reparación celular que evita la degeneración del DNA y de los orgánulos celulares que se producen durante el almacenado de las esporas deshidratadas, como ocurre de manera análoga en semillas con dormición secundaria (VILLIERS, 1974) (ver en capítulo 7 los tipos de dormición). Al haber un gasto metabólico continuo, con el paso del tiempo se perderán sustancias de reserva de las esporas, que serán necesarias posteriormente para la germinación y el desarrollo temprano del gametofito, llegándose al punto en que esas esporas no puedan germinar, y por lo tanto mueran. Esta posibilidad debe considerarse en todo momento, para garantizar la posible viabilidad de las esporas, si bien de momento no hay trabajos publicados que lo demuestren.

6.2.4 Conservación seca a 4°C y -25°C

Los métodos de conservación habituales en bancos de germoplasma siguen el principio de almacenar el material vegetal deshidratado (ej., con gel de sílice) y a bajas temperaturas (entre 4 o 5°C y -25°C). DYER (1979) señaló que para conservar las esporas y reducir su deterioro lo más común era almacenarlas secas, en tubos herméticos (a veces con un desecante) y a bajas temperaturas. Con el tiempo se han ido analizando los efectos del almacenado en estas condiciones, concluyéndose que no son métodos ideales para la conservación de esporas a largo plazo, e incluso llegando a considerar la congelación de las esporas a -25°C como un método dañino para algunas especies de helechos (SIMABUKURO *et al.*, 1998; QUINTANILLA *et al.*, 2002; ARAGÓN *et al.*, 2004).

La refrigeración de las esporas a 4 o 5°C ha sido analizada por diversos autores, observándose que es un buen método para conservar las esporas sin que les afecte significativamente a su viabilidad hasta, al menos, 12 meses. A partir de este tiempo la viabilidad de las esporas disminuye y se acentúan los efectos negativos sobre el desarrollo del gametofito, aunque de manera menos rápida que en aquellas esporas almacenadas a temperatura ambiente o congeladas (SMITH *et al.*, 1975; SIMABUKURO *et al.*, 1998; CAMLOH, 1999; CONSTANTINO *et al.*, 2000; QUINTANILLA *et al.*, 2002; ARAGÓN *et al.*, 2004).

En refrigeración, pero sin sembrar en medio de cultivo y sin desecar con gel de sílice, algunas esporas verdes han mantenido su viabilidad tras más de 1 año de almacenado, como en el caso de *Osmunda regalis* (MORINI, 2000). En algunos trabajos se ha abordado la conservación de esporas verdes a temperaturas bajo cero, obteniéndose resultados variados. En concreto, se ha conseguido extender la viabilidad de esporas clorofílicas del género *Equisetum* hasta 2 ó 3 años a -10°C sumergidas en glicerina (JONES *et al.*, 1970).

6.2.5 Ultrapreservación (-80°C y nitrógeno líquido)

La criopreservación de material vivo implica, la mayoría de veces, la protección de las células y estructuras que lo componen frente a la congelación del agua que forma parte de todo tejido vivo (ver apartado 7). Para realizar esta crioprotección se utilizan diferentes sustancias que actúan como crioprotectores, y diferentes métodos cuya finalidad última es eliminar la mayor parte posible de agua de las células y así evitar los daños que causaría ésta en el proceso de congelación.

Una técnica muy utilizada actualmente en la criopreservación de material vivo es la encapsulación en alginato y la inmersión directa en nitrógeno líquido. La ventaja de esta técnica

frente a otras que se venían usando (congelación progresiva, crioprotectores agresivos, etc.) es la relativa facilidad y rapidez con la que se realiza y la poca agresividad de los crioprotectores utilizados (sacarosa). Se fundamenta principalmente en dos hechos: el máximo desecado posible del material a criopreservar (es la función del encapsulado en alginato) y la vitrificación de este material para evitar la formación de cristales de hielo que dañen los tejidos, que se consigue con la inmersión directa en nitrógeno líquido (HIRATA *et al.*, 1996; WOOD *et al.*, 2000; ENGELMANN, 2004). En el caso de pteridófitos, esta técnica se ha utilizado de manera positiva con esporas de *Osmunda regalis* (PENCE, 2000).

La desecación es el proceso más simple ya que consiste en deshidratar los explantos, y entonces congelarlos rápidamente por inmersión directa en nitrógeno líquido. Las proporciones de supervivencia óptimas generalmente se obtienen cuando las muestras son congeladas con un contenido en agua comprendido entre el 10 y el 20% (en base al peso fresco) (ENGELMANN, 1999). Las esporas que se recolectan tras ser liberadas de las frondes tienen un contenido en agua entre el 3 y el 10% (en base al peso fresco).

Con esporas de helechos se han realizado diversas pruebas para estudiar cómo les afecta la criopreservación tras inmersión directa en nitrógeno líquido, concluyendo cualitativa y cuantitativamente que, tras un correcto descongelado, es una técnica que no afecta a la viabilidad de las esporas, permitiendo conservarlas durante un tiempo supuestamente indefinido (AGRAWAL *et al.*, 1993; PENCE, 2000; ROGGE *et al.*, 2000; BALLESTEROS *et al.*, 2006). El problema reside en que existen pocos estudios que hagan referencia a la estabilidad genética del material vegetal criopreservado. Sin embargo, no se han encontrado modificaciones a nivel morfológico, bioquímico o molecular en plantas regeneradas desde muestras criopreservadas (ENGELMANN, 1997; BALLESTEROS *et al.*, 2006).

En el caso de esporas verdes, se han mantenido esporas viables de *Equisetum hyemale* L. tras 16 meses de conservación a -70°C , las cuales además continuaron su desarrollo gametofítico (WHITTIER, 1996). Incluso, como se ha comentado en párrafos anteriores, se ha conseguido mantener viables las esporas de *Osmunda regalis* durante al menos 18 meses inmersas en nitrógeno líquido tras su encapsulación en alginato (PENCE, 2000). Sin embargo, existen pocos datos que determinen la mejor y más duradera forma de conservar las esporas a largo plazo, o los datos existentes son cualitativos y se centran únicamente en la capacidad de germinar las esporas tras su almacenamiento.

6.3 Conservación *ex situ* de polen

Teóricamente el polen de cada especie requiere de unas condiciones ideales propias de almacenamiento, y no todos los granos de polen pueden ser conservados con las mismas técnicas (HOEKSTRA, 1995). El contenido en agua del grano y los carbohidratos de reserva parecen ser los factores que más influyen en el modo de conservación (PACINI & HESSE, 2005). En particular, los granos con un alto contenido en agua como los de *Poaceae*, se conservan con mayor dificultad (BARNABAS & RAJKI, 1981). En líneas generales, es preferible conservar polen en pequeñas partes alícuotas antes que en un solo contenedor. De este modo se puede coger la cantidad necesaria sin interferir en el estado de conservación de todo el lote. Cuanto menor sea la cantidad conservada, más homogéneas serán las condiciones de los granos.

A continuación se describen algunos de los métodos más comunes para el almacenamiento de polen:

- Conservación a bajas temperaturas y baja humedad relativa. Los recipientes para la conservación de los granos pueden ser pequeños frascos, y mejor si son *ependorf* de plástico, que no necesitan ser sellados. Estas probetas se conservan dentro de un desecador donde se puede mantener la temperatura entre -20 y +4°C y la humedad relativa por debajo del 10%. Para asegurar estas condiciones ambientales, se coloca gel de sílice en el interior del desecador y éste, en función de la temperatura, dentro de un frigorífico o de un congelador. Este método se encuentra dentro de los más usados por su simplicidad y permite conservar el polen por un periodo máximo de algunos meses. Sin embargo, esta metodología no se aconseja para la conservación del polen de cereales y en general de pólenes parcialmente hidratados.
- Conservación a bajas temperaturas al vacío. Esta metodología prevé la congelación del polen a -60/-80°C y la gradual extracción, aunque no completa, del agua por sublimación. Después de este tratamiento el polen se conserva a temperaturas algo inferiores a 0°C. Con este método se conserva el polen durante largos periodos de tiempo, incluso durante algunos años.
- Conservación a temperaturas muy bajas (crioconservación). Con este método se hace descender el contenido de agua del polen hasta un determinado umbral y después se sumerge y conserva en nitrógeno líquido. Es el método más usado en los últimos años puesto que permite una correcta conservación a largo plazo. A diferencia de los dos métodos anteriores, puede ser usado para el polen de cereales, realizando una previa deshidratación lenta a 20°C y 20-40% de humedad relativa.
- Conservación en disolventes orgánicos. Este método evita los problemas relativos al mantenimiento de una específica humedad relativa y además, los granos pueden ser transportados de un lugar a otro sin necesidad de ser conservados a bajas temperaturas. Antes del almacenamiento en los disolventes más comunes (acetona, benceno, éter de petróleo, xileno, tolueno) el polen debe ser deshidratado. También se pueden usar otros disolventes, aunque pueden influir en la viabilidad. Este método se ha testado en muy pocas especies y aún no es de uso corriente.

Independientemente del método usado, resulta crítico el paso del polen conservado en las condiciones descritas con anterioridad a las condiciones ambientales o de laboratorio. Si ha sido conservado a bajas temperaturas, la descongelación debe de ser un proceso lento que prevea una lenta rehidratación. Este último proceso se realiza colocando el frasco, o mejor una superficie plana sobre la cual se ha dispuesto el polen, en un recipiente con elevada humedad relativa obtenida mediante la presencia de papel de filtro embebido en agua. Antes de utilizar el polen conservado, es aconsejable verificar su viabilidad (ver apartado 4.4.4).

Conservación a medio plazo *versus* conservación a largo plazo

La longevidad de las semillas ha sido siempre objeto de predicciones, unas veces basadas en supuestas correlaciones con otros parámetros y otras veces en extrapolaciones de experimentos a corto plazo. Sólo el hallazgo esporádico de algunas semillas arqueológicas que han germinado después de mucho tiempo nos indica que dicha longevidad puede alcanzar valores muy altos, de siglos e incluso milenios. Sin embargo, la experiencia de los 1.500 bancos de semillas que actualmente existen en el planeta no parece indicar lo mismo. Podemos afirmar con rotundidad que la inmensa mayoría de ellos están conservando solamente a medio plazo. La idea de conservar semillas a largo plazo fue en su día para muchos bancos una ilusión que se ha ido desvaneciendo con el paso del tiempo.

Hacia 1965 sólo existían 8-10 bancos, todos ellos dedicados a especies cultivadas, y ninguno ha publicado nunca resultados de germinación medianamente aceptables después de al menos 40 años. Tras una intensa búsqueda de tales resultados, sólo hemos encontrado silencios, algún resultado aceptable pero referido a periodos de conservación más cortos, o datos que implican pérdidas cercanas a la mitad del material genético almacenado.

Muchos bancos más jóvenes, sobre todo de especies cultivadas, se encuentran ya rejuveneciendo sus muestras en el campo mediante cultivo o preocupados por la necesidad perentoria de hacerlo. Se estima que la regeneración debe hacerse cuando la germinabilidad ha decaído hasta un 85%. Los ciclos de regeneración no pasan de 25-30 años. Por desgracia, la mayoría de los bancos actuales han imitado ciegamente los métodos de los primeros grandes bancos, basados en dar importancia primordial a la baja temperatura y descuidar un buen control del contenido de humedad.

Por eso cobra ahora la máxima actualidad el método del gel de sílice, utilizado por el banco de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) desde 1966 (GÓMEZ-CAMPO, 1972), evaluado con éxito rotundo cuatro décadas después por PÉREZ-GARCÍA & *al.* (2007) y descrito con detalle en este Manual. La germinación media de las muestras más antiguas se acerca mucho al 100%, lo que supone una verdadera conservación a largo plazo donde los ciclos de regeneración pudieran muy bien extenderse hasta un siglo o más. Las estimaciones de la longevidad de las semillas podrán basarse por fin en el futuro sobre datos concretos tomados “a posteriori” y con valor estadístico.

Que conozcamos, valores concretos obtenidos a partir de semillas almacenadas al menos 40 años, sólo se han publicado los siguientes (referidos todos a Crucíferas para hacerlos más comparables):

98,4 % semillas ultrasecas y frías (UPM, PÉREZ-GARCÍA & <i>al.</i> , 2007)	[Largo plazo]
93,8 % semillas ultrasecas a temperatura ambiente (PÉREZ-GARCÍA & <i>al.</i> , 2007)	[Largo plazo]
54,8 % semillas secas y frías (USDA, WALTERS & <i>al.</i> , 2005)	[Medio plazo]

La ultradeseccación de las semillas ortodoxas hasta niveles de 1-3% de contenido de humedad no es, como vemos, perjudicial para las mismas y parece ser en cambio un factor clave para extender su vida por muchos años. Parece también obvio, contra lo que siempre se ha creído, que la temperatura tiene una importancia relativa bastante menor. Muestras que quedaron en un armario, fuera de la cámara fría pero ultrasecas, durante 40 años germinaron en un porcentaje muy alto (93,8% si se descartan dos de ellas donde se agotó el material y no pudo eliminarse totalmente la dormición).

Parte del éxito del banco de la UPM pudiera residir en que la atmósfera interior de los envases se había cambiado previamente por anhídrido carbónico, minimizando con ello la presencia de oxígeno (no explicitado en 2007 aunque sí, claramente, en el trabajo original de 1972).

En un trabajo más reciente (PÉREZ-GARCÍA & *al.*, 2008) se demuestra cómo semillas ortodoxas de otras doce familias tienen un comportamiento análogo, con lo que no solamente las crucíferas pueden conservarse a largo plazo con el método del gel de sílice.

Este mismo método se ha venido utilizando desde los años 80 por un puñado de bancos pequeños, sobre todo dedicados a especies silvestres. Con respecto a los bancos de especies cultivadas, el factor limitante que suponía el escaso espacio disponible dentro de las ampollas de vidrio, se puede salvar desde que se detectaron envases más grandes y suficientemente herméticos (www.seedcontainers.net). Con ello, el método resulta plenamente aplicable, con todas sus ventajas, para todos aquellos bancos que deseen permutar sus actuales sistemas a medio plazo por una verdadera conservación a largo plazo.



Entre Julio de 2006 y Julio de 2008 el profesor César Gómez-Campo impartió 45 talleres en 16 países para explicar con detalle el método del ultrasecado, financiados por el Grupo Santander y la Fundación Marcelino Botín. Participaron en ellos casi 800 especialistas de bancos de germoplasma de todo el mundo.

7. Conservación *in vitro* y criopreservación

7.1 La necesidad de nuevas herramientas de conservación

El objetivo primero de los métodos de conservación *ex situ* debe ser asegurar la supervivencia de los recursos genéticos vegetales que de otra manera desaparecerían. En muchas circunstancias, las colecciones de campo o invernadero resultan costosas de mantener, requieren mucho espacio y resultan muy sensibles a los cambios ambientales. Además, estas colecciones no presentan una opción de conservación a largo plazo en comparación con los bancos de semillas. Han sido estos problemas los que condujeron hace unos treinta años a la consideración de una estrategia alternativa basada en la tecnología *in vitro*. En este sentido, la investigación ha ido encaminada a modificar las técnicas básicas ya existentes de cultivo de ápices de tallo de manera que se pudieran reducir tanto las tasas de crecimiento de los explantos como los costes de mantenimiento de las colecciones. Esto se consiguió empleando principalmente temperaturas bajas para el almacenamiento de los cultivos. Además, el empleo de los ápices de tallo asegura el mantenimiento de la estabilidad genética de las plantas producidas por la actividad continuada de multiplicación de los meristemos del tallo, actividad que es esencialmente similar al proceso que ocurre *in vivo* (BLAKESLEY & al., 1996).

Biotecnología y conservación vegetal

El mantenimiento y propagación de especies en jardines botánicos, así como en bancos de semillas y esporas, ha supuesto tradicionalmente un valioso seguro de vida contra la pérdida de muchas especies de plantas silvestres. La biotecnología moderna ofrece el potencial de extender estos métodos tradicionales de preservación *ex situ* y propagación a un rango mucho más amplio de taxones y también de tipos de tejidos vegetales, no sólo semillas. Si bien estas técnicas se desarrollaron en principio para especies de uso agrícola u hortícola, están siendo cada vez más aplicadas para la recolección, propagación, preservación y evaluación de germoplasma procedente de especies raras y/o amenazadas (PENCKE, 1999).

La limitada cantidad de material vegetal disponible es un factor que condiciona el trabajo con especies en peligro. La capacidad de ensayar protocolos o de realizar experimentos replicados se puede ver considerablemente limitada en estos casos, por lo que con frecuencia la experiencia con especies relacionadas pero que no estén en peligro suele ser utilizada como guía. Si la especie en cuestión produce un pequeño número de semillas, entonces el uso de tejidos distintos de las semillas será el objetivo principal. Por otro lado, las plantas pueden estar localizadas en lugares remotos o de difícil acceso y las expediciones para recolectar material vegetal resultan costosas, sin olvidar el hecho de que en muchos casos se requieren permisos para la recolección y para el transporte del material recogido (PENCKE, 1999).

Integrando la biotecnología en los programas de conservación

Las herramientas de la biotecnología moderna están siendo cada vez más aplicadas para la caracterización de la diversidad vegetal e indudablemente tienen un papel principal asistiendo a los programas de conservación de plantas. Sin embargo, su valor depende de que los métodos biotecnológicos estén dirigidos eficazmente y utilizados como tecnología complementaria. Es importante reconocer que la integración efectiva de la biotecnología en los programas de con-

servación requiere una clara cooperación multi- e interdisciplinaria (BENSON, 1999).

Hay cuatro áreas principales en las que la biotecnología moderna puede asistir directamente a los programas de conservación vegetal:

- 1- Tecnología de los marcadores moleculares
- 2- Diagnóstico molecular
- 3- Cultivo de tejidos (tecnologías *in vitro*)
- 4- Criopreservación

La biología molecular, y más específicamente las técnicas de marcadores moleculares, tienen un papel clave a la hora de capacitar la caracterización de la diversidad vegetal a nivel genómico. La elucidación de estructuras de población y pautas de distribución de genes dentro de los ecosistemas suministra información que se puede utilizar para apoyar programas de conservación *in situ*. Las aplicaciones directas de las tecnologías de marcadores moleculares incluyen el asesoramiento a la hora de la recolección de germoplasma y en el diseño de bancos de genes. Un conocimiento molecular de la diversidad genética puede también asistir al proceso de toma de decisiones asociado con la conservación *ex situ* y, más directamente, facilitar el manejo de colecciones de germoplasma y de bancos de genes (ver apartado 2.3). Las tecnologías de ADN tienen también un papel importante a la hora de monitorizar la estabilidad genética del germoplasma conservado, lo que resulta esencial para que los métodos de almacenamiento puedan ser utilizados con confianza. Por otro lado, las estrategias de conservación *in situ* y *ex situ* requieren en ocasiones la transferencia de germoplasma de un lugar a otro o intercambios internacionales. En esta labor, el diagnóstico molecular basado en métodos inmunológicos y de ADN se aplica para asegurar el estado fitosanitario del material a intercambiar.

El cultivo *in vitro* de tejidos, por su parte, ha tenido un impacto capital en las estrategias de conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales. De hecho, germoplasma mantenido *in vitro* convenientemente controlado en cuanto a su estado fitosanitario se convierte en un medio excelente para el intercambio internacional de germoplasma. La micropropagación, utilizando embriones somáticos o cultivos de ápices de tallos, está asistiendo a numerosos programas de mejora vegetal y cada vez más estas técnicas se están aplicando para la conservación de especies amenazadas. Las plantas cultivadas que se propagan vegetativamente presentan problemas específicos de conservación en tanto en cuanto sus semillas no están disponibles para mantenerlas en bancos apropiados. Otro tanto ocurre con las semillas recalcitrantes, cuya expectativa de supervivencia en bancos de semillas es muy corta debido a su estricta necesidad de humedad. Aunque los bancos de genes *in vivo* aportan importantes opciones de conservación, el germoplasma mantenido de esta manera corre el riesgo de sufrir ataques de patógenos o daños por cambios en el medio ambiente. La conservación *in vitro*, combinando técnicas de cultivo de tejidos y criopreservación, surge para estos casos problemáticos como la única fórmula fiable para la conservación a largo plazo (BENSON, 1999).

7.2 La tecnología del cultivo de células y tejidos vegetales: micropropagación

7.2.1 Fundamentos morfogénéticos de la micropropagación

Como destaca LYNCH (1999), el desarrollo del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales ha sido un factor clave en el avance de nuestro conocimiento de la biología celular, la fisiología, la bioquímica y, más recientemente, de la biología molecular de las plantas. Sin embargo, la explotación de esta tecnología para propósitos aplicados se puede decir que tiene consecuencias incluso más importantes.

El cultivo de tejidos vegetales se puede definir como la *ciencia de hacer crecer células vegetales, tejidos u órganos aislados de una planta sobre medios artificialmente formulados y en condiciones asépticas*. A estas secciones o porciones que se separan de una planta para iniciar con ellos el proceso de cultivo *in vitro* se las denomina *explantos* y a la planta de la que proceden, *planta madre*.

El cultivo *in vitro* está basado principalmente en tres fundamentos principales.

- a) El concepto de *totipotencia celular*. La regeneración de individuos completos a partir de células ya diferenciadas demuestra que las células vegetales son totipotentes, es decir, retienen la totalidad de su información genética, de manera que bajo determinadas influencias externas esa célula ya diferenciada puede desdiferenciarse y reiniciar los procesos de división celular y ser conducida hasta la obtención de una planta completa.
- b) El control de la promoción de raíces y tallos por la aplicación de reguladores del crecimiento. Muchos aspectos de la diferenciación celular y la organogénesis en cultivo de tejidos están controlados por la interacción entre citoquininas y auxinas, de manera que el balance entre estos dos tipos de reguladores conduce a la diferenciación *in vitro* de raíces o tallos dependiendo de su proporción relativa.
- c) La sucesión morfogénética. Aunque en algunas especies cultivadas *in vitro* el desarrollo de tallos y raíces se produce de manera prácticamente simultánea, el uso de reguladores del crecimiento permite que la secuencia de acontecimientos sea usualmente la siguiente: proliferación de tallos, elongación y enraizamiento. No obstante, el orden de esta sucesión morfogénética también dependerá de la estrategia de regeneración seleccionada.

Prácticamente todos los tejidos vivos de la planta pueden ser cultivados con éxito *in vitro*. En una primera instancia podemos distinguir entre cultivos no organizados, en los cuales los tejidos carecen de cualquier estructura reconocible, y cultivos organizados. Por ejemplo, en el primer caso encontramos los cultivos de callos (masas de células mayoritariamente no organizadas que surgen a partir de un crecimiento no coordinado y no organizado de pequeñas secciones de tejidos), cultivos de protoplastos (células vegetales a las que se las ha desprovisto de pared), cultivos de células (poblaciones de células vegetales que se mantienen creciendo de manera aislada o en agregados de muy pocas células en medios líquidos) y cultivos de anteras, con la finalidad de obtener plantas haploides. Dentro del cultivo de tejidos organizados se incluye el cultivo de meristemas (domos meristemáticas apicales con o sin primordios foliares), ápices de tallo (estructuras usualmente más grandes que las utilizadas en el cultivo de meristemas), nudos, yemas laterales, embriones (tanto zigóticos como somáticos) y cultivo de raíces.

La micropropagación es un término general que describe una variedad de rutas para la propagación de germoplasma seleccionado utilizando técnicas *in vitro* (LYNCH, 1999). En general, se pueden obtener nuevas plantas completas a partir de cultivos de tejidos por tres de estas rutas: (a) a partir de yemas o meristemos que son estimulados a crecer y proliferar; (b) a partir de nuevos tallos inducidos en cultivos no organizados o directamente sobre tejidos separados de la planta madre; o (c) mediante la formación de embriones somáticos a partir de tejidos organizados o no organizados (embriogénesis somática). Estos embriones se asemejan a los zigóticos y pueden convertirse en plántulas de la misma manera que ellos. La ruta que normalmente provoca la más rápida multiplicación de los propágulos es la callogénesis adventicia. Sin embargo, la formación de callo puede provocar una mayor proporción de plantas no conformes genéticamente comparadas con las rutas morfogénicas que no implican formación de callo. Por tanto esa vía no es apropiada para propósitos de conservación.

La elección de una u otra estrategia dependerá de nuestros intereses concretos. Indudablemente, con fines conservacionistas, en los que la estabilidad genética es el objetivo a conseguir, la técnica de elección será la micropropagación a partir de yemas ya existentes en la planta madre.

7.2.2 Estructura de un protocolo de micropropagación

En 1974 Murashige, uno de los padres de la tecnología del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, definió tres etapas en la multiplicación *in vitro* de plantas:

- Etapa I: iniciación del cultivo en condiciones asépticas
- Etapa II: multiplicación
- Etapa III: elongación y enraizamiento

Estas etapas responden a tres fases morfogénicas fundamentales de cualquier proceso de regeneración *in vitro* y además suponen transiciones en las que frecuentemente es necesario cambiar alguna de las condiciones de cultivo utilizadas en la etapa anterior.

Posteriormente, en 1981, Maene y Debergh introdujeron una nueva etapa (etapa 0) previa a éstas que consistía en la preparación y tratamiento de la planta madre. Finalmente se reconoció asimismo la absoluta necesidad de incluir una quinta etapa (etapa IV) que se ocupe de la salida de las plantas cultivadas *in vitro* a condiciones naturales de cultivo, etapa conocida como aclimatación (MAENE & DEBERGH, 1986).

Las peculiaridades y detalles propios de cada una de estas etapas, así como su misma presencia en un determinado protocolo de micropropagación, dependerán de la especie vegetal con la que estemos trabajando, de su respuesta morfogénica, del tipo de explanto escogido y de la técnica de regeneración empleada. En cualquier caso, a continuación se comentan los principales elementos a tener en cuenta a la hora de diseñar cada una de estas fases:

ETAPA 0: Selección de la planta madre

Ésta es una etapa que aunque no trata aún con material cultivado *in vitro*, busca mejorar la respuesta y la adaptación de los explantos a las condiciones que se les aplicará a continuación. La práctica ha demostrado que seleccionar una fuente de explantos apropiada es esencial para el éxito de la micropropagación. En el caso de especies en peligro de extinción, si hay dispo-

nibilidad de semillas, es preferible utilizarlas para mantener la máxima diversidad genética. Con ellas se realiza una germinación *in vitro* que genera plántulas estériles que entonces se pueden utilizar para iniciar la micropropagación. Pero en muchos casos esto no es posible y nuestro material de partida es la planta completa. Entonces debemos escoger una planta exenta de cualquier síntoma aparente de enfermedad y que sea un representante característico de la especie. Material juvenil y tejidos en crecimiento activo serán los explantos preferidos para iniciar el cultivo ya que de ellos se espera que tengan una mejor respuesta *in vitro*.

Entre las actuaciones que podemos llevar a cabo en relación con la planta madre para mantenerla en buenas condiciones figuran el control de la iluminación, el fotoperiodo y la temperatura, siempre que sea posible trasladar algunos individuos a una cámara de cultivo o un invernadero controlado. El empleo de los reguladores de crecimiento es otra opción para aumentar la formación de tallos.

A la hora de la selección de explantos hay que tener en cuenta que el crecimiento y morfogénesis que manifiestan los tejidos cultivados *in vitro* se ven influidos por muchos factores, por lo que resulta útil atender algunas recomendaciones:

- *Genotipo*. Es probablemente una de las restricciones más importantes en cultivo de tejidos. La germinación *in vitro* es una buena aproximación para asegurar la diversidad genética del material. Si no hay semillas o son pocas, se deben recolectar tejidos procedentes de diferentes genotipos.
- *Edad de la planta, estado fisiológico y grado de diferenciación del tejido*. La edad de los tejidos explantados es otro factor que influye en el éxito del cultivo. Plantas o tejidos juveniles en crecimiento activo son los explantos preferidos para iniciar los cultivos.
- *Tamaño*. Se acepta en términos generales que explantos más grandes sobreviven mejor y exhiben mejores tasas de regeneración que explantos más pequeños. Los explantos muy pequeños no sobreviven bien en cultivo pero tienen la ventaja de que con ellos aumenta la posibilidad de eliminar los virus en cultivos sucesivos. Por otra parte, explantos grandes pueden ser más difíciles de esterilizar de manera eficaz. Los resultados obtenidos en este caso dependerán de la especie.
- *Medios de cultivo*. Los tejidos vegetales solo crecerán *in vitro* si se les suministra un medio específico que cubra sus necesidades. Tanto el tipo y características del medio de cultivo como los suplementos necesarios relativos a reguladores de crecimiento o vitaminas pueden requerir un ajuste de acuerdo al tamaño del explanto y la especie. En la actualidad hay numerosas formulaciones de medios de cultivo disponibles comercialmente. La más popular de todas ellas es, sin duda, la desarrollada por MURASHIGE & SKOOG (1962). Este medio, conocido como MS, es de uso universal y la primera opción elegida cuando comenzamos a trabajar con especies que no han sido propagadas *in vitro* con anterioridad. No obstante, hay que tener en cuenta que a pesar de su éxito, el medio MS se caracteriza por una considerable concentración de sales, comparado con otras formulaciones. Por ello, en el caso de plantas que se muestren sensibles a la sal, se puede optar por diluir el propio medio MS o bien cambiarlo por otro con menor contenido en sales. Otra característica relevante de los medios de cultivo es la presencia de sacarosa, que se emplea como fuente de carbono para los tejidos vegetales, en una concentración que usualmente varía entre 2-3%. La consistencia de los medios de cultivo también

puede variar según las aplicaciones, desde medios líquidos a sólidos mediante la inclusión de un agente gelificante como el agar en una concentración entre 6 y 7 gramos por litro para los medios sólidos.

- *Pardeamiento*. Cuando se cultivan explantos por primera vez (en ocasiones también ocurre en los sucesivos subcultivos), pueden aparecer *pardeamientos*, como consecuencia de la producción de polifenoles, taninos o peroxidación de lípidos durante la excisión del explanto o el proceso de esterilización aplicado. Estas reacciones pueden provocar una reducción de la viabilidad de los explantos o incluso la muerte de las células. El pardeamiento se puede prevenir añadiendo al medio de cultivo soluciones antioxidantes, carbón activo, etc. Una alternativa sencilla y asequible se basa en mantener los explantos creciendo en condiciones de baja intensidad luminosa u oscuridad durante 3-7 días tras el inicio del cultivo.

ETAPA I: Establecimiento de un cultivo axénico

Una vez seleccionada la fuente de explantos, el siguiente paso es el inicio o establecimiento del cultivo axénico, es decir un cultivo selectivo en el que vamos a procurar que sólo proliferen nuestra planta y se elimine, por tanto, toda la flora microbiana y/o fúngica que pudiera acompañar a nuestros explantos, para lo cual hay que recurrir al empleo de métodos apropiados de esterilización. Ésta es probablemente una de las etapas más críticas de la micropropagación. Trabajar en condiciones asépticas es una de las características distintivas de estas técnicas y ofrece sin duda importantes ventajas a efectos de generar un crecimiento vigoroso en las plantas y un estado fitosanitario satisfactorio. Sin embargo, el riesgo de contaminación bacteriana o fúngica es alto, lo que puede provocar importantes pérdidas del material en cultivo.

Para poder trabajar en condiciones asépticas todos los materiales que participan en la manipulación del material vegetal y de los medios de cultivo han de estar perfectamente esterilizados. Pero también lo ha de estar el propio material vegetal que va a iniciar el cultivo *in vitro*, es decir, los explantos. Desde un punto de vista funcional, para la esterilización de explantos se puede utilizar una gran variedad de compuestos químicos:

- Sustancias oxidantes
- Sustancias bacteriostáticas, que inhiben el crecimiento bacteriano
- Sustancias bactericidas, que eliminan las bacterias
- Sustancias antifúngicas, tanto fungistáticas como fungicidas
- Sustancias antimicrobianas de amplio espectro, que inhiben o eliminan tanto bacterias como hongos
- Sustancias antivirales

Para que cualquiera de las sustancias incluidas en las categorías anteriores sea un buen agente esterilizante, debería reunir al menos las siguientes características:

- Ser soluble en agua
- Ser estable en solución
- Que no se vea afectada por el pH del medio de cultivo (usualmente en torno a 5,5) o sea incompatible con alguna de las sales que lo componen

- Que resulte barata y de fácil obtención
- Que no muestre fitotoxicidad
- Que sea de amplio espectro

Esta etapa se considera superada satisfactoriamente cuando un número adecuado de explantos sobreviven sin contaminación bacteriana o fúngica. Un protocolo básico de esterilización de explantos como los utilizados rutinariamente en un laboratorio se presenta en la Tabla 9.

1	Lavar el material vegetal en agua corriente varias veces
2	Mantener los explantos 1h en agua + 1 ml lejía comercial/l + 2 gotas de detergente líquido/100 mL en agitación continua
3	*Aclarar varias veces con agua estéril en un frasco esterilizado previamente en autoclave
4	*Lavar con etanol al 70% (v/v) durante 30 segundos
5	*Transferir a una solución de lejía comercial al 10% (v/v) + un agente tensoactivo como el Tween-20 al 0,1% (v/v) y mantener durante 15 minutos
6	*Lavar 4-5 veces con agua destilada estéril
7	*Transferir al medio de cultivo

Tabla 9. Protocolo básico de esterilización de explantos vegetales (Se indican con * las etapas que se llevan a cabo en la cabina de flujo laminar).

Partiendo de un esquema de esterilización como éste se puede modificar el tipo de agente esterilizante utilizado, su concentración o el tiempo de exposición a los mismos, de acuerdo con la naturaleza de cada explanto y con la eficacia del método aplicado. Conviene tener en cuenta que tanto la concentración del compuesto o los compuestos esterilizantes utilizados como el tiempo de exposición deben estar perfectamente dimensionados y controlados para no afectar a la viabilidad de los explantos.

ETAPA II: Multiplicación

Una vez establecido el cultivo axénico *in vitro* y descartados todos aquellos cultivos contaminados, se iniciará la etapa II, cuyo objetivo es aplicar las condiciones necesarias para aumentar el número de explantos que puedan ser individualizados y de cada uno de ellos originar una nueva planta completa. Mediante esta fase es posible multiplicar por un número teóricamente ilimitado cada uno de los explantos con los que se inició el proceso. Estos nuevos explantos, o propágulos, podrán a su vez ser utilizados para continuar el ciclo de multiplicación o bien ser dirigidos hacia la etapa siguiente de regeneración.

La multiplicación de los explantos suele ser dependiente de la adición al medio de cultivo de reguladores del crecimiento vegetal. Así, las concentraciones relativas de auxinas y citoquininas son las encargadas de regular en la mayoría de los casos este proceso. En términos generales las citoquininas son muy eficaces a la hora de la promoción de la iniciación de ta-

llos, ya que reducen la dominancia natural de las yemas apicales. Se pueden utilizar solas o en combinación con auxinas. Por otra parte las auxinas se emplean para la inducción de raíces. Por lo tanto, la presencia de citoquininas, o una relación alta citoquininas/auxinas, es lo que se requiere para la formación de tallos. Por el contrario, auxinas, o una relación baja citoquininas/auxinas, es lo requerido generalmente para la inducción de raíces.

Una última consideración está relacionada con el uso de los reguladores de crecimiento. Es muy importante tener en cuenta su concentración y el tiempo de exposición. Ambos factores, directamente relacionados entre sí, determinan la eficacia del tratamiento que se busca. Se ha descrito que altas concentraciones de citoquininas pueden generar problemas en los explantos tales como hiperhidratación, variación somaclonal o formación de callo, alteraciones que en la medida de lo posible habrá que evitar siempre que nuestro objetivo sea estrictamente conservacionista. La longitud y morfología de los nuevos tallos generados durante esta fase es muy importante ya que han de servir como material de partida para la siguiente fase siendo capaces de sobrevivir sin problemas. Por esta razón el uso de reguladores de crecimiento debe ser el adecuado para dar no sólo la más alta tasa de multiplicación, sino para que cada uno de los tallos que se generan sean de la máxima calidad posible.

ETAPA III: Elongación y enraizamiento

El objetivo de esta etapa es que los explantos que se han obtenido en la fase anterior experimenten un aumento en longitud y posteriormente comiencen a formar raíces (Tabla 10). La inducción y crecimiento de raíces puede realizarse de dos maneras: *in vitro* o *ex vitro*. En el segundo caso la formación de raíces tendrá lugar fuera del ámbito del cultivo *in vitro*. Para ello, a los tallos micropropagados se les aplica una disolución concentrada de auxina o un periodo corto de cultivo en un medio suplementado con auxinas antes de transplantarlos a una mezcla de suelo. En el caso del enraizamiento *in vitro*, los tallos procedentes de la etapa II son tratados con auxinas y transferidos a un medio libre de esta hormona para permitir el desarrollo radicular y posteriormente se transfieren los tallos a una mezcla de suelo. En el caso del enraizamiento *ex vitro*, las concentraciones de auxina que se emplean suelen ser superiores a la requerida si seguimos un enraizamiento *in vitro*.

1.	Escoger la estrategia de enraizamiento que vamos a aplicar a nuestros explantos, basándonos en la bibliografía o en nuestra propia experiencia previa
2.	Aislar tallos procedentes de la etapa II
3.	Inducir la elongación de los tallos cultivándolos en un medio sin reguladores de crecimiento (preferido) o con diferentes niveles de ácido giberélico (GA ₃)
4.	Diseñar los experimentos para optimizar la inducción de raíces mediante una matriz de tratamientos combinando 1 ó 2 auxinas distintas y al menos 3 concentraciones

Tabla 10. Esquema básico de la etapa III en un protocolo típico de micropropagación.

La fase de enraizamiento de los explantos puede ser sustancialmente mejorada introduciendo algunos cambios en la composición del medio con respecto al utilizado en la etapa anterior. Así, la sacarosa o la concentración de sales son los componentes principales cuya variación puede mejorar la tasa de enraizamiento o la calidad de las raíces formadas (SHA VALLI KHAN *et al.*, 1999; GONÇALVES *et al.*, 2005).

ETAPA IV: Aclimatación

Esta es la última etapa de cualquier proceso de regeneración de plantas por técnicas de cultivo *in vitro*. Con ella pretendemos adaptar progresivamente las plantas a las condiciones ambientales de campo abierto (Tabla 11). Esta etapa resulta crítica en la mayoría de los protocolos de micropropagación de plantas, ya que generalmente las plantas regeneradas *in vitro* son muy sensibles a condiciones ambientales no controladas, principalmente la intensidad luminosa y la humedad relativa.

Las razones que justifican la importancia de esta etapa son varias y todas tienen que ver con el peculiar ambiente al que hemos sometido a las plantas durante todo el periodo que ha durado su regeneración *in vitro* y que ha inducido cambios sustanciales, a su vez, en su fisiología y en su anatomía, con respecto a plantas crecidas en condiciones naturales. Las plántulas *in vitro* se desarrollan bajo una intensidad luminosa comparativamente más baja que en condiciones de campo abierto. Además, la humedad relativa a la que se desarrollan durante el periodo *in vitro* se sitúa en un valor cercano al 100%. En último lugar también tiene una sustancial trascendencia el hecho de que los medios de cultivo sobre los que se han ido desarrollando las plantas contienen una proporción de azúcares (sacarosa) considerablemente elevada.

Las consecuencias de estas condiciones son: una reducción en la concentración de pigmentos fotosintéticos, y por lo tanto una mayor susceptibilidad al estrés causado por una intensidad luminosa normal y la carencia o reducción sustancial de ceras naturales en la cubierta, que normalmente protege a la epidermis de las plantas de la desecación. Por último, la competencia fotosintética de las plantas regeneradas *in vitro* es también una característica muy importante que se ha de desarrollar durante la aclimatación. Las plántulas creciendo *in vitro* en un medio suplementado con sacarosa satisfacen sólo una mínima parte de sus demandas energéticas mediante su propia fotosíntesis que, además, se ve dificultada por el pobre intercambio gaseoso que generalmente ocurre entre el recipiente de cultivo (generalmente un tubo de ensayo) y la atmósfera que le rodea. La aclimatación también supondrá para las plántulas, entonces, la transición hacia un modo de nutrición completamente autótrofo.

- | | |
|----|---|
| 1. | Tomar las plántulas procedentes de la etapa III, lavar cuidadosamente las raíces para remover cualquier traza de medio o agar que pueda suponer una fuente importante de contaminación |
| 2. | Transferir las plántulas a recipientes apropiados con una mezcla de turba: vermiculita (1:1) |
| 3. | Regar las plantas inmediatamente y colocarlas en el interior de contenedores especialmente adaptados a este fin. Mantenerlas en condiciones de baja intensidad luminosa y alta humedad relativa en el interior de una cámara de crecimiento |

4.	Ir reduciendo progresivamente la humedad relativa ventilando los contenedores y aumentar progresivamente la intensidad luminosa
5.	Transferir a macetas y exponer a condiciones ambientales naturales

Tabla 11. Esquema básico de la etapa IV en un protocolo típico de micropropagación.

7.2.3 La conservación IN VITRO en el mundo

La mayoría de centros internacionales de germoplasma utilizan ya la conservación *in vitro* como el método elegido principalmente para especies de interés agrícola que se propagan vegetativamente, aunque también se está comenzando a extender a especies silvestres, de interés ecológico o plantas amenazadas o en peligro de extinción (BENSON, 1999; PANIS & al., 2001; VOLK & WALTERS, 2003; HARVENGT & al., 2004; POPOV & al., 2006). Entre los centros más representativos dedicados a ello, se pueden mencionar los siguientes:

- *Nacional Seed Storage Laboratory* (NSSL), Fort Collins, Colorado, USA: 104 accesiones de *Pyrus*.
- *The National Clonal Germplasm Repository*, Oregon (USA).
- *The International Potato Centre* (CIP), Lima (Perú): 197 accesiones de patata.
- *The International Institute of Tropical Agriculture* (IITA), Nigeria.
- *The National Bureau for Plant Genetic Resources* (NBPGR), India.
- *Tissue Culture BC Research Inc.*, Vancouver (Canadá): 5000 accesiones representando 14 especies de coníferas.
- *ORSTOM, Montpellier* (Francia): 80 accesiones de palmera de aceite.
- Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ), Braunschweig (Alemania): 219 accesiones de variedades tradicionales de patata.
- Laboratorio de Mejora de Cosechas Tropicales (Universidad Católica de Leuven), Heverlee (Bélgica): 38 accesiones de banana.
- *Association Forêt Cellulose* (AFOCEL) *Biotechnology Laboratory*, Nangis (Francia) y *Niedersächsische Forstliche Versuchsanstalt* (NFV-C), Staufenberg-Escherode (Alemania): 444 clones de olmos.
- Criobanco del *Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences*, Moscú (Federación Rusa): 24 líneas celulares de 15 especies de plantas medicinales raras y plantas agrícolas.
- *Nacional Plant Germplasm Clonal Collections, National Center for Genetic Resources Preservation*, Colorado (Estados Unidos): 28000 accesiones de especies de interés económico.

De la misma manera, muchos jardines botánicos y grupos de investigación están implicados también en la conservación *in vitro* de plantas silvestres (SARASAN & al., 2006), como es el caso de:

- *The Royal Botanic Gardens, Kew* (Reino Unido), cuya unidad de micropropagación mantiene material procedente de más de 3000 taxones procedentes de todo el mundo, la mayoría de los cuales son plantas amenazadas.

- *Kings Park & Botanic Garden*, Perth (Australia), especializado en la conservación de flora amenazada de Australia, ha desarrollado técnicas para la micropropagación de 200 especies que representan 33 familias de plantas australianas.
- *Mount Annan Botanic Gardens*, New South Wales (Australia), que han propagado 17 especies amenazadas de *Grevillea*.
- *The Plant Conservation Research Group at University of Abertay* (Reino Unido), que está aplicando la micropropagación y otras técnicas de propagación convencional para la conservación de plantas nativas escocesas.
- *The Cincinnati Zoo and Botanic Garden*, Ohio (USA), quienes están investigando la conservación *in vitro* de alrededor de 30 especies de plantas amenazadas americanas.
- *The Tropical Botanic Gardens and Research Institute in Kerala* (India), que ha estudiado la conservación *in vitro* de 46 plantas medicinales y 30 orquídeas.
- El *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada*, Valencia (España), especializado en la conservación de la flora valenciana amenazada, donde se han desarrollado técnicas de cultivo para la mayoría de las especies amenazadas de la Comunidad Valenciana.
- El *Jardín Botánico de Córdoba* (España), especializado en la conservación de la flora andaluza amenazada, ha desarrollado técnicas de cultivo para al menos una decena de plantas amenazadas de Andalucía.
- La *Universidad Politécnica de Madrid* (España) ha desarrollado protocolos de conservación *in vitro* de numerosas especies ibéricas amenazadas, conservando actualmente poblaciones *ex situ* de geófitos.

7.3 La tecnología de la criopreservación

7.3.1 Introducción

La conservación *in vitro* de germoplasma vegetal no sólo se sustenta en el establecimiento y propagación de material vegetativo a través de las tecnologías de multiplicación *in vitro* que acabamos de repasar, sino también en los avances realizados en *criobiología*. La *criobiología* es la disciplina que estudia los efectos de las temperaturas extremadamente bajas (usualmente -196°C , correspondiente a la temperatura del nitrógeno líquido) sobre los sistemas biológicos. La traslación de esta disciplina al terreno práctico ha generado ya numerosas metodologías que permiten hoy día el mantenimiento de células, tejidos y órganos vegetales a tales temperaturas y que colectivamente se reúnen bajo la denominación de *crioconservación* o *criopreservación*.

A efectos prácticos, es conveniente dividir el concepto de “bajas temperaturas” en tres rangos de muy distintas consecuencias e implicaciones para los sistemas biológicos: *i*) bajas temperaturas por encima de 0°C , que bajo periodos de exposición prolongados pueden ocasionar daños a muchas células de los organismos homeotermos y de plantas sensibles al frío, siendo sin embargo perfectamente tolerados por un amplio grupo tanto de plantas como de animales sin ningún problema; *ii*) temperaturas entre 0 y -40°C , rango usual de congelación, el cual es naturalmente tolerado por un grupo mucho más estrecho de organismos; y *iii*) temperaturas por debajo de -40°C que ya caen dentro de la consideración de temperaturas criogénicas. La exposición prolongada a condiciones criogénicas no es en sí peligrosa, ya que en tales condiciones la dinámica celular progresa a una velocidad que es virtualmente cero. Por lo tanto, si las células soportan la transición hasta las temperaturas criogénicas sin daño, y aquí radica el objetivo principal de la criopreservación, entonces es ya poco probable que sufran algún problema, siempre que la temperatura se mantenga estable durante todo el periodo de almacenamiento (WOLFE & BRYANT, 2001).

Aunque hay opciones distintas, la criopreservación en el caso de las plantas utiliza por lo general las temperaturas del nitrógeno líquido (-196°C) o de sus vapores (alrededor de -150°C). De esta manera estamos ante una herramienta tremendamente poderosa de conservación a largo plazo, ideal para la preservación de los recursos genéticos vegetales en general y en particular para aquellos que no pueden ser mantenidos mediante métodos convencionales empleados en los bancos de semillas. La criopreservación está especialmente indicada para las semillas recalcitrantes de especies raras, amenazadas o en peligro de extinción, para la conservación de germoplasma de especies que se propagan vegetativamente, así como para algunos productos biotecnológicos de alto nivel, como los constituidos por líneas celulares para la obtención de sustancias farmacológicas, clones seleccionados o material modificado genéticamente (ENGELMANN, 2004; GONZÁLEZ-BENITO, 1998; HARVENGT & *al.*, 2004; HIRANO & *al.*, 2005; PANIS & *al.*, 2001).

7.3.2 Bases teórico-prácticas de la crioconservación

El objetivo de cualquier protocolo de criopreservación es evitar la formación de hielo intracelular. De toda el agua que contienen las células y tejidos vegetales aproximadamente un 95% es “congelable”, es decir es agua “libre”, susceptible de sufrir congelación y por tanto provo-

car daños intracelulares. El control del estado del agua durante el descenso de temperatura se convierte, entonces, en uno de los factores clave a la hora de implementar cualquier técnica de criopreservación.

La congelación de las células y tejidos es peligrosa por varias razones (WOLFE & BRYANT, 2001):

- Cuando una solución se congela, el hielo que se forma es prácticamente puro y además como disolvente resulta muy deficiente, por lo que el agua líquida restante queda como único disolvente para todos los solutos celulares. Esto hace que la concentración de estos solutos aumente según desciende la temperatura, alcanzando niveles que pueden resultar tóxicos. Altas concentraciones de electrolitos afectan a las interacciones iónicas incluyendo aquellas que ayuda a estabilizar los enzimas, provocando por ejemplo la desnaturalización de las proteínas. Además, el agua y el hielo interactúan de manera diferente con superficies hidrofílicas, lo cual es importante ya que es precisamente la tensión superficial del agua (efecto hidrofóbico) la que ayudan a mantener el estado original de los enzimas.
- Los daños físicos directos ocasionados sobre la estructura celular por los cristales de hielo.
- Los daños mecánicos directos que se provocan por la expansión volumétrica de las células que acompaña a la congelación.

En la naturaleza, algunas especies de plantas han adoptado sistemas que minimizan la formación de cristales de hielo a temperaturas por debajo de 0°C mediante la síntesis de sustancias específicas (azúcares, prolina, proteínas) que hacen descender el punto de congelación de los líquidos intracelulares, obteniendo de este modo la denominada capacidad de subenfriamiento (ATICI & NALBANTOGLU, 2003; GRIFFITH & YAISH, 2004). Cuando se desciende rápidamente a la temperatura del nitrógeno líquido, se puede evitar la formación de hielo mediante una deshidratación controlada de las estructuras celulares, utilizando diversos mecanismos. En este caso (enfriamiento rápido de soluciones muy concentradas) se produce la vitrificación. La vitrificación es el proceso físico de solidificación no cristalina del agua durante el cual se produce la transición de una solución acuosa a un estado amorfo y vítreo (PANIS & *al.*, 2001).

El desarrollo de un protocolo específico de crioconservación implica tener que seguir las siguientes etapas:

- Pretratamiento.
- Crioconservación.
- Recuperación post-congelación.

Considerando que la crioconservación se puede aplicar a cualquier tipo de material biológico, desde semillas hasta ápices meristemáticos, pasando por células, callos, polen, embriones somáticos, etc., la necesidad de que en cada protocolo específico estén representadas todas las fases anteriores, dependerá del tipo de material a conservar.

Pretratamiento

Son las manipulaciones del germoplasma antes de proceder a la crioconservación, incrementando la supervivencia del material después del enfriamiento al mejorar su respuesta después

de los tratamientos crioprotectores. Los pretratamientos más comunes son: (1) exposición de los tejidos de plantas de climas templados a un régimen de aclimatación a bajas temperaturas; (2) aplicación de agentes osmóticos que reducen el contenido en agua antes de la congelación; (3) precultivo de los tejidos en sustratos que contienen compuestos antiestrés como, por ejemplo, la prolina o el ácido abscísico (BENSON, 1999).

Crioconservación

Como se ha dicho con anterioridad, la presencia de agua resulta perjudicial tanto para la conservación tradicional como para la crioconservación. Por este motivo se han desarrollado diversas estrategias de crioconservación para reducir al mínimo el contenido de humedad de los tejidos o hacer que el agua tenga menos tendencia a formar cristales, antes de realizar la inmersión en nitrógeno líquido. La elección de una determinada estrategia estará condicionada fundamentalmente por el tipo de material que se debe crioconservar (células, callos, ápices meristemáticos, embriones tanto somáticos como zigóticos, o semillas).

El primer protocolo desarrollado para los tejidos vegetales hidratados (WITHERS & KING, 1980) se basaba en un enfriamiento lento inicial de las muestras (a una tasa de $0,5 - 2^{\circ}\text{C min}^{-1}$) en una solución crioprotectora que suele contener dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración entre el 5 y el 15%. Cuando el material alcanza la temperatura de -40°C se considera que la solución intracelular está lo suficientemente concentrada para vitrificar antes de la posterior inmersión en nitrógeno líquido. Hoy en día este método está en gran parte sustituido por otras técnicas alternativas, debido fundamentalmente al elevado coste del instrumental necesario para el enfriamiento programado. Se utiliza sobre todo cuando se crioconserva material indiferenciado, como suspensiones celulares o callos.

Recuperación post-congelación

La etapa de descongelación suele presentar pocas exigencias. Generalmente el germoplasma se extrae del contenedor criogénico donde ha sido conservado en nitrógeno líquido y se introduce en un baño a $25-30^{\circ}\text{C}$, o simplemente se deja a temperatura ambiente (BENSON, 1999). Sólo en el caso de que el protocolo de crioconservación utilizado incluya la vitrificación se debe incluir una etapa de descarga o eliminación de la sustancia vitrificante tras la descongelación del germoplasma. Para este fin, por ejemplo, los explantos se mantienen en un medio con sacarosa 1,2 M durante una hora y a continuación se transfieren a medio normal para su reactivación.

7.3.3 Protocolos de criopreservación

Vitrificación

Se trata, probablemente, de una de las técnicas que más se ha desarrollado en plantas en los últimos años. Conceptualmente, la vitrificación es la conversión de un líquido en un sólido amorfo, no cristalino, mediante el aumento de su viscosidad, mientras que el término congelación hace referencia al proceso según el cual un líquido solidifica en un estado cristalino o parcialmente cristalino (FAHY, 1988). En esta forma el agua no posee una estructura cristalina y por lo tanto no forma cristales de hielo. La vitrificación ocurre cuando la concentración de

solutos de un sistema biológico se hace tan alta que su viscosidad evita la formación y posterior crecimiento de cristales de hielo. Las soluciones vitrificantes son soluciones concentradas de sustancias como etilenglicol, DMSO, polietilenglicol, glicerol, generalmente combinadas también con una alta concentración de sacarosa. El proceso generalmente comienza con el cultivo del material vegetal en un medio enriquecido con una agente crioprotector como por ejemplo el sorbitol 1.2 M durante 1-2 días. Posteriormente, el material se introduce en una solución vitrificante (por ejemplo la solución PSV2 de SAKAI & al. (1990) formada por glicerol al 30% (p/v), etilenglicol al 15% (p/v), dimetilsulfóxido al 15% (p/v) y sacarosa 0,4 M) y se mantiene en hielo durante 20-120 minutos. Tras el tratamiento con la solución vitrificante el material vegetal se introduce directamente en nitrógeno líquido. Este protocolo provoca la vitrificación tanto intracelular como extracelular (BENSON, 1999; ENGELMANN, 2004). El método de vitrificación de plantas fue utilizado por primera vez por URAGAMI & al. (1989) y actualmente sigue siendo, con mucho, el protocolo de crioconservación más utilizado. Probablemente su éxito se pueda atribuir a su sencillez, a su alta repetitividad y al hecho de que puede aplicarse con buenos resultados a gran variedad de tejidos y especies vegetales (ENGELMANN, 2004).

Para que las células vitrifiquen es preciso cumplir dos requisitos: *i*) una tasa de enfriamiento muy alta; y *ii*) conseguir, como se acaba de indicar, una solución intracelular altamente concentrada. Para el primer requisito se suele recurrir a la inmersión directa en nitrógeno líquido, mientras que para el segundo existen distintas opciones, como son: a) secado por aire; b) deshidratación por congelación; c) aplicación de sustancias crioprotectoras o d) adaptación metabólica al frío (PANIS & LAMBARDI, 2005).

- a) La *deshidratación por aire* es el método más fácil y simple para reducir el contenido de agua en los tejidos hidratados. Generalmente, las muestras se secan bajo un flujo de aire estéril en una cabina de flujo laminar. Un método más accesible consiste en la desecación del material vegetal con una determinada cantidad de gel de sílice (URAGAMI & al., 1990). Este método se aplica directamente a semillas ortodoxas, embriones zigóticos y al polen de diferentes especies. Se ha experimentado con éxito una metodología de deshidratación ultrarrápida para embriones zigóticos de semillas recalcitrantes de algunas especies entre las que se encuentra *Quercus robur* L. (BERJAK & al., 2000).
- b) La *deshidratación por congelación* implica la aplicación de un descenso programado de temperatura (usualmente de 0,5 a 2°C/min) que va a provocar la formación de hielo en los espacios extracelulares. Esta congelación controlada provocará que el agua restante que no se congela se va concentrando progresivamente, como comentamos al principio de este apartado, convirtiéndose en una solución hipertónica con respecto al interior de las células. Para restaurar el equilibrio osmótico el agua intracelular abandonará el protoplasto provocando la deshidratación de las células.
- c) *Aplicación de sustancias crioprotectoras*. En este caso el efecto de deshidratación que provoca el hielo extracelular descrito en el apartado anterior lo van a generar determinadas sustancias crioprotectoras por mecanismos osmóticos. Existen dos tipos de sustancias crioprotectoras: *penetrantes* y *no penetrantes*. Las penetrantes son usualmente compuestos de bajo peso molecular, fácilmente solubles en agua, de baja o nula toxicidad, capaces de penetrar fácilmente en la célula y salir de ella igualmente con facilidad. A esta catego-

ría pertenecen compuestos ampliamente utilizados como el dimetilsulfóxido (DMSO) o glicerol. Los crioprotectores no penetrantes son sustancias que van a ejercer efectos eminentemente osmóticos desde fuera de las células para provocar la salida del agua congelable intracelular. A este grupo pertenecen compuestos como el polietilenglicol (PEG), manitol, sorbitol, etc., y esta estrategia se recomienda sobre todo cuando se pretenden vitrificar células con vacuolas de gran tamaño. La mezcla de vitrificación más popular en cuanto a su uso se refiere es la conocida como PVS2 (acrónimo de *Plant Vitrification Solution 2*), una solución basada en glicerol que contiene un 30% (v/v) de este compuesto, etilenglicol al 15% (v/v), dimetilsulfóxido al 15% (v/v) y sacarosa 0,4 M (SAKAI, 1990). Tanto la duración de la exposición a PVS2 como la temperatura a la que se aplica son factores que pueden afectar a la eficacia de esta solución para proteger de la deshidratación y que por tanto habrá que optimizar en cada caso.

- d) La adaptación metabólica (eufemísticamente conocida en algunos textos en español como *endurecimiento*, traducción literal del término inglés *hardening*) es un tratamiento con el que se pretende aumentar la capacidad de los tejidos vegetales de sobrevivir al impacto de un estrés ambiental desfavorable, en este caso la congelación o la deshidratación previa necesaria para soportar la congelación. Esta adaptación se puede conseguir de múltiples formas que en todo caso habrá que ensayar para cada material, por ejemplo: el cultivo durante unas semanas previas a la congelación a temperaturas más bajas de lo normal, o bajo unas condiciones de menor duración de las horas de luz, o en presencia de algunos compuestos osmóticos a concentración moderada, o bien con la aplicación de inhibidores del crecimiento como el ácido abscísico (ABA). Con frecuencia tratamientos como los descritos en este apartado se aplican a los meristemas como paso previo a la deshidratación.

Encapsulación/deshidratación

La vitrificación constituye una interesante opción para conseguir que las células y los tejidos vegetales superen los problemas derivados de la ultracongelación. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las concentraciones de los compuestos químicos utilizados cuando se opta por una deshidratación mediada por crioprotectores puede resultar tóxica (GEORGE, 1993). Una técnica de enorme interés para la conservación, y una buena alternativa a la vitrificación, lo constituye la encapsulación seguida de deshidratación.

Este método fue desarrollado por FABRÉ & DEREUDDRE (1990) y representa una variante del método de deshidratación al aire pensado fundamentalmente para ser aplicado a ápices meristemáticos o a embriones zigóticos y somáticos. La técnica consiste en la generación de una “semilla artificial” (con un embrión zigótico o somático o con un ápice caulinar) mediante su encapsulación en esferas de alginato cálcico. Se obtiene sumergiendo el material vegetal en una solución de alginato libre de calcio; después, el material y la solución se aspiran con una pipeta y se dejan caer cuentas sobre una solución de Ca^{2+} 100 mM. El calcio provoca la polimerización del alginato alrededor del material vegetal y la consiguiente formación de la cápsula. A continuación se procede a una deshidratación osmótica mediante el cultivo de las cápsulas de alginato en una solución de sacarosa 0.75 M durante 16-72 horas, y posteriormente se dese-

can bien en la corriente de aire estéril en una capa de flujo laminar o con gel de sílice durante 3-8 horas con el fin de reducir su contenido de humedad (BENSON, 1999).

La encapsulación cuenta con la ventaja de poder incluir en la matriz de alginato compuestos nutritivos o reguladores de crecimiento que ayuden a mejorar la tasa de recuperación post-congelación (TSVETKOV & *al.*, 2006). En la Tabla 12 se representa la sucesión de etapas que hay que cumplir para abordar la conservación *in vitro* de material vegetativo.

Etapa	Comentario/ejemplo
Selección del material vegetal/explantos	Preferentemente han de ser meristemos procedentes de cultivo <i>in vitro</i> por tanto ya adaptados a este tipo de ambiente
Precultivo/adaptación metabólica	Cultivo en un medio nutritivo enriquecido con sacarosa 0.4 M durante dos semanas
Deshidratación	Vitrificación o encapsulación/deshidratación (ver texto)
Congelación	Generalmente ultra-rápida (inmersión directa en nitrógeno líquido)
Descongelación	Generalmente a temperatura ambiente o en un baño a 35-40°C
Recuperación postcongelación y valoración de la viabilidad y potencial morfogénico	Cultivo en medio nutritivo y oscuridad (opcional) durante 1-2 semanas
Transferencia a un medio de multiplicación previamente optimizado para continuar con la regeneración <i>in vitro</i>	-

Tabla 12. Resumen de las principales etapas en el desarrollo de un protocolo de criopreservación.

7.3.4 Criopreservación de semillas

La conservación a largo plazo de semillas se ha visto favorecida con la aplicación de técnicas de criopreservación, en unas condiciones tales que los procesos metabólicos de la semilla, y en particular los enzimáticos, se paralizan a causa de la ausencia de agua en estado líquido. De esta manera se puede preservar la viabilidad de semillas por un periodo potencialmente indefinido. La eficacia de esta técnica, demostrada en pruebas de laboratorio con numerosas especies, llevó a muchos investigadores a considerar la criopreservación como la única técnica actualmente disponible que asegura una conservación de semillas a largo plazo real y fiable en cualquier situación. A continuación se explican algunos de los progresos llevados a cabo en el campo de la criopreservación de semillas ortodoxas y recalcitrantes de plantas raras, endémicas o amenazadas.

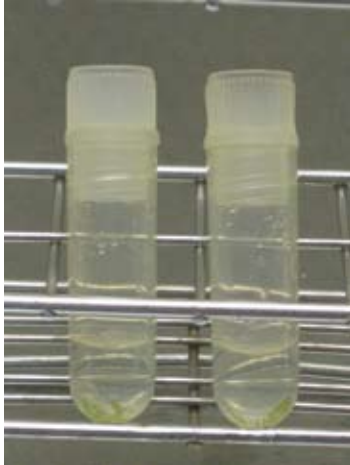


foto: J.L. Casas

Figura 7.1: Viales de polipropileno para criopreservación (*crioviales*). Se puede apreciar el material vegetal (en este caso yemas vegetativas) embebido en una solución crioprotectora antes de su inmersión en nitrógeno líquido.

Las semillas ortodoxas pueden ser deshidratadas hasta un contenido en humedad usualmente menor del 10% sin consecuencias perjudiciales. En estas condiciones las semillas pueden soportar frecuentemente la inmersión directa en nitrógeno líquido sin necesidad de pretratamiento alguno (GONZÁLEZ-BENITO, 1998; MARODER & AL., 2000; SUSZKA & AL., 2005). En estos casos las semillas se introducen en los crioviales (figura 7.1) que, a su vez, serán sumergidos directamente en nitrógeno líquido. Esta técnica se ha ensayado, por ejemplo, en especies ibéricas de las familias Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Cistaceae y Scrophulariaceae (GONZÁLEZ-BENITO, 1998; PÉREZ-GARCÍA & GONZÁLEZ-BENITO, 2008).

Las semillas recalcitrantes se caracterizan por poseer un elevado porcentaje de humedad en sus tejidos, por su sensibilidad a la deshidratación (pierden su viabilidad si la humedad desciende por debajo de ciertos niveles), así como por su sensibilidad a las bajas temperaturas. La criopreservación ha afrontado recientemente el grave problema de conservar semillas recalcitrantes, poniendo a punto algunas posibilidades para superar estas limitaciones. En estos casos, la estrategia que ha conseguido resultados más prometedores consiste en trabajar con embriones o ejes embrionarios aislados. La razón de esto es que si la semilla se sumerge directamente en nitrógeno líquido, su supervivencia tras la congelación es prácticamente nula (MARZALINA & KHRISNAPILLAY, 1999). Los embriones son estructuras más pequeñas, más resistentes a la desecación que la semilla entera y relativamente uniformes en dimensiones y contenido de humedad (FU & al., 1993); por lo tanto, pueden someterse a una deshidratación controlada (realizada, por ejemplo en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar) antes de ser introducidos en nitrógeno líquido, directamente o después de un enfriamiento progresivo. Se han realizado experimentos con resultados positivos con varias especies de *Quercus*, género que incluye especies con semillas recalcitrantes y de gran importancia en los ecosistemas templados y mediterráneos (GONZÁLEZ-BENITO, 1998), y con especies de los géneros *Arthocarpus*, *Calamus*, *Elaeis*, *Hevea*, *Nephelium* y *Shorea* (MARZALINA & KHRISNAPILLAY, 1999).

Una alternativa muy prometedora para la conservación de los embriones consiste en la encapsulación seguida de la deshidratación. En este caso los embriones zigóticos encapsulados se mantienen durante distintos periodos de tiempo en un sustrato líquido con una elevada concentración en sacarosa, después de lo cual se deshidratan parcialmente en la cabina de flujo laminar o utilizando gel de sílice y se introducen directamente en nitrógeno líquido. Algunos autores han subrayado la particular sensibilidad de los embriones de las semillas recalcitrantes a manifestar respuestas negativas antes de la extracción, acción que consiste en su separación física del resto de la semilla (BENSON *et al.*, 1996). Este fenómeno se ha observado más frecuentemente en especies tropicales y los síntomas generalmente son un rápido proceso oxidativo que afecta fundamentalmente a los compuestos fenólicos, lo que produce un ennegrecimiento de los tejidos y del sustrato que los rodea, y la consiguiente inhibición del crecimiento, que conduce a la muerte celular. Algunos autores han realizado hipótesis sobre la adición de carbón activo en el sustrato de recuperación post-congelación de los embriones, ya que esta técnica es muy eficaz para absorber compuestos fenólicos potencialmente tóxicos (NORMAN *et al.*, 1996).

La implementación de las técnicas de criopreservación ha tenido un papel fundamental en el progreso de la conservación del germoplasma de plantas raras o amenazadas. Encontramos un ejemplo de ello en algunas orquídeas en riesgo de extinción como *Bletilla striata* Rchbf. (HIRANO *et al.*, 2005). En este caso se criopreservaron las semillas inmaduras de *Bletilla*, recogidas 4 meses después de la polinización, con un porcentaje medio de humedad del 33%. Este procedimiento se realizó con un protocolo de pretratamiento y vitrificación. El pretratamiento consiste en el mantenimiento de las semillas, una vez que han sido recogidas, en un medio de tipo “New Dogashima” (ND) (TOKUHARA *et al.*, 1993) solidificado con agar al 2% y enriquecido con sacarosa 0,3 M. Las semillas se mantienen en estas condiciones a 25°C durante tres días bajo iluminación continua, a una intensidad de 62,0 mmol m⁻² s⁻¹. Después de este tratamiento las semillas se someten a la vitrificación, proceso que consiste en su introducción en *crioviales* de 2,0 ml con la solución crioprotectora (glicerol 2 M y sacarosa 0.4 M en medio ND) durante 15 minutos a 25°C. Pasado este tiempo se elimina la solución y se deshidratan las semillas a 0°C durante 2 horas con 2,0 ml de solución vitrificante PVS2 (SAKAI *et al.*, 1990), que contiene glicerol al 30% (p/v), etilenglicol al 15% (p/v) y dimetilsulfóxido al 15% (p/v) en medio ND enriquecido con 0,4 M de sacarosa y a pH 5.4. A continuación, los *crioviales* con las semillas se introducen directamente en el nitrógeno líquido.

7.3.5 Criopreservación de otro material vegetal

Criopreservación de embriones

Como ya se ha indicado, el avance en las técnicas de criopreservación ofrece en la actualidad numerosas posibilidades para conservar no sólo semillas completas sino los embriones rescatados de su semilla nativa, de especial interés en el caso de semillas recalcitrantes. Sin embargo, la experiencia acumulada en este tema es todavía insuficiente (BEARDMORE *et al.*, 1998; MARZALINA *et al.*, 1999; GOVEIA *et al.*, 2004; BEARDMORE *et al.*, 2005). En general, los protocolos diseñados hasta ahora implican la extracción del embrión zigótico en condiciones asépticas, su deshidratación parcial en la cabina de flujo laminar y su

inmersión directa en nitrógeno líquido o, alternativamente, la reducción progresiva de la temperatura a razón de -1°C por minuto hasta -40°C y a partir de ahí su inmersión en nitrógeno líquido. Otra posibilidad de conservación surge si previamente se ha diseñado un protocolo de embriogénesis somática para la especie en cuestión, es decir, de obtención de un elevado número de embriones a partir de células somáticas, con lo que se puede abordar posteriormente su criopreservación. Este ha sido, por ejemplo, el caso de *Quercus robur* L., especie a la que se ha aplicado un protocolo consistente en un precultivo de los embriones somáticos en un medio con sacarosa 0.3 M durante 3 días, seguido de la aplicación de una solución vitrificante (PVS2) durante 60-90 minutos antes de ser sumergidos en nitrógeno líquido (MARTÍNEZ & al., 2003).

Criopreservación de polen

Aunque con una finalidad dirigida principalmente a la mejora genética de plantas, hay ejemplos de especies vegetales en las que se ha conseguido preservar polen a las temperaturas del nitrógeno líquido. La aplicabilidad de esta técnica, sin embargo, depende de la tolerancia a la deshidratación del polen (TOWILL, 1981). Los datos actualmente recogidos se refieren casi únicamente al polen tolerante a la deshidratación (TOWILL & WALTERS, 2000). Como ejemplo, en el caso de algunas bromeliáceas la reducción del contenido en agua del polen mediante su inclusión en cámaras de deshidratación con gel de sílice un tiempo comprendido entre 2 y 10 horas, unido a un periodo de rehidratación de 1 hora antes de la germinación, permitió su conservación en nitrógeno líquido, resultando en porcentajes de germinación entre el 40 y el 80% según la especie (PARTON & al., 2002).

Criopreservación de material indiferenciado

Las suspensiones celulares y los callos son cultivos de tipo indiferenciado ampliamente utilizados en investigación pero también con propósitos industriales para la obtención de metabolitos secundarios de interés (SCHUMACHER, 1999; YOSHIMATSU & al., 2000) o, incluso, para la regeneración de plantas. Los cultivos en suspensión de células vegetales contienen aproximadamente un 95% de agua, lo que las hace especialmente proclives a sufrir la formación de cristales intracelulares de hielo durante la congelación. Es por esta razón por lo que la optimización de las condiciones de criopreservación se hace especialmente necesaria, sin que por el momento exista un único protocolo aplicable a las diferentes suspensiones celulares o cultivos de callos (REINHOUD & al., 2000). La investigación en este campo se centra en la optimización de los factores de los que depende el éxito de la criopreservación de este tipo de materiales: a) la fase de crecimiento en la que se encuentran las células al iniciar el procedimiento de criopreservación; b) el precultivo; c) el procedimiento de criopreservación y d) los tratamientos postcongelación.

Criopreservación de yemas durmientes

Esta técnica es probablemente una de las menos exigentes en cuanto a dedicación se refiere. Las yemas de plantas leñosas en fase de dormancia se recogen directamente en el campo entre el periodo en el que la aclimatación al frío es máxima y antes de que finalice la vernaliza-

ción. Las yemas pueden entonces ser sumergidas directamente en nitrógeno líquido o bien ser deshidratadas a un contenido en humedad del 25-30% antes de ser introducidas en nitrógeno líquido. Tras la congelación, los meristemas se diseccionan y se cultivan en un medio de recuperación apropiado. El desarrollo final de estas yemas requiere frecuentemente utilizar técnicas de microinjerto (injertos realizados sobre explantos en condiciones *in vitro*) o injerto tradicional (Reed, 2001).

Criopreservación de ápices meristemáticos

La inmensa mayoría de los protocolos de criopreservación descritos con fines de conservación de la biodiversidad emplean ápices o meristemas aislados. En este caso hay que tener en cuenta que, a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de las semillas o incluso el polen, los meristemas son estructuras que se encuentran en crecimiento activo (salvo en el caso de utilizar yemas en reposo) y altamente hidratadas. Por esta razón la utilización de meristemas para la criopreservación requiere un cuidado tratamiento previo para reducir de forma segura el contenido en agua de los tejidos y la preocupación para conseguir una tolerancia a la congelación en este caso se desvía un tanto hacia conseguir meristemas que toleren la deshidratación. Las técnicas disponibles para conseguir esta deshidratación controlada son varias aunque las más utilizadas son dos: vitrificación y encapsulación, descritas anteriormente.

La zona meristemática de las yemas apicales del tallo está compuesta por una población relativamente homogénea de células pequeñas, con citoplasma denso, pocas y pequeñas vacuolas y una relación núcleo:citoplasma alta y en división activa, lo que les confiere un mejor potencial para sobrevivir a la congelación (GEORGE, 1993). Además, el empleo de meristemas hace que el proceso de regeneración *in vitro* que los convertirá en individuos completos sea de los más estables desde el punto de vista genético, minimizando la aparición de variación somaclonal, lo cual es altamente deseable, y de hecho un requisito a cumplir, en el contexto de conservación en que se encuadra aquí la criopreservación.

Principios básicos para la organización de un laboratorio de cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales

Una instalación destinada al cultivo de tejidos vegetales *in vitro* debe ser diseñada teniendo en cuenta que parte del trabajo que se va a realizar en él requerirá condiciones asépticas. Esto condiciona fuertemente el conjunto del laboratorio ya que obliga no sólo a equiparlo con determinadas infraestructuras que normalmente están ausentes en un laboratorio de uso corriente, sino que su diseño global ha de responder a criterios cuidadosamente estructurados en cuanto a la organización interna y a la regulación del flujo tanto de personas como de materiales por el laboratorio para asegurar su eficacia.

Aunque el diseño específico, así como el tamaño y proporción de las distintas áreas de la instalación, podrán variar dependiendo de la función (básicamente investigación o producción de planta) que vaya a tener el laboratorio, existen reglas básicas esenciales en la planificación de un laboratorio de cultivo *in vitro* eficiente y funcional. Así, el orden y la limpieza se convierten, más que en ningún otro caso, en premisas inexcusables en toda la instalación, lo que se traduce directamente en que el diseño y los materiales utilizados (fundamentalmente los revestimientos de suelo y paredes) deben asegurar la exclusión del polvo exterior o, al menos, una limpieza rápida y eficaz. En este sentido el aire que ingresa a la instalación desde el exterior debe hacerse pasar a través de un filtro de partículas del aire de alta eficiencia, como un filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Air*), capaz de retener el 99,97% de las partículas mayores de 0,3 µm de diámetro del aire, lo que incluye a la mayoría de esporas de hongos y bacterias.

Cualquier laboratorio o instalación destinada al cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales se caracteriza por dos elementos diferenciales con respecto a otro tipo de laboratorios: la separación de actividades y las condiciones de asepsia anteriormente aludidas y que deberán ser aplicadas en parte de las instalaciones. Por tanto, el laboratorio debe disponer de las siguientes instalaciones básicas:

- Un área de limpieza general.
- Un área de preparación y esterilización de medios.
- Un área de transferencia estéril.
- Un área de cultivo con control ambiental.

Área de limpieza

El área de limpieza se destinará tanto a la recepción del material vegetal del campo, como a la limpieza del material de vidrio ya utilizado, así como a la eliminación de cultivos contaminados. Para ello, se debe dotar esta área de sumideros de gran volumen, zonas para escurrir el material de vidrio, así como disponer de suministro de agua bidestilada u osmotizada. Tam-

bién debe haber espacio disponible para estufas de secado o tendederos, lavavajillas automáticos, cubetas de ácidos, lavadores y secadores de pipetas, armarios de almacenaje así como un autoclave para tratar material contaminado que se ha sacado del laboratorio. Los materiales de construcción, fundamentalmente, la fontanería, deben resistir el ataque de ácidos.

Área de preparación y esterilización de medios

Aquí se procederá a la preparación de los medios de cultivo que vamos a utilizar posteriormente, así como a su esterilización. Algunos laboratorios compran medios ya preparados, de forma que sólo requieren diluirlo en el volumen de agua adecuado. Otros pueden optar por conformar el medio a partir de todos y cada uno de sus componentes. Sea como sea, siempre nos veremos obligados a añadir al medio algún componente complementario por lo que hemos de disponer de toda la infraestructura requerida para esta operación.

Además de la preparación de los medios de cultivo, en esta zona del laboratorio también se procederá a la esterilización de los diferentes elementos que posteriormente nos servirán para iniciar el cultivo *in vitro*, a excepción del propio material vegetal. Esta operación de esterilización de materiales se lleva a cabo mediante la acción del vapor de agua a alta temperatura en un autoclave. El autoclave mantiene el material a esterilizar a 121°C y 1,02 atm durante un periodo variable de tiempo, usualmente 15-20 minutos, periodo en el cual se produce la esterilización.

Como equipamiento científico básico, esta zona debe contar con balanzas analíticas, granatarios, agitadores, pH-metro, baños termostatzados y autoclaves, instrumento esencial den-



El autoclave de laboratorio permite la esterilización de numerosos elementos de los que participan en el cultivo *in vitro*.

tro del laboratorio válido para la esterilización del medio de cultivo, del material de vidrio, papel, instrumentos de disección, etc.

El área de preparación de medios debe estar vinculada con un espacio bien dimensionado para el almacenamiento tanto de productos químicos como del material de vidrio equipado con refrigeradores y congeladores para almacenar soluciones madre y medios de cultivo ya preparados, así como disponer de un suministro de agua bidestilada u osmotizada.

Área de transferencia estéril

foto: J.L. Casas



Aspecto de una cabina de flujo laminar horizontal de las comunmente utilizadas en cultivo de tejidos vegetales. Se aprecia el filtro HEPA al fondo de la cabina a través del cual el aire microfiltrado es impulsado hacia el operador.

filtro grueso de polvo situado generalmente en la parte superior de la cabina y de aquí se conduce a través de un filtro HEPA de alta eficacia. A continuación el aire es dirigido hacia abajo (flujo vertical) o hacia fuera (flujo horizontal) sobre la superficie de trabajo. El flujo constante de aire filtrado y libre de bacterias y esporas nos permite disponer de una superficie de trabajo en condiciones estériles donde podemos realizar la transferencia del material vegetal ya esterilizado a un medio de cultivo también estéril.

Todas las superficies en este área deberán ser diseñadas y construidas de manera que el polvo y los microorganismos no se acumulen y las superficies puedan ser limpiadas y desinfectadas con facilidad.

El área de transferencia estéril debe ser un lugar de tráfico restringido tanto de personas como de materiales. Idealmente debe comunicar directamente con la sala de preparación de medios, desde donde vamos a traer los materiales ya esterilizados, así como con la sala de cultivo, a donde vamos a llevar los recipientes con el material vegetal ya sembrado.

El área de transferencia estéril se convierte en el núcleo central del laboratorio. Aquí se realizarán todas las operaciones con materiales que previamente han sido esterilizados, lo que hace que sea el recinto del laboratorio en el que aplicar unas estrictas condiciones de asepsia es esencial. La opción más práctica para diseñar el área de transferencia estéril es destinar a esta función un recinto de dimensiones reducidas, sin ventanas practicables y en cuyo interior se aloja una *cabina de flujo laminar*, un equipamiento científico absolutamente indispensable para este tipo de laboratorios.

Hay dos tipos de cabinas de flujo laminar disponibles en el mercado: con flujo de aire horizontal o vertical. El funcionamiento en ambos casos es similar. El aire de la sala es forzado a entrar en la cabina a través de un primer

Área de cultivo con control ambiental

foto: J.L. Casas



Vista parcial de una cámara de cultivo diseñada “sobre obra” para la micropropagación de plantas.

Una vez sembrado el material vegetal en su medio de cultivo correspondiente y dentro del recipiente de vidrio apropiado, ha de ser trasladado al área de cultivo donde pasarán las siguientes semanas, o meses, mientras se produce el proceso de regeneración de la planta. Para ello, el área de cultivo debe asegurar un estricto control ambiental, es decir, temperatura, humedad, circulación del aire, iluminación y fotoperiodo. Estos factores ambientales influyen directamente en los procesos de crecimiento y diferenciación y condicional el progreso de la micropropagación.

El control sobre las condiciones ambientales en el área de cultivo se puede conseguir alojando en ella cámaras de crecimiento de diferentes volúmenes y capacidades, o bien diseñando “sobre obra” un buen sistema de aislamiento para una sala ya disponible y acoplado en su interior uno a uno los oportunos controles ambientales.

Usualmente, el área de cultivo para el crecimiento de tejidos vegetales debe disponer de luz suficiente para alcanzar los 10000 lux de intensidad. Esta cantidad de luz debe, igualmente, poder ser regulable ya que no siempre es necesario aplicar la misma intensidad luminosa. Además,

es necesario siempre aplicar un determinado fotoperiodo, es decir ciclos de 24 horas en los que se puede fijar a voluntad la duración del “día” y la “noche” subjetivos.

En cuanto a la temperatura, el área de cultivo debe tener capacidad para fijar una temperatura de trabajo entre 15 y 30°C, con una fluctuación de menos de +/- 0,5°C. Es recomendable que se instale un sistema de alarma que se dispare en el momento en que la temperatura sobrepasara un límite previamente fijado. Como equipamiento complementario se puede disponer de un registrador continuo de temperatura para monitorizar las fluctuaciones ocurridas en todo momento en el interior. El sistema de control de temperatura utilizado debe, finalmente, permitir realizar un *termoperiodo*, es decir un cambio de temperatura entre el “día” y la “noche” subjetivos.

Es también importante que el área de cultivo tenga un sistema de ventilación mecánica uniforme que garantice la homogeneidad de las condiciones de temperatura impuestas en el interior de la cámara de cultivo (de manera que no se generen zonas “frías” o “calientes”).

El control de la humedad relativa en el interior del área de cultivo no es estrictamente necesario (las plantas están creciendo en el interior de recipientes de vidrio cerrados) pero sí resulta recomendable, por lo que un sistema capaz de medir y regular la humedad resulta un equipamiento opcional interesante.

El área de cultivo también se ha de plantear como una zona de acceso restringido y de tráfico de personas y materiales controlado.

8. Germinación

Los ensayos de germinación son necesarios para la correcta gestión de las accesiones presentes en un banco de germoplasma, y pueden ser realizados con dos objetivos principales. En primer lugar, permiten la elaboración de un protocolo de conservación eficaz para cada taxón, en el propio banco de germoplasma o en otros que puedan utilizarlo, permitiendo cultivar la planta en un laboratorio o en un jardín botánico, y gestionarla eficazmente en un banco de semillas, facilitando a la plántula completar su ciclo vital o incluso generar nuevas semillas. Este aspecto resulta de especial interés para la elaboración de planes de reintroducción o reforzamiento poblacional, en unas condiciones de óptimo aprovechamiento de las semillas disponibles. En segundo lugar, los ensayos de germinación resultan esenciales para controlar la calidad de los lotes de semillas conservados, pues nos permiten conocer la viabilidad de las semillas a lo largo del proceso de conservación y la eficiencia de los métodos utilizados, de cara a preservar la información genética de los taxones.

En ocasiones puede suceder que las condiciones óptimas de germinación en laboratorio no coincidan con los resultados experimentales realizados en el campo para el cultivo de la especie. Estas discrepancias son a menudo imputables a diferentes causas, que pueden depender de las variaciones de temperatura, el fotoperiodo o el sustrato, además de las precipitaciones o las condiciones de humedad relativa. Para poder determinar las condiciones ideales de germinación es imprescindible conocer la ecología y hábitat de cada especie, por lo que dicho conocimiento puede ser utilizado para inferir los factores y rangos necesarios para la germinación de un taxón.

8.1 Definición de germinación

A escala fisiológica la germinación es un conjunto de acontecimientos que empieza con la imbibición de la semilla y la activación de sus procesos metabólicos pregerminativos (ej. aumento de la actividad respiratoria y la movilización de nutrientes), continúa con el alargamiento de la radícula y termina con la rotura de los tegumentos de la semilla. La germinación es un proceso irreversible, por lo que, una vez iniciada, la semilla germina o muere.

Desde un punto de vista práctico, y sobre todo observable en laboratorio, se define la germinación como la rotura de los tegumentos determinada por el alargamiento de la radícula o, en ausencia de tegumentos, un alargamiento visible de la misma (COME, 1970). El objetivo de la germinación es permitir el nacimiento de una plántula a partir de una semilla viva que se encuentra en condiciones óptimas para pasar de la vida latente a la vida activa (MUSMARRA, 1996). Los métodos oficiales de análisis de semillas pueden sintetizarse a partir de la definición del “*International Seed Testing Association*”, que dice textualmente: “*la germinación de una semilla en el ámbito de un ensayo de laboratorio es la emergencia y desarrollo de una plántula hasta un estadio en el cual el aspecto de sus estructuras esenciales indica la capacidad de desarrollarse ulteriormente en una planta aceptable en condiciones de cultivo favorables*” (ISTA, 2004).

Para que exista germinación es necesario respetar una serie de condiciones:

- La semilla debe estar viva, madura y con ausencia de dormición; cuando esté en fase de dormición será necesario seguir los pretratamientos necesarios para eliminar las inhibiciones de la germinación.
- En el laboratorio, la semilla debe someterse a unas condiciones ambientales controladas de agua, temperatura, oxígeno y luz.

8.2 Factores ambientales y germinación

A continuación se especifican los principales factores ambientales que determinan el inicio del proceso de germinación e influyen en sus fases sucesivas.

8.2.1 Humedad

Las necesidades de agua son variables de una especie a otra. Para cada especie es necesaria una determinada cantidad de agua que no debe ser superada o de lo contrario la germinación será inhibida. De hecho, en este caso el embrión entraría en condiciones de anoxia. En algunas especies, la germinación puede ser activada apenas por la humedad ambiental mientras que en otras especies (ej. plantas acuáticas, juncos, arroz) la germinación tiene lugar únicamente en el caso de que estén completamente inmersas en agua. De igual modo, si los tegumentos son impermeables al agua, la germinación no tendrá lugar hasta que esta impermeabilidad desaparezca. La disponibilidad de agua permite la activación del metabolismo que movilizará las sustancias del endospermo como fuente de energía hasta que la plántula tenga capacidad fotosintética.

La rehidratación de las semillas rompe los tegumentos con el fin de permitir el crecimiento de la radícula. En condiciones naturales, el agua del suelo no puede ser utilizada en su totalidad; en función de la naturaleza del suelo, el agua está más o menos retenida por los coloides. Un aumento de la presión osmótica del suelo obstaculiza considerablemente la germinación (por ejemplo, la incorporación de NaCl en el agua de imbibición puede ralentizar considerablemente la capacidad germinativa de una especie). Por esta razón, durante el desarrollo de un ensayo de germinación en laboratorio, el empleo de agua destilada o desmineralizada permite obtener condiciones reproducibles.

8.2.2 Temperatura

Debe ser compatible con las exigencias de la especie, actuando sobre la velocidad de las reacciones bioquímicas y también sobre la velocidad de germinación. Una temperatura inadecuada puede también inducir dormición secundaria.

Las exigencias térmicas son variables dependientes de la especie, su origen geográfico y proveniencia: algunas especies pueden preferir o requerir temperaturas muy bajas (ej. 5°C para *Tulipa* sp. pl. y *Fagus sylvatica* L.) o elevadas. Analizar la germinación a temperatura constante o bien con régimen alternado puede ofrecer resultados diferentes, tanto en el número total de semillas germinadas como en la velocidad del proceso. La ampliación del intervalo de la temperatura óptima puede variar con la especie (figura 8.1) y con el grado de dormición de las semillas. Se define como temperatura óptima aquella en que el porcentaje máximo de germinación es obtenido en el menor espacio de tiempo. Como regla general, para las especies mediterráneas, la temperatura óptima se sitúa entre 15°C y 20°C (THANOS *et al.*, 1989) mientras que las especies árticas necesitan temperaturas más bajas para germinar (BASKIN *et al.*, 1998).

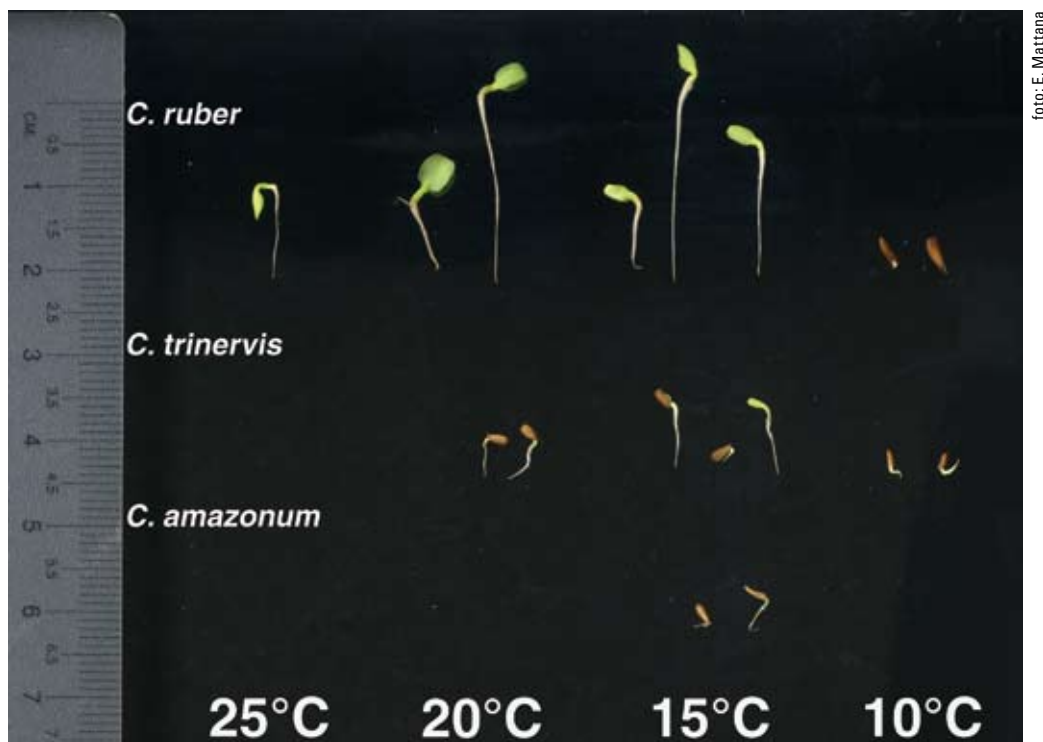


foto: E. Mattiana

Figura 8.1- Vigor germinativo de 3 especies de *Centranthus* a diferentes temperaturas.

8.2.3 Oxígeno

La disponibilidad de oxígeno es imprescindible para poder germinar aunque la cantidad necesaria del mismo es variable dependiendo de la especie. En general las especies acuáticas requieren concentraciones de oxígeno menores que las especies terrestres. Este gas es muy poco soluble en agua, con una solubilidad inversamente proporcional a la temperatura. Se trata de uno de los parámetros más difíciles de controlar en el laboratorio de un banco de germoplasma, requiriendo instrumentos específicos, generalmente muy costosos. No obstante, en condiciones normales de laboratorio no parece que éste factor resulte crítico, en relación con los ensayos de germinación, aunque es necesario tener en cuenta que pueden existir medidas más adecuadas de oxígeno para la germinación, referidas siempre al oxígeno disuelto en el agua de imbibición, ya que es el único utilizado por el embrión para sus necesidades metabólicas.

8.2.4 Luz

La luz favorece la germinación de la mayor parte de las semillas, definidas en este caso como de “fotosensibilidad positiva”. Otras semillas germinan únicamente en oscuridad (ej. *Cyclamen*), por lo que son denominadas de “fotosensibilidad negativa”. Por último, existen otras semillas

que resultan ser indiferentes a la luz. La duración de la disponibilidad de luz (fotoperiodo) y principalmente el tipo de luz son dos factores importantes en la germinación de las semillas.

El mecanismo de fotosensibilidad fue objeto de numerosos estudios en la década de los 50, que llevaron al descubrimiento de un sistema fotorreceptor: el fitocromo (BORTWICK & al. 1954; BORTWICK & HENDRICKS, 1960). Dicho sistema está constituido por un pigmento localizado en el embrión capaz de adoptar dos estructuras moleculares en función del tipo de luz que recibe. La estimulación con luz roja (660 nm) lo lleva a adoptar la forma inactiva del fitocromo que estimula la germinación, mientras que la luz del rojo lejano (730 nm) lo pasa a la forma activa inhibiendo la germinación. La estimulación del fitocromo debe ser siempre realizada con las semillas hidratadas ya que con las semillas secas el pigmento se encuentra en su forma activa. La fotosensibilidad puede apreciarse empleando luz blanca sobre las semillas intactas y frescas. Esta fotosensibilidad puede desaparecer después de la conservación en seco y en el momento en que los embriones son aislados de los tegumentos, de lo cual derivaría que tal sensibilidad proviene de los mismos tegumentos (CÔME, 1970). La influencia de la luz sobre la germinación de numerosas especies mediterráneas ha sido estudiada también por Costas A. Thanos (THANOS & al., 1991; THANOS & al., 1994; THANOS & DOUSSI, 1995). Generalmente, en las cámaras de germinación se utilizan lámparas fluorescentes del tipo “cool white” que aportan mucha radiación roja pero relativamente poca cantidad de luz del rojo lejano, con una irradiación aproximada de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En general, 2 lámparas fluorescentes de 20W, localizadas a 15-20 cm encima de las placas son suficientes para aportar la energía necesaria. Según la respuesta específica de las semillas al espectro de luz utilizado se pueden utilizar filtros de diferentes tipos para bloquear o favorecer determinadas franjas del espectro y potenciar la germinación.

Prueba experimental para determinar la sensibilidad a la luz

Como se ha indicado, la característica principal de las respuestas reguladas por el fitocromo es su reversibilidad: son activadas por longitudes de onda de 660 nm (rojo, R) e inhibidas o bloqueadas por longitudes de onda de 730 nm (rojo lejano, FR). El objetivo de esta prueba es poner en evidencia la reversibilidad de la inducción de la germinación por la luz. Los aqueños de una variedad de lechuga (*Lattuca sativa* L. 'Grand Rapids') tienen una fotosensibilidad muy marcada, que ha permitido individualizar el fenómeno. A continuación se presenta el protocolo elaborado a partir del experimento basado en las pruebas realizados por BEWLEY & BLACK (1982).

Filtros: El dispositivo permite realizar diferentes tipos de iluminación sin recurrir a una cámara oscura. Este dispositivo está constituido por dos filtros y un paño negro introducido en dos tubos concéntricos de PVC. El primer tubo (filtro rojo) permite crear una iluminación R, mientras que la superposición del segundo tubo (filtro azul) permite obtener una iluminación FR. La superposición del paño negro sobre los dos filtros determina la oscuridad. Es importante disponer antes de iniciar el ensayo de 12 dispositivos completos (cada uno dotado de dos filtros y el paño).

Preparación de las placas Petri: Preparar 2 ó 3 hojas de papel de filtro en 12 placas de 36 mm. Humedecer abundantemente con agua destilada. En la tapa de la placa, contar 10 aque-

nios. Cuando los 12 lotes están preparados, situar los aquenios sobre el papel de filtro y cubrir inmediatamente con los dos filtros y el paño, para evitar una exposición a la luz blanca.

Exposición de los aquenios: Colocar las 12 placas, cubiertas por los filtros y el paño bajo los tubos fluorescentes. Se realizarán 2 pruebas con 6 réplicas:

- Influencia del tiempo de exposición a la luz R – Retirar los paños negros de las 6 cápsulas y exponer durante dos horas a la luz con los dos filtros (iluminación FR). Para realizar la iluminación R es suficiente retirar el filtro azul durante 0, 5, 10, 20, 40 y 60 segundos, no olvidando retirar tanto el filtro como el paño al finalizar el tiempo de exposición.
- Influencia del tiempo de exposición a la luz FR – Retirar el paño negro de las otras 6 cápsulas y exponer durante 30 minutos con los dos filtros (iluminación FR). Retirar luego los 6 filtros durante 5 minutos (iluminación R). Volver a colocar el filtro azul (iluminación FR) en tiempos variables: 0, 2, 4, 10, 30 y 60 minutos. No olvidar reponer el paño negro al finalizar la exposición FR.

Germinación: Dejar las 12 placas recubiertas por dos filtros y por el paño negro durante 2-5 días a temperatura ambiente y contar el número de aquenios germinados por cápsula. Representar las dos pruebas en forma de dos curvas de germinación:

- Prueba 1: % de germinación en función del tiempo de exposición R.
- Prueba 2: % de germinación en función del tiempo de exposición FR.

8.3 Impedimentos para la germinación: dormición

Después de haber alcanzado la madurez morfológica, las semillas no sensibles a la deshidratación (ortodoxas), así como también algunas recalcitrantes de clima templado, se encuentran en un estado de vida latente; para el retorno a la vida activa, y que las semillas alcancen la madurez fisiológica, es necesario que las condiciones externas sean favorables. En muchos casos no existe dormición, cuando la madurez morfológica y la madurez fisiológica aparecen al mismo tiempo. La dormición se define como un estado en el cual una semilla viable no germina cuando se la coloca en condiciones consideradas idóneas para la germinación.

Numerosos autores han definido los diferentes tipos de dormición. Trabajos exhaustivos sobre el tema se deben a CÔME (1970), CÔME & CORBINEAU (1992) y a BASKIN & BASKIN (1998). Respecto a la clasificación de los diversos tipos de dormición, si bien por simplicidad en general se utiliza la clasificación de NIKOLAEVA (1969) actualmente parece más acertada la nueva propuesta de BASKIN & BASKIN (2004). En la clasificación de NIKOLAEVA (1969) se individualizan dos grandes grupos de dormición: de tipo endógeno y exógeno. En el primer caso, la ausencia de germinación está provocada únicamente por el embrión, mientras que en el segundo participan algunas estructuras relacionadas (endocarpos leñosos, tegumentos seminales, endospermo, etc.). Cuando la causa de la ausencia de germinación reside en los tegumentos, se habla también de inhibición tegumentaria (CÔME, 1970). Los inhibidores tegumentarios están principalmente constituidos por sustancias aromáticas o compuestos fenólicos (ej. *Apiaceae*). A menudo los tegumentos mismos pueden constituir un factor de inhibición de la germinación, obstaculizando la imbibición y el intercambio gaseoso (ej. *Fabaceae*) o impidiendo la emergencia de la radícula (ej. *Prunus* sp. pl.).

Pueden darse, además, diferentes combinaciones de dormición endógena. Las causas específicas que impiden la germinación en el ámbito de la dormición endógena o exógena, y las condiciones para romperlas, se ilustran en la Tabla 13. Si existen varias causas que provocan dormición (combinaciones de dormición), será necesario entonces realizar un pretratamiento específico para cada una de ellas.

El hecho de que algunos embriones con supuesta dormición endógena (ej. ligera o intermedia) puedan germinar fácilmente y desarrollar plántulas normales cuestiona el hecho de que este tipo de dormición sea de tipo endógeno (provocadas por el embrión) según la clasificación de Nikolaeva. Por este motivo BASKIN & BASKIN (2003B) desarrollaron un sistema de clasificación basado en 5 tipos generales de dormición:

- a) *Fisiológica*. Desarrollo reducido del embrión, que no consigue rebasar el impedimento mecánico de las cubiertas de la semilla (o del fruto).
- b) *Morfológica*. Embrión pequeño diferenciado (pero poco desarrollado) o no diferenciado. En este caso el periodo de dormición corresponde al tiempo que el embrión necesita para crecer.
- c) *Morfofisiológica*. Combinación de un embrión no desarrollado (o indiferenciado) y fisiológicamente durmiente.
- d) *Física*. La cubierta de la semilla (o fruto) posee una capa impermeable que no permite la absorción de agua.
- e) *Combinatoria (física + fisiológica)*. Semilla impermeable con embrión fisiológicamente durmiente.

Dormición exógena		
FÍSICA (A ₁)	<i>Causas</i>	Impermeabilidad de los tegumentos seminales al agua
	<i>Pretratamiento</i>	Escarificación
	<i>Ejemplos</i>	<i>Astragalus maritimus</i> Moris; <i>Astragalus verrucosus</i> Moris; <i>Robinia pseudoacacia</i> L.; <i>Laburnum anagyroides</i> Medik. s.l.
QUÍMICA (A ₂)	<i>Causas</i>	Presencia de factores inhibidores en el pericarpo (poco frecuente), en ocasiones en el exterior del fruto
	<i>Pretratamiento</i>	Extracción del pericarpo, en algunos casos funciona el lavado
	<i>Ejemplos</i>	<i>Ferula loscosii</i> (Lange) Willk.; <i>Fraxinus chinensis</i> Roxb. ssp. <i>rhynchophylla</i> (Hance) A.E. Murray; <i>Acer pseudoplatanus</i> L.
MECÁNICA (A ₃)	<i>Causas</i>	Resistencia mecánica de los tegumentos seminales al crecimiento del embrión
	<i>Pretratamiento</i>	Remoción del tegumento
	<i>Ejemplos</i>	<i>Euphorbia graminifolia</i> Vill.; <i>Eleagnus angustifolia</i> L.
Dormición endógena		
MORFOLÓGICA (B)	<i>Causas</i>	Desarrollo incompleto del embrión; sucede sólo en combinación con otros factores
	<i>Pretratamiento</i>	Estivación
	<i>Ejemplos</i>	<i>Acis nicaeense</i> (Ardoino) Lledo, A.P. Davis & M.B. Crespo
FISIOLÓGICA (C) (C ₁ – Ligera)	<i>Causas</i>	Mecanismos fisiológicos de inhibición
	<i>Pretratamiento</i>	Breves periodos de vernalización, sustancias estimulantes del crecimiento
	<i>Ejemplos</i>	<i>Linaria arcusangeli</i> Atzei & Camarda; <i>Betula pubescens</i> Ehrh.
FISIOLÓGICA (C) (C ₂ – Intermedia)	<i>Causas</i>	Mecanismos fisiológicos de inhibición
	<i>Pretratamiento</i>	Largos periodos de vernalización, giberelinas
	<i>Ejemplos</i>	<i>Nothofagus obliqua</i> (Mirb.) Oerst.
FISIOLÓGICA (C) (C ₃ – Profunda)	<i>Causas</i>	Mecanismos fisiológicos de inhibición
	<i>Pretratamiento</i>	Vernalización prolongada
	<i>Ejemplos</i>	<i>Sorbus aucuparia</i> L.

Combinaciones de dormición endógena morfo-fisiológica (desarrollo incompleto del embrión combinado con mecanismos fisiológicos de la inhibición de la germinación)		
(B+C)	<i>Causas</i>	Inhibición morfológica y fisiológica
	<i>Pretratamiento</i>	Generalmente largos tratamientos térmicos con alternancia de temperaturas
	<i>Ejemplos</i>	Muy frecuente en Rosaceae
(B+C ₃)	<i>Causas</i>	Inhibición morfológica y fisiológica
	<i>Pretratamiento</i>	Larga estivación seguida de larga vernalización
	<i>Ejemplos</i>	<i>Fraxinus excelsior</i> L.; algunas poblaciones de <i>Vitex agnus-castus</i> L.; <i>Paeonia</i> sp. pl.

Tabla 13. Dormición endógena y exógena y pretratamientos para romperla.

Independientemente del sistema de clasificación de la dormición, algunas semillas poseen sistemas de germinación complejos, los cuales implican muchas veces una combinación de los diversos tipos de dormición. Si durante el ensayo de germinación, o después de la siembra, las semillas no durmientes (ya expuestas a un pretratamiento de eliminación de la dormición, ver apartado 4.4) son expuestas a condiciones ambientales desfavorables (alta temperatura, anoxia, exceso de agua, etc.), pueden activarse mecanismos fisiológicos de bloqueo de la germinación (CÔME & CORBINEAU, 1992). El resultado de esto son las llamadas “dormiciones inducidas o secundarias”, denominadas así para diferenciarlas de la “dormición primaria” (la que está presente en el momento de la diseminación).

Las semillas sujetas a dormición secundaria prefieren con frecuencia ciclos de temperatura fuertemente variables para germinar, como sucede al final del invierno / inicio de la primavera (noches frías y días calurosos). En estos casos, las siembras tardías que encuentran el terreno demasiado “caliente” pueden provocar dormición secundaria y, por lo tanto, anular la germinación.

8.3.1 Método práctico para determinar el tipo de dormición en semillas no deshidratadas

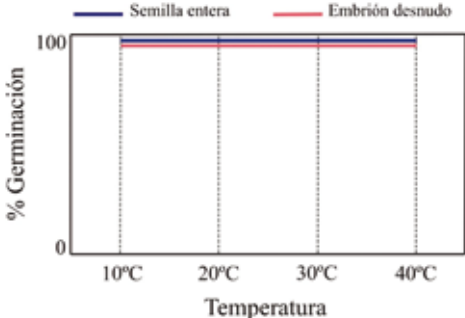
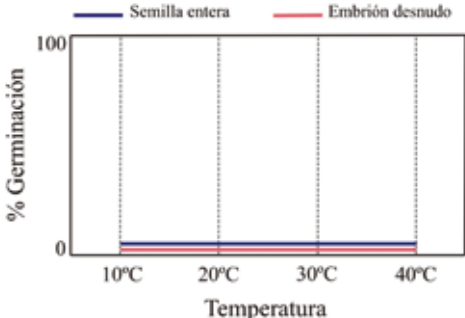
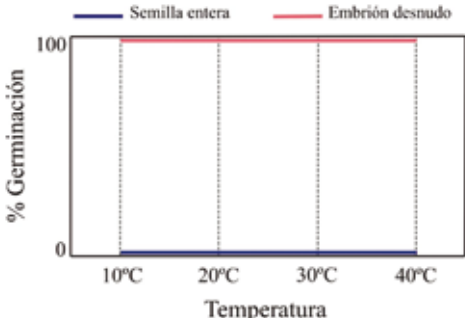
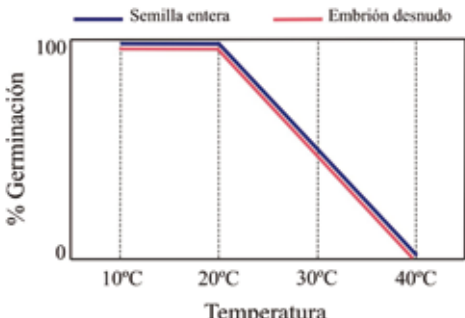
En los casos en que, después de realizar diferentes pruebas experimentales, se obtengan valores bajos de germinación, resulta indispensable investigar las posibles causas de estos resultados. Éstas pueden ser debidas tanto a diversas tipologías de dormición como a la escasa vitalidad del lote de semillas. Con el fin de determinar si el germoplasma examinado presenta alguna forma de dormición, puede procederse según el siguiente esquema:

- Realizar el ensayo sobre material fresco.
- Determinar si se trata de semillas ortodoxas o recalcitrantes (HONG & ELLIS, 1996).
- Examinar la estructura de las semillas (MARTÍN, 1946) y verificar que las semillas estén bien formadas y sin elementos patógenos.
- Hacer germinar en condiciones de oscuridad, a temperaturas comprendidas entre los

5 y los 30°C, las semillas enteras y los embriones excindidos analizando los resultados obtenidos (figura 8.2).

- Si es necesario, valorar la existencia de fotosensibilidad positiva o negativa utilizando semillas enteras y realizando pruebas de germinación a la luz y a temperatura elevada (20-30°C).
- Verificar la presencia de compuestos fenólicos en los tegumentos u otros tipos de sustancias inhibidoras como resinas o aceites.
- Verificar la presencia de permeabilidad al agua.
- Determinar el efecto de tratamientos particulares como frío húmedo, conservación en seco y giberelinas.

Figura 8.2: Comportamiento de semillas enteras y embriones durante las pruebas de germinación para identificar la presencia y el tipo de dormición. →

 <p>— Semilla entera — Embrión desnudo</p> <p>% Germinación</p> <p>100</p> <p>0</p> <p>10°C 20°C 30°C 40°C</p> <p>Temperatura</p>	<p>1- Sin ninguna dormición</p> <p>Tanto las semillas como los embriones desnudos obtienen valores máximos de germinación a todas las temperaturas. (ej.: <i>Pancratium maritimum</i> L.).</p>
 <p>— Semilla entera — Embrión desnudo</p> <p>% Germinación</p> <p>100</p> <p>0</p> <p>10°C 20°C 30°C 40°C</p> <p>Temperatura</p>	<p>2- Dormición embrionaria a todas las temperaturas</p> <p>Ni los embriones desnudos ni las semillas germinan a ninguna temperatura.</p> <p>HIPÓTESIS 1: dormición embrionaria a todas las temperaturas (ej.: <i>Delphinium pictum</i> Willd)</p> <p>HIPÓTESIS 2: semillas no viables.</p>
 <p>— Semilla entera — Embrión desnudo</p> <p>% Germinación</p> <p>100</p> <p>0</p> <p>10°C 20°C 30°C 40°C</p> <p>Temperatura</p>	<p>3- Sin dormición embrionaria y con inhibición tegumentaria a todas las temperaturas</p> <p>Los embriones desnudos germinan a todas las temperaturas mientras que las semillas no germinan, por lo que las causas de dormición deben buscarse a nivel tegumentario.</p> <p>HIPÓTESIS 1: tegumentos duros (ej.: <i>Fabaceae</i>)</p> <p>HIPÓTESIS 2: fotosensibilidad positiva (ej.: <i>Lactuca</i> sp.pl.)</p>
 <p>— Semilla entera — Embrión desnudo</p> <p>% Germinación</p> <p>100</p> <p>0</p> <p>10°C 20°C 30°C 40°C</p> <p>Temperatura</p>	<p>4- Sin ninguna dormición tegumentaria y dormición embrionaria que se manifiesta a altas temperaturas</p> <p>La dormición embrional se activa a altas temperaturas.</p> <p>HIPÓTESIS 1: especie de climas templados (ej.: <i>Primula</i> sp.pl.)</p> <p>HIPÓTESIS 2: dormición embrionaria eliminable con tratamiento frío (ej.: <i>Taxus baccata</i> L.)</p>

<p>— Semilla entera — Embrión desnudo</p> <p>% Germinación</p> <p>100</p> <p>0</p> <p>10°C 20°C 30°C 40°C</p> <p>Temperatura</p>	<p>5- Sin ninguna inhibición tegumentaria y dormición embrionaria a bajas temperaturas</p> <p>Los tegumentos no obstaculizan de ningún modo la germinación (curvas idénticas), manifestándose una dormición embrionaria a bajas temperaturas.</p> <p>HIPÓTESIS 1: especie de climas cálidos (ej.: <i>Chamaerops humilis</i> L.)</p> <p>HIPÓTESIS 2: especie tropical</p>
<p>— Semilla entera — Embrión desnudo</p> <p>% Germinación</p> <p>100</p> <p>0</p> <p>10°C 20°C 30°C 40°C</p> <p>Temperatura</p>	<p>6- Sin dormición embrionaria, con inhibición tegumentaria que se manifiesta a altas temperaturas</p> <p>Las altas temperaturas activan la inhibición de la germinación a nivel tegumentario.</p> <p>HIPÓTESIS 1: especie de climas templados (ej.: <i>Armeria belgenciensis</i> Donadille ex Kerguélen)</p> <p>HIPÓTESIS 2: presencia de fenoles (ej.: <i>Rouya polygama</i> (Desf.) Coincy).</p> <p>HIPÓTESIS 3: fotosensibilidad positiva (ej.: <i>Nigella sativa</i> L.).</p>
<p>— Semilla entera — Embrión desnudo</p> <p>% Germinación</p> <p>100</p> <p>0</p> <p>10°C 20°C 30°C 40°C</p> <p>Temperatura</p>	<p>7- Dormición embrionaria e inhibición tegumentaria a altas temperaturas</p> <p>Las altas temperaturas activan fenómenos de dormición embrionaria y de inhibición tegumentaria, a temperaturas diferentes.</p> <p>HIPÓTESIS 1: especie de climas templados (ej.: <i>Arenaria provincialis</i> Chatter et Halliday)</p> <p>HIPÓTESIS 2: presencia de fenoles (ej.: <i>Bellevalia romana</i> (L.) Reichenb.).</p>
<p>— Semilla entera — Embrión desnudo</p> <p>% Germinación</p> <p>100</p> <p>0</p> <p>10°C 20°C 30°C 40°C</p> <p>Temperatura</p>	<p>8- Dormición embrionaria e inhibición tegumentaria a bajas temperaturas</p> <p>Las bajas temperaturas activan fenómenos de dormición embrionaria e inhibición tegumentaria, a temperaturas diferentes.</p> <p>HIPÓTESIS 1: especie tropical</p> <p>HIPÓTESIS 2: especie de clima cálido (ej.: <i>Chamaerops humilis</i> L.).</p>

En el caso del Banco de Germoplasma del *Museo Nacional de Historia Natural de la Universidad de Lisboa*, para la determinación del tipo de dormición de las semillas se utiliza la siguiente clave, adaptada de BASKIN & BASKIN (2003B). Se asume que las semillas se encuentran en condiciones ideales de germinación.

1	Cubierta de la semilla / fruto impermeable al agua; embrión desarrollado	2
1	Cubierta de la semilla / fruto permeable al agua; embrión desarrollado o no	3
2	La germinación ocurre aproximadamente hasta las 2 semanas (generalmente es necesario menos tiempo) cuando la semilla / fruto se escarifica... dormición física	
2	La germinación no ocurre durante las 2 semanas (generalmente ni siquiera prolongando este periodo) tras haberse escarificado la semilla / fruto, aunque la semilla se embeba unas horas después de la escarificación... combinación de dormición física y fisiológica	
3	Embrión no diferenciado o si diferenciado, se encuentra poco desarrollado (pequeño)	4
3	Embrión diferenciado y completamente desarrollado (alongado)	6
4	Embrión no diferenciado... tipo especializado de dormición morfológica o morfofisiológica	
4	Embrión diferenciado pero poco desarrollado (pequeño)	5
5	El embrión de las semillas frescas empieza a crecer (alongarse) durante un periodo que varía desde pocos días a 1-2 semanas y las semillas germinan dentro de 30 días... dormición morfológica	
5	El embrión de las semillas frescas no crece durante un periodo de pocas semanas y las semillas no germinan dentro de los 30 días... dormición morfofisiológica	
6	Las semillas no germinan en 30 días... dormición fisiológica	
6	Las semillas germinan en 30 días... sin dormición	
7	Desarrollo del ensayo de germinación de confirmación	

Si después de haber realizado estas verificaciones, el número de semillas germinadas resulta escaso o inferior al 50%, pero los tejidos están todavía íntegros, sería adecuado someter las semillas a ensayos de viabilidad. En la figura 8.2 se muestran diversos ejemplos de las posibles respuestas de las semillas enteras y embriones desnudos expuestas a pruebas de germinación realizadas en un amplio rango de temperaturas. Estos ensayos pueden poner en evidencia la presencia y el tipo de una eventual dormición. Otra aproximación para la identificación del tipo de dormición presente en un lote o una especie de la cual no se tenga conocimiento alguno se describe en el apartado 8.8. En este caso, las exigencias ecofisiológicas de germinación están individualizadas a través de la simulación de los ciclos estacionales característicos del área de distribución de la especie de interés.

8.4 Pretratamientos para romper la dormición

Como “pretratamiento” se entiende el conjunto de procesos, cuidados, manipulaciones y otras actuaciones que preceden a la siembra, efectuados con el objetivo de maximizar la velocidad y uniformidad de la germinación (MEZZALIRA & PIOTTO, 2003; PIOTTO, 2005). En este ámbito, los términos “pretratamiento” y “tratamiento” se pueden considerar sinónimos, si bien se utiliza con más frecuencia el primero, sugiriendo un proceso aplicado “antes” de la germinación. En sentido amplio, se consideran también como “pretratamientos” otros procesos que no tienen que ver con la eliminación de la dormición (desinfección, etc.).

Por diferentes motivos, como la dormición fisiológica, la presencia de tegumentos especialmente gruesos e impermeables o de sustancias inhibitoras de la germinación, un considerable número de semillas podría ser viable, aún no habiendo germinado al finalizar los ensayos correspondientes. Para obtener una mayor capacidad de germinación de las muestras sería por lo tanto oportuno pretratar las semillas antes de iniciar el ensayo propiamente dicho, eliminando la dormición. La duración de estos tratamientos no debe ser valorada en el periodo concreto de germinación (ISTA, 2006).

Diferentes instituciones ofrecen información actualizada sobre los pretratamientos a los cuales someter a las semillas de numerosas especies, como el *International Seed Testing Association (ISTA)*, *Bioversity International* (antes IPGRI), *Natural Resources Conservation Service (United States Department of Agriculture)*, *The Native Plant Network*, *The Reforestation, Nursery and Genetic Resources Team*, *Kew Botanic Gardens (Seed Conservation Department)*, etc. En la mayor parte de los casos, se estudian y actualizan permanentemente protocolos para la optimización de los procedimientos de propagación de plantas, o para la determinación de la calidad de las semillas, incluyendo la germinación y los pretratamientos de eliminación de la dormición. Sin embargo, en el caso de numerosas especies, muchas de ellas raras o amenazadas, no existe aún información a partir de la cual se pueda recurrir a los procedimientos descritos.

Se describen a continuación los pretratamientos más utilizados para romper la dormición de las semillas antes de la siembra o de los ensayos de germinación. Dada la variabilidad genética que pueden presentar algunos lotes, los pretratamientos podrían actuar positivamente solo sobre una parte del lote (sobre aquella porción cuyas necesidades están completamente satisfechas por el pretratamiento), implicando selecciones no deseadas con pérdida de variabilidad genética. En los últimos años se están desarrollando estudios con el fin de contener dicho riesgo (SUSZKA & al., 1994; JONES & GOSLING, 1994; PIOTTO, 1997).

8.4.1 Estratificación fría o vernalización

Con el término de vernalización o estratificación fría se entiende la exposición de las semillas durmientes a temperaturas variables de entre +2°C y +5°C (CÔME, 1970) en condiciones húmedas y aireadas (desnudas o mezcladas con un sustrato blando como serrín) durante periodos que dependen de cada especie o lote. La vernalización simula la acción que el invierno efectúa sobre algunas semillas.

8.4.2 Estratificación cálida o estivación

Con el término de estratificación cálida o estivación se entiende la exposición de las semillas a una temperatura no superior a 30-35°C (generalmente 15-20°C) en condiciones húmedas, pero con una libre circulación de aire por un periodo variable, según la especie. La estratificación cálida creada artificialmente sustituye las condiciones del verano y casi siempre precede a la fría. Cuando se aplican varios ciclos de estratificación cálida y estratificación fría, el último pretratamiento aplicado es el frío.

8.4.3 Ahumado

Con el fin de facilitar la germinación de algunas plantas pirófitas, además de los tratamientos térmicos pueden resultar de utilidad otros pretratamientos que producen el ahumado de las semillas (ej. *Ericaceae*; *Cistaceae*). El tratamiento, ideado y desarrollado en 1990 en el *Kirstenbosch National Botanical Garden* de Claremont, Cape Town (South Africa), consiste en la siembra en discos de papel embebidos con una solución saturada de una combinación de sustancias naturales que se liberan durante los incendios del *fynbos* sudafricano (vegetación de tipo mediterránea). A estos discos se les agrega un volumen determinado de agua donde las semillas son embebidas durante 24 horas. Otros centros de investigación que se ocupan de especies de ecosistemas mediterráneos han desarrollado tratamientos análogos que tratan de imitar el efecto de los incendios en la germinación (como el calor, las cenizas, soluciones químicas, humo y otros subproductos del fuego). Recientemente, el efecto del humo sobre la germinación ha sido estudiado en taxones de la cuenca mediterránea (CROSTI & *al.*, 2006). Siendo el efecto del fuego sobre la vegetación algo complejo (modificando la luz, la humedad, la temperatura y el ambiente químico), la presencia de humo ha de considerarse tan sólo como uno de los posibles factores que inducen a las semillas a romper la dormición (FENNER & THOMPSON, 2005).

8.4.4 Escarificación

Las semillas de algunas especies pertenecientes a familias con tegumentos seminales o endocarpos leñosos, muy duros e impermeables (ej. *Fabaceae*, *Cistaceae*, *Convolvulaceae*, *Oleaceae*, etc.) deben ser escarificadas mediante pretratamientos de naturaleza mecánica, química y/o física. La escarificación puede realizarse antes del inicio del ensayo, si bien en el caso de sospechar que este tratamiento pueda dañar las semillas puede realizarse al final de la prueba, y solo en aquellas semillas que no estén embebidas.

La escarificación mecánica incluye el agujereado, el corte o la abrasión con arena o lija de los tegumentos externos (figura 8.3) con el fin de permitir la imbibición de las semillas. La porción de la semilla más apta para la escarificación mecánica es aquella situada inmediatamente sobre el ápice de los cotiledones (ISTA, 2006).

La escarificación de tipo químico supone generalmente la inmersión de las semillas en ácido sulfúrico al 96% o ácido clorhídrico 1N durante un tiempo variable, con el fin de ablandar o consumir parcialmente los tegumentos. Después del tratamiento, las semillas deben ser escurridas en agua corriente abundante antes de proceder al ensayo de germinación o a la siembra.



Figura 8.3: Semillas de *Astragalus maritimus* Moris antes (a) y después (b) de 24 horas de imbibición. Las semillas fueron lijadas con papel de vidrio.

La escarificación de semillas con agua caliente consiste en un tratamiento en agua hirviendo y posterior remojo durante 12-24 horas, con el fin de emblandecer los tegumentos y favorecer su imbibición. El agua debe ser alejada de la fuente de calor antes de introducir las semillas, con el fin de parar el proceso de ebullición. La mezcla está generalmente constituida por diez partes de agua por cada parte de semilla, y debe ser mezclada de vez en cuando hasta su enfriamiento (MEZZALIRA & PIOTTO, 2003).

8.4.5 Aplicación de hormonas

Además de factores ambientales como la temperatura o la luz, las hormonas (ej., etileno, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico) también influyen en la germinación. En general, el etileno y las giberelinas estimulan la germinación de las semillas. Por regla general son más frecuentemente utilizadas las giberelinas que el etileno ya que al tratarse este último de un gas no es tan fácil su manejo en laboratorio.

8.4.6 Eliminación de las sustancias inhibidoras de la germinación

La presencia de sustancias químicas dentro de las semillas o en los tegumentos puede retardar o inhibir la germinación. La presencia de estas sustancias (ej. fenoles, resinas) puede ser detectada por la formación de halos de color en torno a las semillas, sobre el sustrato de germinación que se está utilizando. Las sustancias inhibidoras de la germinación pueden ser extraídas con un prelavado en agua o en alcohol (90°) a una temperatura de 25°C, secando las semillas antes de efectuar el ensayo. Para algunas plantas de la familia *Poaceae* conviene eliminar las estructuras externas de las semillas, como el lema y la pálea (ISTA, 2006).

Las sustancias fenólicas son a menudo responsables de la inhibición de la germinación, ya que actúan disminuyendo el aporte de oxígeno al embrión, sobre todo cuando la temperatura es superior a 10°C. Su eliminación puede realizarse mediante lavados sucesivos en agua o alcohol, especialmente usando temperaturas de germinación suficientemente bajas, con el fin de aumentar la disolución del oxígeno en el agua de imbibición (CÔME & CORBINEAU, 1992). Además, sumergir las semillas en un fuerte oxidante (ej. agua oxigenada, hipoclorito de sodio NaClO) permite la oxidación de numerosas sustancias inhibidoras haciéndolas ineficaces (OGAWA & IWABUCHI, 2001), además de eliminar algunos patógenos.

8.5 Consejos prácticos

Los laboratorios de bancos de germoplasma no siempre están dotados de los instrumentos y el material técnico necesario para realizar ensayos de germinación completos, que lleven a conclusiones rápidas y eficaces sobre las características germinativas de una determinada especie. Resulta por lo tanto muy importante anotar las condiciones verificadas o cualquier otro tipo de observación, con el fin de definir y mejorar los protocolos con los medios disponibles. Algunas combinaciones de temperatura/luz, temperatura/agua, etc., pueden permitir simplificar el trabajo, si bien podrían ser difícilmente reproducibles en otro laboratorio que no disponga del mismo equipamiento. Es necesario recordar que el agua, la temperatura y la luz juegan un papel específico en cada especie, y que las combinaciones de estos factores, si no son controladas con atención, pueden complicar la interpretación de los resultados de un determinado ensayo de germinación. A continuación se ofrecen algunas recomendaciones generales utilizadas en la *Banque de Semences del Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles*, presentándose como sugerencias prácticas en los casos en que se opere con limitaciones de instrumental o equipamiento necesario para el estudio de la germinación.

8.5.1 Humedad

La calidad del agua debe ser la mejor posible, por tanto se recomienda el empleo de agua destilada o producida por ósmosis. Si el laboratorio no dispone de los medios adecuados para esta labor, se puede utilizar agua mineral de mineralización débil disponible en comercios; este tipo es preferible al agua de fuente o de grifo, cuyas características pueden variar en el tiempo. Si se utiliza agua mineral, es necesario anotar en la ficha de germinación la marca comercial del agua utilizada. La botella de agua, una vez abierta, debe conservarse a +5°C y consumirse lo antes posible.

Los laboratorios deben valorar la conveniencia de adquirir agua o bien de emplear un deshidratador o un equipo de tratamiento de agua mediante ósmosis. Debe evitarse el uso de purificadores domésticos, ya que aún eliminando el contenido en cal, los nitratos y los metales pesados presentes en el agua corriente dejan sales de sodio que pueden resultar negativos para la germinación de algunas especies. La cantidad de agua utilizada para embeber el papel de filtro durante el ensayo de germinación debe ser controlada durante las primeras 48 horas, y repuesta regularmente evitando la desecación de las semillas.

8.5.2 Temperatura

En condiciones ideales, el laboratorio de un banco de germoplasma debería disponer de una batería de cámaras de incubación de temperatura constante y/o alterna con iluminación controlada, y/o una cama caliente. Ni siquiera este equipamiento está siempre disponible en estos centros. Desde un punto de vista técnico y económico, un incubador con temperatura constante es más sencillo de adquirir, permitiendo el desarrollo de pruebas fácilmente reproducibles por otros. La eficacia de los ciclos térmicos depende de las temperaturas aplicadas, de la duración de la exposición a cada temperatura, de la cadencia entre éstos y del tiempo que los incubadores emplean en aumentar o disminuir la temperatura en función del ciclo definido, determinando así velocidades de germinación diferentes.

8.5.3 Luz

El tiempo de iluminación, los ciclos aplicados, la intensidad, la longitud de onda emitida, la marca comercial de la cámara de crecimiento, la vida media (en la mayor parte de los casos es un año) y la accesibilidad de la lámpara empleada son elementos importantes que es necesario valorar y anotar. Si se combina el parámetro luz con alternancia de temperatura, en ocasiones resulta difícil conseguir reproducir un protocolo de germinación fuera del propio laboratorio. Algunas veces la duración de la iluminación necesaria para inducir la germinación de ciertas plantas no supera los pocos minutos. Según los casos, las exigencias de germinación en cuanto a luz y oscuridad pueden ser anuladas gracias a la deshidratación, decorticación o escarificación de los tegumentos, la utilización de temperaturas más frías para semillas inhibidas por oscuridad o más calientes para semillas inhibidas por la luz. La particular influencia de la luz sobre las semillas explica por qué algunas de ellas, después de permanecer mucho tiempo quiescentes en el suelo, germinan inmediatamente después del paso del arado, al ser llevadas a la superficie. Las semillas fotosensibles a veces germinan mejor después de 6/12 meses de conservación en seco y al frío.

8.5.4 Hormonas

Si la aplicación de giberelinas es necesaria para la producción de plántulas, resulta adecuado recurrir a un método de cultivo apropiado, a menudo realizable sólo en condiciones ambientales controladas: iluminación de al menos 14/24 h y alternancia de temperaturas con un cambio muy pronunciado entre el periodo nocturno y diurno. Aún así, aplicando este método de cultivo no todas las plantas podrán mantenerse vivas. El empleo de giberelinas permite en muchos casos eliminar la dormición debida a la fotosensibilidad positiva de las semillas. La solución de giberelina producida en laboratorio se puede conservar en frío y en oscuridad, durante un periodo máximo de una semana, de otro modo se corre el riesgo de no obtener el efecto deseado.

8.5.5 Empleo de productos fitosanitarios

Algunos fungicidas empleados para evitar infecciones durante la germinación pueden inducir efectos o retardos en el crecimiento, al igual que otros pesticidas aún no testados pueden comportar defectos en el desarrollo, retraso en la floración, etc. Es por ello desaconsejable el empleo de fitosanitarios.

8.5.6. Sustrato

En condiciones de laboratorio, las semillas generalmente se colocan a germinar en placas de Petri sobre uno o dos discos de papel de filtro. Aun así, para determinadas especies es necesario colocar las semillas a germinar sobre agar, ya que el agua no es suficiente para su germinación. En algunas orquídeas cuya germinación está condicionada a la micorrización, resulta necesario disponer agar con la adición de hongos específicos. Semillas demasiado grandes o cuyo desarrollo de la radícula es demasiado sensible, pueden colocarse en rollos horizontales de papel de filtro. El uso de otro tipo de sustratos como arena o turba puede ser adecuado en algunos casos para ayudar a la germinación.

8.6 Determinación y elaboración de protocolos

Para planificar correctamente los ensayos de germinación es oportuno indagar antes en la bibliografía disponible, con el fin de recopilar la mayor información sobre la anatomía, la fisiología y la biología de las semillas, además de la autoecología del taxón en estudio. Al mismo tiempo, es útil consultar, en publicaciones específicas o a través de páginas web de instituciones reconocidas, fórmulas y protocolos de germinación ya experimentados. De este modo será posible, a partir de los instrumentos y las metodologías disponibles, programar un protocolo específico, individualizando los diferentes parámetros o el número de las réplicas en función de la disponibilidad de las semillas. En el caso de no disponer de información previa, se aconseja ensayar los protocolos de especies filogenéticamente próximas o de especies que posean la misma ecología.

Existen diversos métodos para la estandarización de la elaboración de protocolos de germinación (TERRY & *al.*, 2003); se considera que tales procedimientos están condicionados por la estructura y los instrumentos del banco (por ejemplo el número de incubadores, si están dotados de regulación térmica y de fotoperiodo, etc.), por lo que cada banco puede adoptar el protocolo más adecuado en función del equipamiento disponible y de sus propias exigencias. En la Tabla 14 se muestra el esquema de toma de decisiones diseñado en el banco de germoplasma de Cerdeña (*Banca del Germoplasma della Sardegna, BG-SAR*), elaborado mediante un sistema dicotómico, a partir de los estándares internacionales del IPGRI (1985B) y el ISTA (2006).

1	Búsqueda bibliográfica preliminar	2
2	Consulta de fórmulas o protocolos de germinación ya experimentados, incluyendo de taxones parecidos según criterios filogenéticos y/o ecológicos:	3
	a No existe un protocolo ya definido	3
	b Existe un protocolo definido	7
3	Pretratamientos	
	a Estivación (ej. <i>Primulaceae</i>)	4
	b Vernalización (ej. <i>Cistaceae</i>)	4
	c Ahumado (ej. <i>Ericaceae</i>)	4
	d Escarificación (ej. <i>Fabaceae</i>)	4
	e Hormonas	4
	f Eliminación de sustancias inhibitoras de la germinación (ej. <i>Poaceae</i>)	4
4	Imbibición	
	a Semillas no embebidas	3
	b Semillas embebidas	5

5	Siembra (se requiere estudios previo sobre dormición)	
a	Tratamiento químico (KNO ₃ , GA3, etc.)	
	i Oscuridad y temperatura constante	
	germinación < 30%%	6
	germinación > 30%	7
	ii Fotoperiodo y temperatura constante	
	germinación < 30%	6
	germinación > 30%	7
	iii Fotoperiodo y temperatura alternante	
	germinación < 30%	6
	germinación > 30%	7
b	Agua destilada (ningún tratamiento)	
	i Oscuridad y temperatura constante	
	germinación < 30%%	6
	germinación > 30%	7
	ii Fotoperiodo y temperatura constante	
	germinación < 30%	6
	germinación > 30%	7
	iii Fotoperiodo y temperatura alternante	
	germinación < 30%	6
	germinación > 30%	7
6	Desarrollo del ensayo de viabilidad	
a	No se confirman los resultados del ensayo de germinación (viabilidad alta)	5
b	Se confirman los resultados del ensayo de germinación (baja viabilidad)	7
7	Desarrollo del ensayo de germinación de confirmación	
	No se confirman los resultados	5
	Los resultados se confirman – <i>Validación del protocolo</i>	

Tabla 14. Clave dicotómica para la validación de protocolos de germinación.

El número de semillas (Ns) que debe analizarse puede variar en función de la disponibilidad efectiva de las mismas (si la cantidad es baja a menudo se renuncia a realizar pruebas

destructivas) así como de los diferentes protocolos utilizados. En relación al número de semillas disponible y a partir de la experiencia propia desarrollada en el banco de germoplasma de Cerdeña (BG-SAR), se propone el siguiente esquema:

- Ns < 500 unidades = no se efectúa el ensayo de germinación
- Ns entre 500 - 1000 unidades = el nº de semillas a analizar no supera el 10 %
- Ns entre 1000 - 5000 unidades = el nº de semillas a analizar no supera el 15%
- Ns > 5000 unidades = el nº de semillas a analizar no supera el 20%

Cuando no existe una limitación numérica, suelen colocarse 25 semillas en cada réplica, realizando para cada tratamiento 4 réplicas. Es necesario considerar que, trabajando con poblaciones de taxones raros y/o en riesgo de extinción, difícilmente se tendrán a disposición lotes con más de 500 semillas. En estos casos la selección del número de réplicas y de semillas por réplica debe ser atentamente ponderada tomando en consideración parámetros como el grado de amenaza del taxón, la disponibilidad de material proveniente de otras poblaciones del mismo taxón y la disponibilidad de material de la misma población de años precedentes.

Las condiciones estándar de germinación a las cuales someter semillas de taxones no conocidos contemplan la combinación de los siguientes factores:

- Temperaturas de 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C (teniendo en cuenta también el área geográfica del taxón en estudio)
- Fotoperiodo alternante de 12/12 h
- Agar 0,5%-1% o papel absorbente (3 hojas)
- Ácido giberélico 120-800 ppm (IBPGR, 1985B)
- Duración del ensayo variable de 30 a 60 días, salvo excepciones
- 1 ó más placas Petri de dimensión variable según las semillas
- KNO₃ (0,2% p/v) (CÔME, 1970; IBPGR, 1985B; ISTA, 2006)

La réplica a 5°C, mientras no se obtengan resultados positivos en 1 ó 2 meses en las primeras pruebas, puede ser transferida a temperaturas superiores, para valorar la eventual necesidad de un periodo de vernalizado. Existen, sin embargo, especies para las cuales la temperatura óptima de germinación está próxima a los 5°C (ej. *Fagus sylvatica* L.).

Los sustratos más frecuentes (agar o papel absorbente) presentan características diferentes y son utilizados en función de las condiciones del ensayo y de la tipología de las semillas, con la posibilidad de trabajar en ambiente estéril o con semillas / esporas de dimensiones muy reducidas (ej. esporas de pteridófitos o semillas de *Orchidaceae*), o con semillas de grandes dimensiones que pudieran absorber toda el agua presente en la solución de agar determinando así un factor limitante para la germinación.

Para permitir un análisis correcto de los resultados (ver apartado 7.7) se recomienda realizar las observaciones (figura 8.4) todos los días inmediatamente después del comienzo del ensayo y, después de un mes, cada dos días durante la duración del mismo.

Cuando el resultado negativo de la prueba de germinación sea imputable a contaminación fúngica, será necesario repetir la prueba, previo tratamiento antimicótico. Dicho tratamiento puede ser efectuado antes del inicio del ensayo, sumergiendo el material en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) de tipo comercial al 1-2% durante 5-10 minutos. Como alternativa, en el momento de la siembra de las réplicas en placas de Petri, embebiendo el papel de

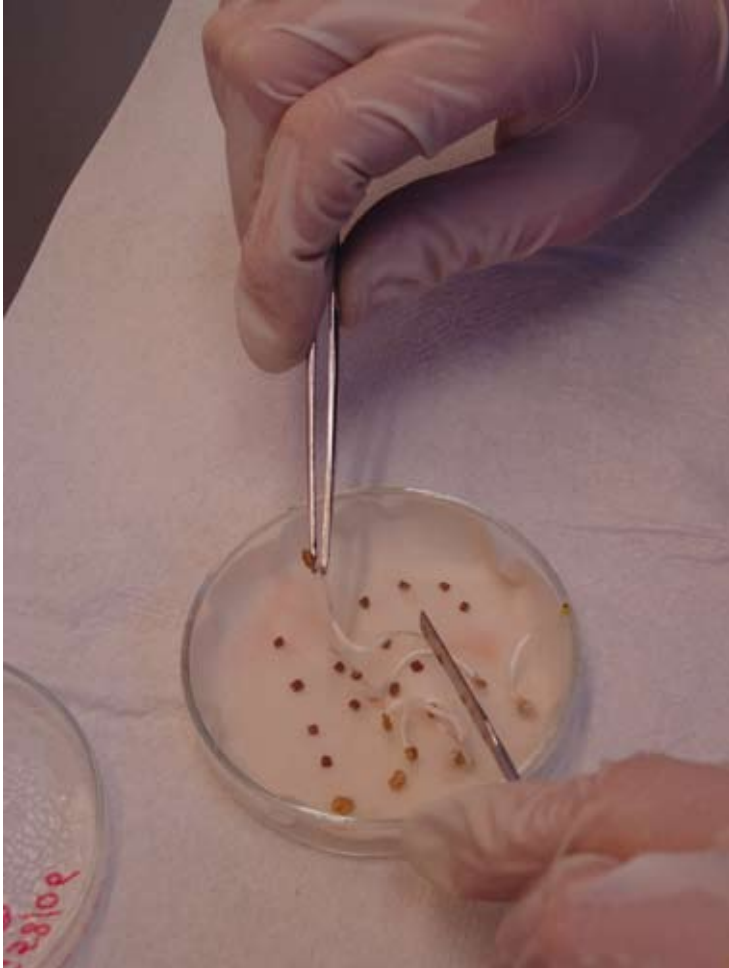


foto: E. Mattana

Figura 8.4: Control del ensayo de germinación de *Astragalus maritimus* Moris.

filtro con una solución de hymexazol al 36 % p/v, funguicida que puede ser utilizado sobre las semillas o el sustrato (DE LIÑÁN, 2004), a una concentración de 0,1 ml de producto por 500 ml de agua destilada.

En el caso de aparecer infecciones durante el ensayo, debe sustituirse la placa Petri y el papel de filtro. Posteriormente se lavan las semillas con agua y se tratan con hipoclorito de sodio. Para las semillas especialmente rugosas y difíciles de esterilizar, es preferible emplear tensoactivos en soluciones específicas como “Tween 20 TM” y preparar una solución al 0,1%; Este compuesto reduce la tensión superficial y favorece un mejor contacto del líquido con el tegumento de la semilla. Después del tratamiento, el germoplasma debe ser meticulosamente lavado con agua corriente.

8.7 Análisis de resultados

Las observaciones efectuadas durante el ensayo de germinación permiten caracterizar los resultados obtenidos. A dicho fin se presentan a continuación algunas herramientas útiles.

8.7.1 Categorías de valoración

Durante el seguimiento del ensayo de germinación es posible observar y anotar el número de las semillas germinadas y muertas; al finalizar el ensayo se pueden identificar las siguientes categorías de semillas (ISTA 2006).

- *Germinadas*: observación de la emergencia de la radícula.
- *Embebidas*: semillas que al final del ensayo, aún estando frescas, viables y embebidas no han germinado.
- *No embebidas*: semillas que al final del ensayo no han sido embebidas (generalmente tienen tegumentos muy duros que necesitan escarificación).
- *Muertas*: semillas muertas en los diferentes controles.
- *Otras categorías*: semillas que no entran en las categorías arriba indicadas; en particular, aquellas atacadas por plagas y semillas vacías (ISTA, 2006).

La suma de los porcentajes de las semillas pertenecientes a todas las categorías debe ser igual a 100 y su número total debe corresponderse con el número de semillas colocadas en placa al inicio del ensayo. Entre el número de semillas germinadas es posible efectuar una ulterior distinción (ISTA, 2006):

- *Semillas germinadas con plántulas normales*: se consideran plántulas normales aquellas provistas de órganos esenciales para la vida de la futura planta. Éstas se distinguen en tres categorías: plántulas intactas, con leves defectos y con infecciones secundarias.
- *Semillas con plántulas anormales*: semillas que aún habiendo germinado no presentan plántulas que puedan ser consideradas normales. También en este caso se distinguen tres categorías: plántulas dañadas, deformadas y deterioradas. Para la valoración de las plántulas resulta de particular ayuda el manual del ISTA *Seedling Evaluation* (DON, 2003).

8.7.2 Porcentajes de germinación

Los porcentajes de germinación se calculan para cada réplica y vienen dados de la relación entre el número de semillas germinadas y el número total de semillas – las semillas vacías, multiplicado por 100:

(Número de semillas germinadas / Número total de semillas – semillas vacías) x 100

El porcentaje final del ensayo será calculado haciendo la media entre todas las réplicas sometidas a las mismas condiciones de germinación.

8.7.3 Velocidad de germinación (T_{50})

El T_{50} es el parámetro más utilizado para determinar la velocidad de germinación. Se calcula en número entero de días y corresponde al tiempo necesario para obtener el 50% de la capacidad germinativa del lote (CÔME, 1970).

Tal valor se puede calcular por interpolación lineal según la fórmula de COOLBEAR & al. (1980), ligeramente modificada según la definición ofrecida por THANOS & DOUSSI (1995):

$$T_{50} = \frac{[(N/2) - N_1] (T_2 - T_1)}{N_2 - N_1} + T_1$$

Donde:

N = porcentaje final de semillas germinadas

$N1$ = porcentaje de semillas germinadas por debajo de $N/2$

$N2$ = porcentaje de semillas germinadas por encima de $N/2$

$T1$ = número de días que corresponden a $N1$

$T2$ = número de días que corresponden a $N2$

El cálculo del T_{50} resulta mucho más útil en los casos en que el periodo de germinación resulte muy largo (varios meses) y permite además verificar siempre la calidad del protocolo. Permite también valorar indirectamente el vigor de un lote de semillas, ya que la velocidad de germinación no es más que una representación de la capacidad germinativa de algunas de las semillas del lote.

8.7.4 Retardo germinativo

Es el tiempo necesario (en días) para observar la primera semilla germinada. No depende solamente de las características de la especie, sino también del estado de envejecimiento de lotes conservados. Este protocolo permite comparar los resultados obtenidos en semillas testadas justo después de la recogida y después de varios años de conservación.

8.7.5 Tiempo medio de germinación

Paralelamente también puede ser calculado el tiempo medio de germinación (MGT) medido en días, el cual permite conocer el tiempo medio de germinación de las semillas analizadas (TOMPSETT & PRITCHARD, 1998). Este valor se calcula determinando el número de semillas germinadas cada día, considerando el total de semillas germinadas:

$$MGT = \frac{\sum n_i d_i}{N}$$

Donde:

n_i : nº de semillas germinadas en el día d

d_i : número de días desde el inicio del test de germinación

N : nº total de semillas germinadas al final del ensayo.

8.7.6 Valor Pico (VP) y Valor de Germinación (VG)

Se define el Valor Pico como el porcentaje de germinación en un punto T respecto al número de días necesarios para alcanzar este punto, así pues la expresión matemática para su cálculo es la siguiente:

Valor Pico = % de germinación en T(%) / punto T (días)

El punto T (punto en que se cortan la curva de germinación y una recta tangente a la misma desde el origen) indica el momento en que la velocidad de germinación empieza a disminuir de modo que la gráfica queda dividida en dos tramos: un tramo inicial en que la velocidad es más rápida y otro en que la germinación es mucho más lenta. Con la lectura diaria de la germinación se elabora la llamada gráfica de germinación acumulada

El valor de Germinación media diaria (*GMD*) resulta de gran interés para establecer comparaciones entre el comportamiento de unos taxones y otros, pero debe tratarse de ensayos de la misma duración. Para su cálculo se emplea la expresión:

$$GMD = \% \text{ de germinación total (\%)} / \text{Duración del ensayo (días)}$$

El vigor de Germinación relaciona los parámetros *VP* y Germinación Media Diaria (*GMD*) mediante la expresión siguiente:

$$VG = VP \times GMD$$

8.7.7 Otros parámetros

Los cálculos que se efectúen dependerán del estudio realizado y de los objetivos. Los más frecuentemente utilizados son los dos primeros (% total de germinación y velocidad de germinación definida como T_{50}). Además del T_{50} se pueden calcular otros tipos de velocidades tal como el T_{25} (tiempo necesario para que se llegue al 25% de la germinación) o el T_{75} (tiempo para que suceda el 75% del total de la germinación). Otros parámetros como la uniformidad ($T_{75}-T_{25}$) o la asimetría (T_{50}/MGT) también permiten caracterizar el comportamiento de las curvas de germinación. La uniformidad nos permite conocer la progresión de la germinación entre determinados intervalos de tiempo mientras que la asimetría nos da una idea de si en la muestra germinan más semillas antes o después del T_{50} .

Estos parámetros pueden ser calculados manualmente, aunque existen algunas aplicaciones informáticas que facilitan la obtención de estos parámetros estadísticos, como “Seed Calculator” (*Plant Research International*, www.plant.wageningen-ur/products). Como alternativa, pueden utilizarse herramientas de ajuste a curvas que permiten una interpretación de las mismas. Estas herramientas determinan el modelo que mejor se ajusta a un determinado ensayo y obtienen los parámetros que describen esa curva.

8.7.8 Curvas de interpretación

Con los resultados obtenidos durante los ensayos de germinación es posible trazar diferentes tipos de curvas para su análisis, y la obtención de gráficos (figuras 8.5 y 8.6) para caracterizar y visualizar los datos. Se puede utilizar el T_{50} en lugar del porcentaje de germinación.

Porcentaje de germinación en relación con el tiempo

En la figura 8.5 se representa en ordenadas el porcentaje de germinación y en abscisas el tiempo; se puede deducir que el retraso de germinación con relación a la temperatura empleada para el ensayo es de 18 días a 20°C, 42 días a 15°C y 48 días a 10°C. El tiempo total de la prueba es de 42 días a 20°C, siendo mayor para el resto de temperaturas. En términos de calidad y ve-

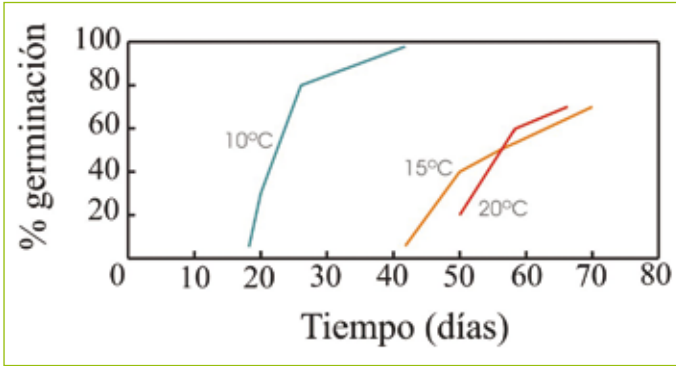


Figura 8.5- Curva de germinación de las semillas frescas de *Pancratium maritimum* (datos de M.Viveraire) a diferentes temperaturas.

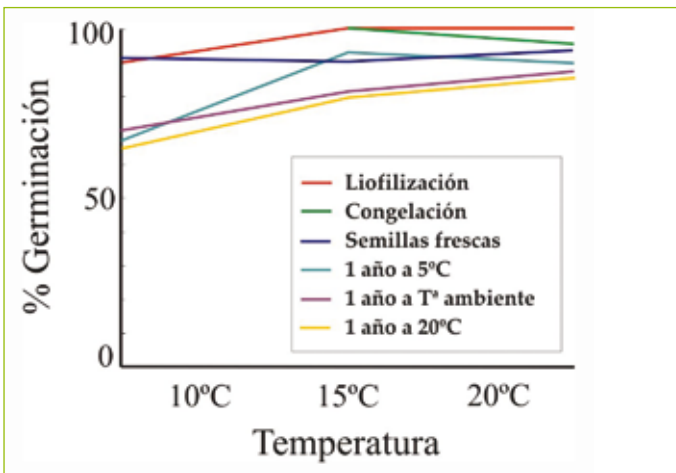


Figura 8.6- Porcentaje de germinación de *Pancratium maritimum* en función de la modalidad de conservación y de la temperatura de germinación (datos de M. Virevaire).

locidad de germinación, la temperatura más eficaz para este lote, en las condiciones del ensayo (semillas enteras, oscuridad, placa Petri o humidificada con agua destilada) es, por lo tanto, de 20°C. Este ensayo ha sido realizado sobre *Pancratium maritimum* L., especie que no presenta dormición o particulares inhibiciones de la germinación, utilizado para generalizar los resultados porcentuales de germinación en función de diferentes protocolos normalmente aplicados. Se han utilizado semillas frescas para la valoración de la calidad del lote a la entrada.

A través de los gráficos se pueden comparar diversas series de datos, con el fin de valorar de un modo inmediato diferentes protocolos, métodos de conservación, recolecciones en poblaciones diferentes o de una misma población pero con muestreos realizados en años consecutivos.

Porcentaje de germinación con relación a diferentes protocolos

En la figura 8.6 se representa el porcentaje de germinación y la temperatura de los diferentes protocolos testados. Gracias a esta tipología de gráfico es posible valorar los diferentes métodos de conservación y determinar la temperatura óptima de germinación. Los ensayos utilizados

para dicha generalización han sido realizados sobre muestras de una única recolección, tanto en el momento anterior a la conservación como después de varios años de almacenamiento de semillas congeladas y liofilizadas. Las semillas recién recogidas han sido expuestas a pruebas para valorar las características germinativas del lote, que sirven como referencia para los ensayos sucesivos. Las semillas han sido lavadas y almacenadas con gel de sílice a la temperatura indicada en el gráfico, excepto aquellas conservadas a temperatura ambiente de laboratorio (15-38°C). La comparación entre la curva de las semillas frescas con las sometidas a diferentes métodos de conservación (5°C, congelación y liofilización) muestra cómo en el momento de la recogida, a través del ensayo de germinación, el total de las semillas no había alcanzado aún la madurez fisiológica. Las semillas conservadas sufren una posmaduración, alcanzando el lote una mayor homogeneidad después de su deshidratación (conservadas en frío, a temperatura ambiente de 20°C).

En el gráfico se evidencia una temperatura óptima de germinación de 20°C para las semillas recién recogidas. Pudiera ser que la temperatura óptima sea en realidad de 15°C, excepto para las semillas liofilizadas, que germinan bien en un amplio rango de temperaturas. El gráfico también parece indicar que la temperatura óptima para la germinación está entre 15°C y 20°C, mientras que se observa una fuerte bajada porcentual de germinación a temperaturas inferiores. Considerando que las semillas presentan un rango de temperatura óptima más estrecha, que va reduciéndose al aumentar el tiempo de conservación, y que las semillas disminuyen su vitalidad con el aumento del tiempo de almacenaje, es posible extraer una hipótesis sobre el método más adecuado de conservación. A tal fin se evidencia la utilidad de continuar profundizando en el estudio de los distintos lotes de una recolección, para la valoración del mejor método de conservación para cada taxón.

8.7.9 Análisis estadísticos

Cada experiencia realizada produce un conjunto de resultados numéricos que serán utilizados para responder a cuestiones específicas. A pesar de ello, estos datos presentan una variabilidad que sólo es detectada cuando utilizamos análisis estadísticos. Por ejemplo, en 3 lotes de semillas fue registrada una germinación de 50%. En el lote A, las 4 réplicas germinaron un total de 50% en cada una. En el lote B, 2 réplicas germinaron al 100% mientras que en las otras 2 no germinó ninguna semilla. En el lote C, en 2 réplicas germinaron 75% de las semillas y en el resto sólo 25%. Ninguno de los 3 resultados anteriores es errado aunque a las conclusiones que podemos llegar según cada uno de ellos pueden ser completamente diferentes si consideramos la variabilidad estadística.

Para cada grupo de datos, debe primero verificarse si los datos siguen una distribución normal. En el caso de trabajar con porcentajes, la normalidad se obtiene aplicando una transformación de tipo *arcsen* lo que permite la posterior utilización de los datos en análisis paramétricos que posibilitan la comparación de datos de varios grupos, mediante análisis de tipo ANOVA o *t* de Student. Los resultados permiten verificar nuestra hipótesis y la existencia o no de diferencias significativas entre nuestras réplicas de trabajo.

8.8 Ecofisiología de la germinación

En sentido amplio, la ecología de las semillas abarca todos los procesos relacionados con la respuesta ambiental de una especie, desde la embriogénesis hasta la germinación y la dormición (ver capítulo 8), incluyendo la dispersión y los bancos de semillas del suelo (ver capítulo 3) (FENNER & THOMPSON, 2005). Las incógnitas referidas a la germinación pueden, en muchos casos, esclarecerse a partir de estudios programados que tiendan a explicar las características del ciclo reproductivo de una determinada especie y su relación con las condiciones ambientales específicas que provocan la germinación (ecofisiología de la germinación). Este tipo de aproximación al conocimiento científico de la propagación se inició en los Estados Unidos en los años 90, a través de procedimientos que han sido progresivamente mejorados (BASKIN & BASKIN, 1998; PIOTTO & CROSTI, 2005). En dichos estudios se suelen emplear semillas frescas (diseminadas o recolectadas recientemente), debido a que las semillas conservadas en plazos medios o largos pueden en ocasiones modificar sus propias características. Resulta importante, en cualquier caso, determinar si el almacenamiento implica algún tipo de modificación en la fisiología de las semillas, como la inducción o eliminación de la dormición.

En este apartado se detalla una línea de estudio que puede resultar de interés para el desarrollo de estudios aplicados a bancos de semillas, especialmente dirigidos a optimizar las pruebas de germinación a partir del conocimiento ecológico de cada especie. Un repaso sintético sobre los aspectos a tener en cuenta en los estudios ecológicos de la germinación y los errores más comunes detectados entre los investigadores puede consultarse en BASKIN & *al.* (2006).

8.8.1 Herramientas básicas de caracterización

En primer lugar es necesario conocer el origen de la especie en cuestión y tanto como sea posible la propia biología de la especie (época de maduración del fruto, momento de germinación, etc.). Esta información servirá para programar las experiencias de germinación. Es necesario recordar que las semillas pertenecientes a especies silvestres de regiones templadas y frías están especialmente adaptadas a estos ambientes, de tal modo que requieren permanecer en el terreno durante un invierno (a veces durante un verano y un invierno), condiciones que eliminan de forma natural la dormición, consintiendo así la germinación.

Como primera indicación sobre el tipo de dormición que caracteriza a las semillas de una especie dada, puede ser de ayuda tener en cuenta el modo de diseminación de la planta de interés. Conocer este aspecto resulta útil para intuir la perdurabilidad de la semilla, además del tipo de dormición de la especie, sobre todo si la información puede completarse con la observación de la estación en que germinan la mayor parte de las semillas que se dispersan. A partir de esta premisa, y por afinidad con el comportamiento de especies conocidas, pueden surgir algunas respuestas. Algunos ejemplos de dormición ligada a la diseminación (y no necesariamente provocada por ella) pueden servir para aclarar estos aspectos:

- Muchas especies de ambientes fluviales (ej. *Populus*, *Salix*, *Ulmus*, etc.) diseminan en primavera, produciendo generalmente semillas no durmientes que germinan inmediatamente (siendo de poca perdurabilidad).
- Las semillas de especies que diseminan en otoño y que germinan durante la primavera

siguiente tienen una dormición que se elimina generalmente con un periodo de frío húmedo (el invierno al que son expuestas en condiciones naturales).

- Las semillas contenidas en frutos de colores vivos frecuentemente ingeridos y diseminados en otoño-invierno por aves o pequeños mamíferos, muestran una dormición muy compleja y en algunos casos difícil de eliminar (ej. *Cornus*, *Crataegus*, *Ilex*, *Viburnum*, etc.). En otros casos la dormición se rompe a través del uso de ácidos o productos abrasivos que simulan el paso por el tracto digestivo de los vectores de dispersión.
- Las semillas que, diseminadas al final de la primavera o verano, germinan durante la segunda primavera tras la dispersión, muestran generalmente dormición morfofisiológica, necesitando condiciones cálidas y húmedas (verano), seguidas de periodos fríos y húmedos (invierno) para poder germinar (ej. *Rosaceae*).
- Las semillas que son dispersadas en primavera o en verano y germinan durante el otoño o el invierno siguiente, presentan una dormición que puede ser quebrada por un periodo de calor seco (verano, incendios) que les facilita la entrada de agua (ej. *Cistaceae*).

La metodología desarrollada en Estados Unidos por BASKIN & BASKIN (2003B) para determinar las exigencias requeridas por las semillas para la germinación puede ser aplicada de manera relativamente sencilla (si bien con limitaciones debidas a la infraestructura científica disponible) y con la suficiente plasticidad como para ser adaptada a especies características de climas diferentes. Inicialmente, estas pruebas consistían en el seguimiento de las fases fenológicas que suceden a la dispersión, a través de una siembra realizada inmediatamente después de la diseminación, en ambientes naturales controlados con el fin de evitar daños por depredación. Extremadamente importante era confinar las semillas en sacos de fieltro e introducirlos en pequeñas celdas de metal (para identificar mejor las zonas de deposición y prevenir la depredación). El material se desenterraba y observaba periódicamente para establecer la evolución de la germinación. Progresivamente, se ha desarrollado una metodología análoga pero realizada en ambientes controlados (armarios termoestáticos) que resultan menos expuestos a situaciones aleatorias y que ofrecen la posibilidad de mantener las condiciones estables. De este modo se puede llegar a determinar la temperatura o la secuencia de temperaturas necesarias para eliminar la dormición en especies de las cuales se desconoce la ecofisiología de la germinación.

Para el funcionamiento de los armarios termoestáticos u otros ambientes termo-controlados empleados para las pruebas de germinación, se eligen varias temperaturas, constantes o con alternancia diaria, que simulan las condiciones térmicas del aire en las diferentes estaciones del año, y en la región de interés. Generalmente se prevén dos sucesiones (Tabla 15) que, basadas en la propia sucesión estacional, parten del invierno o del verano, respectivamente. Las semillas embebidas son expuestas en paralelo a ambos recorridos, siendo controladas hasta la germinación. En función de la disponibilidad de las semillas, la prueba puede realizarse en oscuridad y/o con fotoperiodo. La duración del fotoperiodo la define el investigador, si bien en nuestras latitudes generalmente está comprendida entre 8 y 14 horas de luz diarias; la duración del periodo de noche/día está también determinado por la energía que nuestras cámaras de germinación puedan irradiar. La luz es incorporada durante la fase cálida del ciclo térmico, o en una parte cualquiera del día si está prevista la alternancia diaria de temperaturas (por

ejemplo, durante el invierno, a 5°C de forma constante). Para cada uno de los regímenes térmicos empleados en las pruebas se prevén repeticiones desarrolladas siempre en las mismas condiciones de temperatura y luz durante la duración de la prueba (control). Las semillas que, sometidas constantemente a un determinado régimen térmico, no germinan en 30-40 días, se consideran durmientes.

El investigador ajustará las temperaturas de los ciclos para acercarlos lo más posible a las registradas en el área de distribución de la planta estudiada. En relación con la disponibilidad del equipamiento, algunas estaciones del año pueden eliminarse: puede prescindirse, por ejemplo, del inicio de la primavera y del final del otoño, teniendo la cautela de alargar otras cuatro semanas los periodos correspondientes al final de la primavera y al inicio del otoño (Tabla 15). De este modo se dispondrá de tan solo tres regímenes térmicos diferentes, que pueden desarrollarse en un solo armario en el cual se incorporen los ciclos de forma sucesiva, o bien disponiendo tres armarios diferentes, cada uno con un ciclo fijo, a los cuales se transfieren las semillas a medida que se completan los periodos simulados de las estaciones. Si se elige duplicar el experimento también en oscuridad, no son necesarios otros armarios termoestáticos, bastando con envolver los contenedores empleados para alojar las semillas con papel de aluminio. El seguimiento de las semillas germinadas se lleva a cabo semanalmente o con una mayor frecuencia (ej. cada dos días); en el caso del tratamiento en oscuridad el conteo debería efectuarse bajo luz modificada respecto al espectro visible.

En el caso de especies raras, endémicas o amenazadas, no es raro descubrir la carencia total de referencias bibliográficas sobre su germinación y multiplicación. Dado el poco material de que se dispone, interesa realizar previamente ensayos con material de otras especies del mismo género, para poder emplear así el mejor resultado obtenido en otras especies como referencia para iniciar los experimentos. Por otro lado, las plantas raras presentan a veces mecanismos particulares de germinación, incluso entre diferentes poblaciones del mismo taxón. Por ejemplo, en el caso de *Fritillaria hispanica* Boiss & Reut, se observó que las semillas de una de sus poblaciones (Penyagolosa, Castellón) necesitaron temperaturas bajas de ca. 4-5°C durante aproximadamente 2 meses para germinar, mientras que semillas del mismo taxón, recolectadas el mismo año en otra población (Pla de la Nevereta, Quatretonda, Valencia) germinaron sin vernalización en un porcentaje similar. En otras ocasiones se requieren condiciones específicas de baja temperatura, o fluctuaciones de temperatura muy bruscas, con cambios de 30-32°C a 7°C, como es el caso de *Diploaxis ibicensis* (Pau) Gómez-Campo, cuyas semillas germinaron en un 95% en el año 2001 (sembradas en placa Petri, en condiciones de invernadero) mientras que en laboratorio, con un rango de temperaturas constantes, germinó tan solo el 21%.

Conservar y gestionar correctamente el germoplasma significa también conocer las estrategias que las especies emplean para su perpetuación; lo cual necesitamos conocer con mayor interés en especies amenazadas, con objeto de propiciar el desarrollo de tales estrategias y frenar en la medida de lo posible su estado de amenaza, así como paralelamente conservar germoplasma como reserva, de modo que se pudieran obtener nuevos ejemplares del taxón en cuestión en caso de que sucediesen desastres naturales que llevasen irremediamente a pérdidas considerables de taxones.

Sem	Sucesión paralela de ciclos térmicos		Control			
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)
	4 repeticiones de 25 semillas	4 repeticiones de 25 semillas	4 rep. de 25 semillas	4 rep. de 25 semillas	4 rep. de 25 semillas	4 rep. de 25 semillas
12	5°C invierno	25/15°C verano	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	15/6°C inicio primavera	20/10°C inicio otoño	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	20/10°C fin primavera	15/6°C fin otoño	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
12	25/15°C verano	5°C invierno	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	20/10°C inicio otoño	15/6°C inicio primavera **	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	15/6°C fin otoño	20/10°C fin primavera **	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
12	5°C invierno	25/15°C verano	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	15/6°C inicio primavera *	20/10°C inicio otoño	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	20/10°C fin primavera *	15/6°C fin otoño	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
12	25/15°C verano	5°C invierno	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	20/10°C inicio otoño	15/6°C inicio primavera	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	15/6°C fin otoño	20/10°C fin primavera	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
↓↓↓ el proceso puede continuar, si fuera necesario, repitiendo los mismos ciclos ↓↓↓						

Tabla 15. Esquema de pruebas experimentales para la determinación de la temperatura o ciclo de temperaturas necesarias para eliminar la dormición, en los casos en que la peculiaridad de este carácter genético no sea conocida. La primera columna (Sem) indica el número de semanas para las fases del tratamiento. Modificado de BASKIN & BASKIN (2003b) (ver texto para más detalles).

8.8.2 Interpretación de los resultados

Si la especie necesita solamente frío y humedad invernal para romper la dormición y de temperaturas más elevadas para germinar, las semillas que comienzan con la fase fría (columna A) germinarán en el periodo que simula la estación sucesiva (primavera), mientras que las semillas de la columna B germinarán durante su quinta o sexta fase (también representadas por la primavera) solo después de pasado un periodo invernal. No se observará germinación en los controles con temperatura constante. Una variante de este caso clásico podría darse con semillas capaces de germinar a temperaturas muy bajas, una vez satisfecha la necesidad de frío, en cuyo caso podría observarse germinación tanto al término de la primera fase de la columna A, como de la cuarta fase de la columna B, ambas a bajas temperaturas, o bien después de un cierto periodo de permanencia a 5°C de forma constante (columna C).

Las semillas que necesitan, en secuencias sucesivas, de calor húmedo (verano) + frío húmedo (invierno) para romper la dormición, germinarán durante la segunda primavera si son expuestas a la secuencia prevista en la columna A (Tabla 15, señalado con un asterisco). Esto

sucede normalmente, de forma natural, en especies de la familia *Rosaceae*, o en el caso del fresno excelso (*Fraxinus excelsior* L.). Si, por el contrario, se comienza con la fase cálida (columna B), la germinación se observa apenas completado el requerimiento de calor húmedo + frío húmedo (Tabla 15, señalado por dos asteriscos). Al término de la incorporación de eventuales tratamientos debe tenerse en cuenta que las semillas que tienen este último tipo de dormición (denominada morfofisiológica), necesitan pasar por la fase cálida en primer lugar, para completar el desarrollo del embrión, y solo después por la fase fría, la cual actúa eficazmente desde un punto de vista fisiológico solo si el embrión ha alcanzado la madurez. Es evidente que el desarrollo de un procedimiento paralelo, donde las sucesiones térmicas comienzan con estaciones diferentes (invierno y verano), permite obtener respuestas más rápidas.

Los resultados de estos estudios podrían requerir una mayor profundidad, con el fin de determinar, por ejemplo, la duración adecuada de los ciclos térmicos. Del mismo modo puede resultar útil, con el fin de optimizar un desarrollo simultáneo de la germinación, la individualización de la temperatura de germinación óptima que debe ser aplicada después de romper la dormición. Las temperaturas ideales para la germinación son a veces más bajas de cuanto se podría prever, sobre todo en ambientes mediterráneos y templados donde los momentos frescos (otoño) son también los más húmedos del año y representan por ello la época ideal para la germinación de muchas especies.

La metodología descrita para individualizar las exigencias fisiológicas de la germinación permite obtener una información bastante precisa en tiempos de entre 12 y 14 meses, si bien los ajustes que deben realizarse al procedimiento son numerosos, según el juicio de cada investigador, y teniendo en cuenta la disponibilidad de las semillas, la cantidad y capacidad de los ambientes termo-controlados y la precisión de la información que pretende obtenerse.

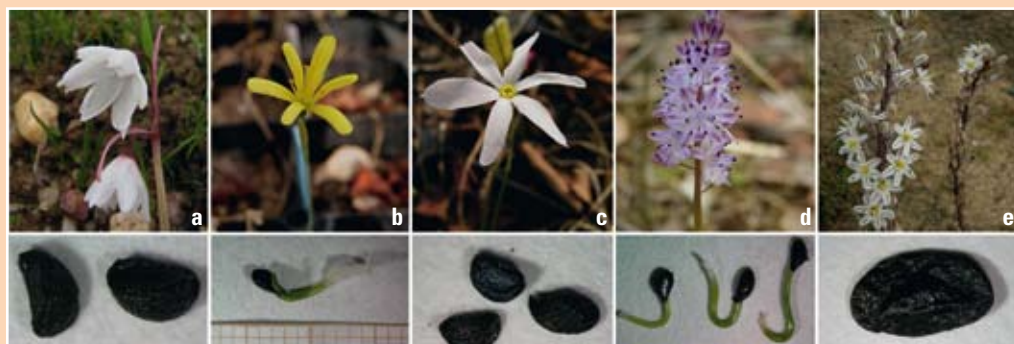
Germinación de geófitos mediterráneos otoñales (a partir de MARQUES & al., 2004)

Introducción

Los estudios relacionados con la germinación de semillas tienen un origen antiguo, posiblemente desde el siglo IV AC, con los trabajos realizados por Theofrasto (EVENARI, 1980-1981) y hasta nuestros días. Todo ello ha generado un importante acervo de información referente a la ecología, biogeografía y patrones evolutivos de la germinación y de la dormición (ver ELLIS & al., 1985; BASKIN & BASKIN, 1998; ISTA, 2004; BASKIN & BASKIN, 2003; NIKOLAEVA, 1977). El caso que se presenta a continuación es un ejemplo del tipo de resultado o conclusiones que podemos obtener a partir de un estudio de germinación. Los objetivos de este estudio son: (1) determinar la temperatura óptima de germinación, (2) la velocidad de germinación en función de la temperatura; (3) el efecto de la luz en la germinación de las especies.

Especies consideradas

Se estudiaron 5 especies bulbosas: *Leucojum autumnale* L. (Amaryllidaceae), *Narcissus cavanillesii* A. Barra & G. López (Amaryllidaceae), *N. serotinus* L., (Amaryllidaceae), *Scilla autumnalis* L. (Liliaceae) y *Charybdis maritima* (L.) Speta (Liliaceae). En general, estas especies se distribuyen por toda la cuenca mediterránea, salvo *N. cavanillesii*, endémico de SE de la Península Ibérica y N de África. Todas estas especies florecen y fructifican en otoño y en algunos lugares pueden coexistir en el mismo hábitat. Las semillas se dispersan gradualmente a finales de otoño. Todas las especies poseen semillas negras y esféricas con la excepción de *C. maritima* que posee una ala lateral (Fig.1). Las semillas se recolectaron en la misma localidad, en el mismo estado de desarrollo y sin vestigios de hongos o patógenos. Se conservaron a oscuras y en baja temperatura y humedad hasta ser analizadas.



Especies estudiadas: (a) *Leucojum autumnale*; (b) *Narcissus cavanillesii*; (c) *N. serotinus*; (d) *Scilla autumnalis*; (e) *Urginea maritima*.

Condiciones de germinación

Un mes después de la recolección, las semillas se colocaron a germinar en placa de Petri (diam. 7 cm.), con dos capas de papel de filtro y humedecidas con 3 ml de agua destilada. Para cada tratamiento se utilizaron 4 réplicas con 25 semillas en cada una. Utilizando la clave de caracterización de la dormición (ver apartado 8.3.1) se determinó que ninguna de la 5 especies tenía indicios de dormición. Así, las placas se incubaron sin ningún pretratamiento, a 4 temperaturas distintas, 3 de ellas constantes (15°C, 20°C y 25°C) y una alterna (25°C/15°C). Las condiciones de oscuridad se aseguraron envolviendo las placas en papel de aluminio. Las semillas se revisaron cada 2 días, retirando aquellas germinadas (CÔME, 1970). Los datos obtenidos se sometieron a un análisis ANOVA para determinar el efecto de la temperatura. Para la comparación de medias se utilizó el ensayo de comparación múltiple de Scheffé post hoc ($p < 0.05$) previa transformación de los porcentajes (arcsen).

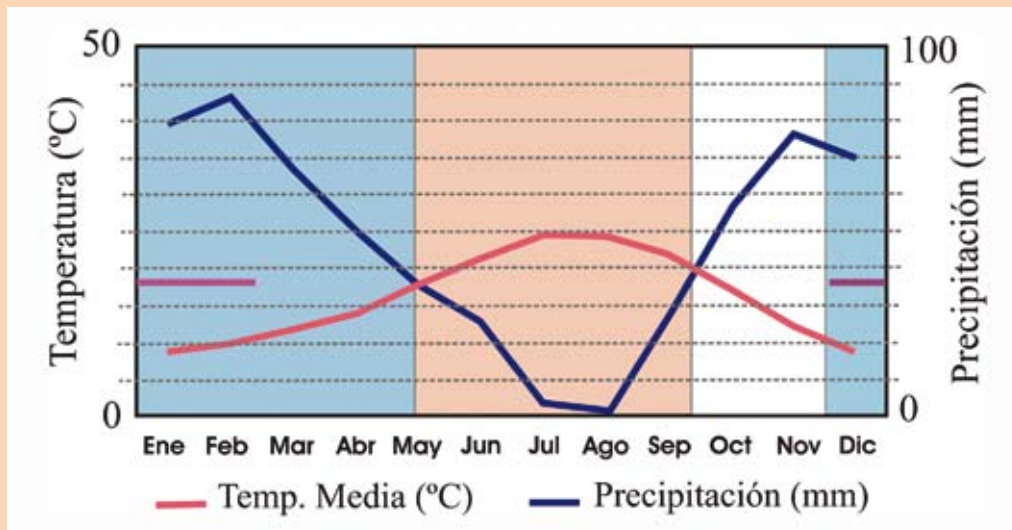
Los resultados permitieron determinar que la temperatura desempeña un importante papel ecológico en la germinación de estas especies. En general, todas ellas presentaron una tasa de germinación mayor a temperaturas bajas (15-20°C) aunque tienen alguna respuesta a cualquier temperatura. La excepción a este comportamiento fue *N. cavanillesii*, que sólo germinó a 15°C. Basándonos en el T_{50} , todas las especies presentaron una germinación rápida a estas temperaturas, ya que la mayoría de semillas germinaron los primeros días.

Temperaturas moderadamente bajas, entre 15°C y 20°C, se consideran ideales para la mayoría de especies mediterráneas (ej. THANOS & DOUSSI, 1995; BASKIN & BASKIN, 1998; DOUSSI & THANOS, 2002) que en condiciones naturales germinan a inicio de primavera u otoño (temperaturas suaves y disponibilidad de agua). La influencia positiva de la temperatura alterna sobre la germinación se puede interpretar como un mecanismo adaptativo para las semillas existentes en las capas superficiales del suelo (BASKIN & BASKIN, 1998; ALBERT & *al.*, 2002). No se detectó ningún efecto de la luz o de la oscuridad a ninguna temperatura. Todas las plántulas resultantes de los ensayos presentan características normales de desarrollo, crecimiento radicular, establecimiento y desarrollo foliar sin diferencias significativas.



S. autumnalis: semillas 2 días tras la germinación (a); seguimiento morfométrico de las semillas tras 2, 6, 9 y 12 días respectivamente (b); plántulas de 6 meses de edad, enraizadas en suelo y en condiciones naturales (c).

Pero y... ¿en condiciones naturales?



Ventanas de germinación basados en el diagrama ombrotérmico de Badajoz (a 12 km del lugar de recolección). La línea horizontal rosa indica la duración del período de liberación de las semillas. El fondo azul representa el período que se ajusta a las condiciones más favorables a la germinación de las semillas producidas en el mismo año. La zona central (en naranja) corresponde al periodo seco donde la escasez de agua limita la posibilidad de germinación. La zona en blanco corresponde al periodo de floración.

Las 5 especies estudiadas tienen semillas sin dormición, que germinan en el mismo año en que se producen y que no crean un banco de semillas permanente en el suelo. La germinación es elevada y rápida frente a temperatura suave generando rápidamente un conjunto de plántulas. Este conjunto de nuevos individuos es el responsable del mantenimiento de los niveles poblacionales y puede ser determinante frente a situaciones de colonización de nuevos espacios. La capacidad de mantener un determinado tamaño poblacional necesita también de un elevado fitness reproductivo, así como una baja competencia intraespecífica, ya que dependen de la constante formación de semillas y plántulas

Es importante destacar que los valores de temperatura óptima de germinación que se han constatado son muy semejantes a los valores medios de la temperatura de los lugares de procedencia del material (16°C). Relacionando estos resultados con los datos del diagrama ombrotérmico, de la estación pluviométrica más próxima se verifica que:

- Considerando las temperaturas analizadas (entre 15° - 25°C), se verifica que es el rango más común durante todo el año (azul). La media mensual raramente es inferior a los 15°C, sólo en diciembre y enero con valores de 8-9°C.
- Se verifica que el período seco y caliente va desde final de mayo hasta septiembre (en naranja). Durante este periodo la escasa disponibilidad hídrica condicionará la germi-

nación y la supervivencia de las plántulas formadas inmediatamente antes del periodo seco.

- Así, se constatan 3 estrechas ventanas anuales propicias para la germinación donde las temperaturas oscilan entre 15 - 20 °C y hay cierta disponibilidad hídrica: de mitad de noviembre a mitad de diciembre y de abril a mayo. Para las semillas que no germinaron en estos dos periodos y son capaces de resistir al verano surge otra ventana a finales de octubre siempre que llueva en septiembre.

Principales conclusiones

Comparando estos resultados con la fenología de las especies, principalmente la duración de la dispersión (línea rosa), podemos considerar las siguientes hipótesis sobre el comportamiento de las semillas en condiciones naturales:

1. **Inmediatamente después de la caída de la semilla se produce la germinación:** Según los resultados las semillas germinan fácilmente tras 2-3 días hidratadas, incluso las semillas que se liberan en las fases finales tienen posibilidad de germinar. Al tratarse de geófitos pasarán la época seca (mayo-septiembre) sin parte aérea y deberán haber conseguido acumular suficientes reservas para sobrevivir a la misma. Los individuos que no tengan un mínimo de reservas perecerán durante la época seca. Por este motivo las primeras semillas que se liberan a finales de otoño son las que van a disponer de más tiempo y acumularán más reservas que las semillas que germinan a finales del periodo de dispersión que aunque germinen y se establezcan no resistirán hasta el próximo periodo reproductor. Esta consideración se basa únicamente en la duración del tiempo disponible para acumular reservas, sin considerar que puede haber otros factores como la tasa fotosintética que compense a los individuos que germinan en primavera.
2. **La semilla es capaz de no germinar y germinar a inicios del otoño siguiente (antes de la correspondiente lluvia de semillas nuevas):** Una pequeña proporción de semillas que se liberaron en primavera y no han germinado pero han permanecido viables incluso tras el verano vuelve a tener las condiciones propicias al inicio del otoño siguiente. Esta hipótesis asume que las semillas no germinarán inmediatamente después de la liberación e implica la existencia de mecanismos de dormición. Para que estos mecanismos sean activados las semillas tienen que pasar por un periodo de temperaturas elevadas y baja humedad. Con las primeras lluvias de otoño se vuelve a abrir la ventana de germinación.

Dado que no se detectaron mecanismos de dormición, la primera hipótesis se considera la más probable. De este modo, el grupo de especies estudiado presenta una perfecta adaptación al medio que ocupa, aunque el reclutamiento de nuevos individuos está muy influenciado por las condiciones ambientales y no tanto por condiciones endógenas.

9. Colección activa y producción de plantas

9.1 Colección activa en bancos de germoplasma

Además del material destinado a la conservación a largo plazo (colección base), cada banco debe garantizar la disponibilidad de lotes de semillas para su uso a corto y medio plazo. Este material puede ser empleado para actividades propias de la conservación *ex situ* como la regeneración, la duplicación de colecciones, la creación de nuevas poblaciones, el mantenimiento de colecciones de plantas, etc. La colección activa también se utiliza para efectuar acciones de apoyo a la conservación *in situ*, como el refuerzo de poblaciones o las reintroducciones. También se incluye en esta colección el material destinado a pruebas experimentales de investigación científica y al intercambio a través del *Index Seminum*. Las semillas que constituyen la colección activa de un banco de germoplasma suelen mantenerse deshidratadas a temperaturas de entre 0 y 10°C.

9.1.1 *Index Seminum*

La gestión del material utilizado en los intercambios con otros centros de investigación suele basarse en los protocolos de oferta de semillas conocidos como *Index Seminum*. La relación del material disponible para intercambio y la cantidad de dicho material (en gramos y/o número de semillas) debe estar disponible y ser actualizado periódicamente, mediante publicaciones, notas informativas, catálogos, páginas web, etc. La petición de material, llamada *Desiderata*, se realiza generalmente mediante la cumplimentación de formularios, en papel o en formato digital, de los que dispone cada institución. Son un ejemplo válido los formularios de petición de semillas de la *Asociación Ibero-Macaronésica de Jardines Botánicos* (<http://www.jbotanicos.org>) o el de la *Banca de Germoplasma della Sardegna* (<http://www.ccb-sardegna.it/>).

En algunos bancos de semillas o jardines botánicos las semillas ofertadas se conservan en frascos de plástico sellados con parafilm o bolsas de plástico o de aluminio de triple estrato. En otros casos las semillas se mantienen en condiciones análogas al resto de lotes del banco, por ejemplo en tubos de vidrio aislados y con un indicador de humedad como el gel de sílice (ver capítulo 6). El centro que recibe el germoplasma es informado de su procedencia, de los tratamientos a los que ha sido sometido, de los controles realizados y de las condiciones óptimas de germinación, mediante una copia de la ficha de campo y de la ficha de laboratorio. A su vez, el centro receptor debe transmitir datos relativos a cada lote recibido, y en particular:

- Destino del lote recibido (ej. colecciones de semillas, colecciones de plantas vivas, investigación, etc.).
- Datos sobre germinación (ej. porcentaje, posibles pre-tratamientos y condiciones de germinación, número de plántulas obtenidas).
- Viabilidad de las semillas.
- Posibles dudas en la determinación del taxón.

El intercambio de información entre los bancos sobre el material solicitado puede constituir un elemento importante de encuentro y una oportunidad de colaboración entre instituciones.

9.1.2 Duplicados de las accesiones

Otra acción importante a impulsar entre las instituciones involucradas en la conservación *ex situ* es la duplicación de las colecciones. De esta manera, se puede llegar a asegurar la disponibilidad del germoplasma, incluso en el caso de producirse daños técnicos u otros inconvenientes que pudiesen perjudicar el estado de conservación de las colecciones custodiadas por un determinado banco (incendios, inundaciones, etc.). El intercambio de germoplasma, como se ha establecido por ejemplo en el proyecto GENMEDOC del programa INTERREG IIIB (www.genmedoc.org), se realiza mediante la aplicación de un protocolo común, acordado entre las instituciones referente a la cantidad de material y el método de conservación utilizado.

Un punto fundamental en el intercambio de material es el relativo a la propiedad del germoplasma (ver cuadro II). La institución que envía el material permanece como único propietario del mismo y puede solicitar que sea devuelto cuando existan exigencias para su conservación *in situ*; la institución que lo recibe es, por lo tanto, sólo un custodio del germoplasma. El intercambio de los lotes de semillas está además vinculado al régimen fitosanitario establecido por las autoridades competentes nacionales e internacionales.

9.2 Producción de plantas a partir de semillas

El principal destino de una colección activa es su uso a corto o medio plazo para producción de plantas. El proceso de producción de plantas es una etapa fundamental en la conservación de las especies cuya propagación se realiza normalmente por vía sexual. De hecho, la conservación de las accesiones de semillas de un determinado taxón no es válida si no se tiene la capacidad de reproducir este material. Como ya se apuntó anteriormente, en el campo de la conservación, la necesidad de producir planta responde a diferentes objetivos: refuerzo de poblaciones como apoyo a la conservación *in situ*, regeneración para la reposición de accesiones o creación de nuevas poblaciones o de colecciones vivas *ex situ*. A menudo es necesario disponer también de plantas para estudios científicos.

No se tiene la pretensión de realizar aquí una descripción exhaustiva de las metodologías y técnicas actualmente disponibles para la producción de planta; la finalidad de este apartado es resumir la experiencia madurada en los casos en los que se dispone de una cantidad de semillas limitada, ya que es una situación muy común cuando se trabaja con taxones y/o poblaciones amenazadas. La casuística en relación con las metodologías de siembra y producción de planta es muy amplia, puesto que las exigencias se pueden diversificar mucho en función de las especies y los protocolos tienden siempre a ser específicos para cada una de ellas. No obstante, en todos los casos se debe utilizar un sustrato adecuado e introducir en él las semillas bajo las condiciones ambientales más idóneas para favorecer la germinación y proteger el material de los agentes biológicos y abióticos que puedan producir daños en el cultivo (ej. agentes climáticos, patologías, aves o pequeños mamíferos, etc.).

Tipos de semilleros

La siembra del material debe efectuarse preferiblemente en un lugar donde sea posible controlar la temperatura, la humedad y la luz, puesto que la germinación es el proceso más delicado del desarrollo de la planta. Lo ideal es disponer de cámaras de crecimiento aisladas, con sistema de climatización, con humedad controlada, riego adecuado y luz artificial uniforme, para colocar en ellas las macetas o contenedores con el material ya sembrado. En general, se suele trabajar en invernaderos, por lo que el grado de control de los parámetros ambientales puede variar mucho, en función del nivel de automatización del que se disponga. Cuando se cuenta con un número muy reducido de semillas, se recomienda controlar al máximo las condiciones ambientales y emplear cámaras de germinación o de cultivo.

En el caso de que no se disponga de las estructuras y equipos citados anteriormente, se pueden utilizar bancos termorregulados (camas de calor) (figura 9.1), dispositivos más económicos con los que se obtiene un aceptable control climático para muchos taxones (JIMÉNEZ & CABALLERO, 1990). En situaciones extremas se puede realizar la siembra en el exterior, manteniendo protegido el ambiente de factores meteorológicos limitantes, en la medida que sea posible (ej. viento, radiación solar elevada, heladas, etc.). Sin embargo, se ha de tener en cuenta que los porcentajes de germinación obtenidos a la intemperie son más bajos que los que se logran en invernadero, y éstos, a su vez, son siempre menores que los logrados en cámara de germinación.



foto: E. Mattana

Figura 9.1: Invernadero climatizado con mesas de cultivo termoreguladas.

Las exigencias de luz, temperatura y tipo de suelo de cada especie son diferentes; como regla general se tiende a recrear, en lo posible, las condiciones climáticas y edáficas del hábitat natural en el que se desarrolla la especie. Esto conlleva a que, cuando se trabaja simultáneamente con diferentes taxones, no se pueden concentrar todos los semilleros en la misma zona del vivero o del invernadero. Por ejemplo, el semillero de *Anchusa littorea* Moris, taxón endémico de las áreas costeras sur-occidentales de Cerdeña, se debe colocar en un lugar expuesto a la luz solar directa durante numerosas horas, mientras que el semillero de *Anchusa formosa* Selvi, Bigazzi & Bacch., planta endémica de un área montañosa del suroeste de Cerdeña, debe ser ubicado en posiciones mucho más sombrías y con temperaturas medias más bajas. Por esto, en función del número de taxones que se vaya a cultivar, se seleccionan varios lugares del vivero destinados a dichos semilleros, agrupando las unidades taxonómicas en función de sus exigencias. Por ejemplo, se colocarán juntas *Anchusa littorea* con otras plantas típicas de la primera línea de costa del género *Limonium* (utilizando para este último, sin embargo, un sustrato diferente).

Para las plantas de las que no se conoce sus exigencias ecológicas, es oportuno trabajar en condiciones de laboratorio, utilizando cámaras de germinación (THOMSON, 1979). De esta

foto: M. C. Escribá



Figura 9.2: Plántulas de *Silene dioica* sembradas en bandejas de uso alimenticio.

manera se podrá individualizar con mayor precisión las mejores condiciones para el taxón a examen y así establecer el protocolo de reproducción más adecuado. Una vez que se obtienen las plántulas, no es aconsejable transportarlas directamente al invernadero. Como paso intermedio, se aconseja su permanencia en la cámara durante 3-4 días para la observación de su evolución y desarrollo.

Contenedores

El mercado ofrece una amplia gama de contenedores, de diferentes tipos y tamaños. En el semillero se trabaja fundamentalmente con macetas o bandejas perforadas o con alvéolos de diferentes tamaños. Cuando se trabaja con cantidades muy pequeñas de semillas y con diferentes taxones surge la necesidad de disponer de mucho espacio de pequeñas dimensiones y características diferentes, por lo que se utilizan diversos tipos de bandejas y dimensiones de alvéolos, siempre en función de las características de cada especie.

En la mayor parte de los casos el material se siembra en bandejas de plástico perforadas en la base (VILARNAU & GONZÁLEZ, 1999) (figura 9.2). Este sistema permite la obtención de un número elevado de plantas ocupando poca superficie. En el mercado se pueden encontrar

bandejas reutilizables de plástico flexible que son particularmente aptas para los taxones cuyas semillas no se mantienen en cultivo durante mucho tiempo. Dichas bandejas se perforan para obtener un drenaje adecuado en función de la especie. Este tipo de contenedor se degrada fácilmente por la acción de la luz solar y su manipulación puede resultar incómoda debido a su flexibilidad.

Como alternativa, se aconseja utilizar bandejas de plástico rígidas de uso alimentario, de tamaños diferentes, perforándolas en la base para que drenen. Las ventajas de estos contenedores se deben a que no se estropean excesivamente con el sol, son fáciles de utilizar por su rigidez, y con su uso se optimiza el espacio, ya que se fabrican en una extensa gama de tamaños.

Cada vez es más común el empleo de bandejas con alvéolos. Por ejemplo, para especies del género *Limonium* se utilizan bandejas de alvéolos de muy pequeño tamaño (40/45 cm³); el sistema radical se adapta muy bien a una estructura de este tipo y, tratándose de un género en el que el porcentaje de germinación es muy elevado, prácticamente se obtienen plántulas en todas las cavidades. En definitiva y como regla general, se aconseja el uso de alvéolos para especies con porcentajes de germinación elevados y con germinación no escalonada; estas características permiten la obtención de plántulas en todos o casi todos los alvéolos con una gran homogeneidad en su desarrollo.

Es muy importante valorar las dimensiones del contenedor a emplear teniendo en cuenta la especie, el tamaño final de la planta deseado y el método de cultivo (si se va a efectuar repicado, cambio de envase o si la planta permanecerá en el mismo envase durante todo su cultivo). Para especies que alcanzan ciertas dimensiones y que permanecen un periodo de tiempo en el semillero antes de ser transplantadas a contenedores definitivos, se utilizan bandejas perforadas o con alvéolos de, al menos, 18 cm de altura. En el caso de especies arbóreas con semillas de cierto tamaño, para la producción de plantas de una savia se emplean alvéolos de 200 cm³ (coníferas) o de 300 cm³ (caducifolias de un único fuste) (RUANO, 2003). Eventualmente, si la planta permanece más tiempo en el vivero se aconseja su trasplante a contenedores de mayor volumen.

Resulta fundamental evitar las deformaciones en el aparato radical desde el inicio del desarrollo de las plántulas, puesto que dichas deformaciones tienden a mantenerse a lo largo del tiempo, creando problemas de estabilidad en las plantas adultas. Este problema resulta particularmente grave en las especies arbóreas, que necesitan siempre de una buena fijación al sustrato. Muchos contenedores actualmente disponibles en el mercado, especialmente los destinados a plantas forestales, presentan dispositivos que evitan el crecimiento en espiral de las raíces (ej. canales, fisuras o relieves verticales en sus paredes). Las raíces de las plantas desarrolladas en contenedores colocados directamente sobre el suelo o sobre superficies impermeables tenderán a escaparse, favoreciendo traumas y roturas cuando se muevan de lugar. Por otro lado, el uso de parterres elevados del suelo o de contenedores con diseño adecuado favorece el repicado natural y la formación de un mejor y más proporcionado sistema radical. Todos los contenedores deben ser desinfectados antes de su uso y/o reutilización. Para la desinfección se utiliza generalmente una solución de agua e hipoclorito de sodio en la que se introducen los contenedores durante al menos 30 minutos; posteriormente se lavan con abundante agua corriente.

Sustratos

No existe un sustrato estándar, puesto que varía en función de la especie que se cultiva. En cualquier caso, se pueden realizar unas recomendaciones generales: el pH del sustrato debe ser ligeramente ácido y con capacidad de tamponar, debe poseer una buena retención hídrica y facilidad de humidificación, de textura fina, baja densidad, elevada porosidad total y buena capacidad de aireación, con una estructura estable (de manera que no se contraiga o expanda ejerciendo presiones sobre las semillas o plántulas), baja salinidad, contenido en materia orgánica elevado, baja velocidad de descomposición, suficiente nivel de asimilación de nutrientes y sin hierbas infestantes, sustancias fitotóxicas o parásitos (RAYMOND, 1989).

Para plantas sin requerimientos edáficos muy específicos se suele emplear una mezcla de turba con algún otro elemento que proporcione mayor aireación, como vermiculita o perlita. Sin embargo, otras especies necesitan de un sustrato diferente, similar al de su hábitat. Por ejemplo, para *Silene cambessedesii* Boiss. & Reut., el sustrato más adecuado es el compuesto por un 70% de arena silíceas con granulometría variable entre 2 y 3 mm, y un 30% de sustrato universal (RAYMOND, 1989), puesto que es una planta que se desarrolla en zonas arenosas costeras (TALAVERA & MUÑOZ GARMENDIA, 1989; GUARA & CIURANA, 2002).

Siembra y prácticas de cultivo

La siembra consiste en colocar las semillas en el sustrato. En función del tamaño de las semillas, se puede realizar directamente a mano, utilizando pinzas de laboratorio o mezclando el lote de semillas con arena fina estéril o talco para su mejor distribución. La profundidad de siembra debe ser igual o menor al doble de la anchura de la semilla (BESNIER, 1989). Una vez efectuada la siembra, es conveniente cubrir el semillero con un fino estrato de arena estéril o vermiculita para impedir la deshidratación de la parte superficial y protegerlo de la incidencia directa de los rayos del sol. Después de la siembra, se suele compactar y regar el sustrato ligeramente con la mano para evitar la escorrentía o pérdida de humedad.

El riego se realizará siempre con agua de calidad, limpia y con baja salinidad, para evitar problemas de fitotoxicidad. Se debe dotar al sustrato de humedad constante incluso antes de la siembra, manteniéndolo en el punto de saturación y evitando excesos que podrían provocar infecciones fúngicas nocivas para la radícula. Es muy aconsejable disponer de riego por vaporización; en caso contrario, se deben hidratar las bandejas desde su base por capilaridad, con el fin de evitar que caigan gotas sobre las plántulas, sobre todo en especies con plántulas muy pequeñas o con hojas pilosas que retengan mucha humedad.

La temperatura óptima para el desarrollo varía en función del taxón. En general, se considera adecuada una temperatura en torno a los 20°C. Sin embargo, muchas especies de climas templados necesitan fuertes cambios de temperatura, como sucede a finales de invierno o principios de primavera, para poder iniciar los procesos de germinación (ver capítulo 8). No obstante y en general, los cambios bruscos de temperatura pueden causar daños muy graves en los procesos de germinación. Se considera que las temperaturas extremas para cultivar plantas rondan los 35°C, ya que a temperaturas superiores la capacidad fotosintética disminuye considerablemente. Esto debe tenerse en cuenta en todas las instalaciones de cultivo en vivero. Actualmente algunas cámaras de crecimiento o germinadoras disponen de sensores de alarma para temperaturas extremas.

Si bien no se conocen las exigencias de luz para la germinación de muchas especies (intensidad, duración del fotoperiodo, etc.), resulta obvio que, una vez que aparecen los cotiledones o las primeras hojas caulinares, todas las especies necesitan luz. Durante la fase de crecimiento se debe evitar el sombreado excesivo que pueda producir plantas *etioladas*. En el ámbito mediterráneo, para limitar los efectos negativos de la radiación solar durante el periodo estival, conviene proteger las plantas de la luz solar directa con sombras o estructuras de tela de diferentes tipos y porcentajes de sombreado.

La fertilización de las plantas en semillero se realiza manualmente, cuando ya se ha desarrollado el segundo par de hojas caulinares. No es conveniente efectuarla antes para no producir quemaduras en las raíces. Para ello se puede utilizar un fertilizante convencional del tipo N-P-K 5-4-6 con microelementos. Otra opción es el empleo de fertilizantes de liberación lenta, que pueden ser incluidos en el sustrato en el momento de su preparación. Este tipo de fertilización se ha utilizado con resultados óptimos para *Dianthus turoloensis* Pau, que habita en matorrales secos y pastizales vivaces de zonas elevadas y *Teucrium dunense* Cenen., propia de arenales costeros mediterráneos.

El repicado es el momento en el que la plántula se saca del semillero y se coloca en un contenedor mayor o se planta directamente en campo. Generalmente se evita realizar tratamientos con herbicidas cuando las plantas son muy pequeñas. Las hierbas infestantes pueden ser eliminadas manualmente, procurando no dañar las raíces o desenterrar las plantas. En el caso de repicar a un nuevo contenedor, éste deberá ajustarse a la morfología y las dimensiones del sistema radical de la planta y al tiempo estimado para su cultivo, como ya se indicó anteriormente. El momento óptimo varía en cada especie, y debe realizarse cuando la plántula es lo suficientemente consistente y vigorosa como para tolerar la manipulación. Por ejemplo, las plántulas de *Carduncellus dianius* Webb tienen ya la consistencia y flexibilidad suficiente como para ser trasplantadas con sólo un par de hojas caulinares. Las plántulas de *Ononis tridentata* L. deben ser trasplantadas con al menos 2 ó 3 cm de altura para que el porcentaje de arraigue sea elevado. Las plántulas de otras especies, como en el caso de *Silene diclinis* (Lag.) M. Lainz (figura 9.2), deben trasplantarse con 4-6 hojas caulinares para una recuperación vigorosa. Algunas especies pueden permanecer durante largos periodos de tiempo en el semillero sin debilitarse, como es el caso de *Teucrium lepicephalum* Pau.

Una modalidad algo particular para la obtención de plántulas de algunas especies consiste en aprovechar el material obtenido del banco de semillas del suelo (ver apartado 3.3). Aunque no se aconseja como práctica habitual, ésta puede ser una vía para individualizar rápidamente los protocolos adecuados de germinación, para obtener semillas difíciles de recolectar con las metodologías convencionales, o bien para disponer de semillas en un estado adecuado para su germinación. Como ejemplo, se puede citar el caso de *Filago mareotica* Delile, en el que las semillas, extremadamente pequeñas, se mantienen en el suelo y germinan en el momento en el que las condiciones son óptimas.

Durante todo el proceso de producción de plantas, desde la preparación para la siembra hasta su destino final, se deben registrar en una ficha todas las actividades realizadas, así como también los resultados obtenidos, las condiciones y el lugar en el que se encuentra el material, además de cualquier otra información de interés.

9.3 Gestión de material vegetativo para propagación convencional

Las accesiones en forma de partes de plantas que se recolectan con vistas a la conservación de una población o taxón podrían ser consideradas como parte de la colección activa de un banco de germoplasma, entendida en un sentido amplio, ya que la capacidad de mantener este tipo de material sin propagarlo durante un período de tiempo prolongado resulta inviable. La recolección del material vegetativo y su posterior propagación puede ser una buena vía, a veces la única, para la conservación de un genotipo, de un taxón o de una población. Las técnicas de propagación vegetativa convencionales pueden emplearse en el caso de poblaciones en grave peligro de extinción, de poblaciones o individuos que no producen semillas o que producen cantidades muy pequeñas. Estas técnicas resultan muy útiles cuando se prevé una reducción en la variabilidad genética de la descendencia respecto de la generación parental (por ejemplo en poblaciones de taxones dioicos con un número muy reducido de individuos masculinos), cuando se desea conservar un determinado genotipo que presenta caracteres peculiares o para poblaciones cuyas semillas han podido estar fecundadas con polen no perteneciente al taxón que se desea conservar (introgresión con especies alóctonas o con genotipos de procedencia no autóctona o desconocida). También es una buena estrategia de conservación para especies que se propagan fácilmente por vía vegetativa, como las *Salicaceae* (ver Cuadro 9), o para especies con semillas recalcitrantes.

Por lo general se puede utilizar cualquier parte de la planta para su propagación vegetativa. Teniendo en cuenta las metodologías de propagación clásicas, los materiales más utilizados son las estaquillas aéreas herbáceas o leñosas, las estaquillas de raíz, los rizomas, los tubérculos y los bulbos. A continuación se hace referencia a las formas de recolección y a las posibilidades de conservación de este tipo de materiales hasta el momento de su propagación. La técnica se escogerá en función de la especie, de la edad de la planta madre, de la tecnología e instalaciones disponibles y del método de conservación. En cualquier caso, debido a fenómenos de topósis y ciclósis, los mejores resultados suelen obtenerse cuando el material es recolectado de plantas madre u *ortets* jóvenes o de vástagos jóvenes de las mismas.

Las estaquillas leñosas (figura 9.3) son muy utilizadas para especies caducifolias (ej. *Salix*, *Populus*, *Tamarix*, *Laburnum*, *Cornus*, *Rosa*, *Ribes*, *Vitis*, etc.) porque se conservan durante un periodo relativamente largo y generalmente no requieren de complicados tratamientos en la fase del desarrollo radical. Este tipo de estaquillas se recoge durante la fase de estasis del ciclo biológico de la planta, generalmente de la madera del ciclo de crecimiento anterior. El material se corta generalmente de la porción basal y central de las ramas vigorosas, con entrenudos de crecimiento moderado. En el campo se suelen recoger las ramas enteras y es en el laboratorio o en el vivero donde se producen las estaquillas. Para ello se utilizan tijeras de podar desinfectadas y bien afiladas para obtener cortes netos. Normalmente se realiza un corte oblicuo en una de las extremidades de la estaquilla, generalmente en la parte basal, para indicar su polaridad, ya que es un aspecto a tener muy en cuenta en el momento de la plantación.

Las dimensiones de las estaquillas son muy variables en función de la especie, pero en general su longitud varía entre 10 y 20 cm, con un diámetro comprendido entre los 0,6 y 2,5 cm; además, deben tener, como mínimo, dos yemas en buen estado. El corte basal se debe realizar



foto G. Bacchetta

Figura 9.3 – Multiplicación mediante estaquillado en el *Conservatoire Botanique National de Porquerolles*.

inmediatamente por debajo de un nudo y el superior aproximadamente a 2 cm por encima del siguiente nudo. Este tipo de estaquillas se puede conservar en ambiente con humedad elevada, pero evitando la proliferación de los hongos, a una temperatura entre 0 y 5°C. Para las especies que enraízan fácilmente, como las *Salicaceae*, se puede conservar las varetas directamente en estas condiciones, tal y como se han recogido en el campo, y sólo cortar las estaquillas justo antes de ser plantadas. Las estaquillas se conservan normalmente en mazos, manteniendo su polaridad, es decir, todas con la parte basal hacia el mismo lado.

Las estaquillas leñosas de especies de hoja perenne, tanto de frondosas como de coníferas, suelen presentar mayores dificultades para su enraizamiento respecto de las anteriores. En las estaquillas de frondosas perennifolias, se cortan las hojas o parte de ellas y así se evita su desecación. Para su transporte conviene envolverlas en una tela húmeda y prepararlas inmediatamente para su enraizamiento en un ambiente controlado.

Las estaquillas no leñosas (ej. *Myrtus*, algunas *Rosaceae*, *Acer*) o sólo parcialmente leñosas (ej. *Euonymus*, *Erica*, *Calluna*, *Viburnum*, *Nerium*, *Rosmarinus*, *Santolina*, *Taxus*, *Prunus*, *Ilex*, *Lonicera*, *Rhododendrom*) se suelen recoger en primavera y verano, se protegen de la pérdida de humedad y se colocan para enraizar lo más rápidamente posible en un ambiente con clima controlado. La longitud de este tipo de estaquillas varía en función de la especie, aunque generalmente tienen 3 a 6 cm, llegando, como mucho, hasta los 10 cm.

Las estaquillas de raíz deben ser recogidas en el periodo de reposo vegetativo, generalmente a finales de invierno o principios de primavera. Durante la recogida y el transporte se debe mantener húmedo el material, cuidando de marcar la polaridad, al igual que se hace con las estaquillas aéreas. Este material no puede ser conservado, por lo que debe ser plantado inmediatamente en un ambiente controlado o no, en función de las exigencias de la especie. Se propagan con relativa facilidad mediante estaquillas de raíz las especies de los géneros *Acer*, *Populus*, *Malus*, *Rhus*, *Rosa*, *Rubus* y *Ulmus*.

Para las estaquillas foliares o estaquillas de yemas foliares, generalmente de especies de hoja perenne, es conveniente recoger en el campo las ramas y obtener las estaquillas posteriormente en el laboratorio; de esta manera se evita la desecación de este material tan delicado. Las hojas seleccionadas para la propagación deben estar sanas y con crecimiento activo y, en el caso de estaquillas con yemas, éstas deben estar bien desarrolladas. Las estaquillas deben ser cortadas, procesadas y plantadas en el sustrato adecuado para su enraizamiento en un lapso de tiempo lo más breve posible.

En el caso de propagación de frondosas por injerto, se debe recoger el material preferiblemente de la porción central y basal de ramas vigorosas de un año o del crecimiento del año, que presente yemas vegetativas sanas, evitando en lo posible el ápice y las zonas de inserción de la rama. En *Pinus* y otras coníferas con fuerte dominancia apical, generalmente se injertan fragmentos de la zona distal de las ramas dominantes, que presentan yemas vigorosas. En las frondosas de hoja caduca el material se puede recoger en cualquier momento durante el invierno y puede ser conservado, evitando su desecación, hasta el momento de su injerto. En el caso de los pinos, el material se recoge generalmente a principios de primavera y se injerta lo más pronto posible; el material de las coníferas se puede recoger hasta en verano, pero debe ser injertado inmediatamente en ambiente controlado o justo después de ser recogido si está sin lignificar o poco lignificado.

Para efectuar injertos de yema, conviene seleccionar yemas vegetativas bien desarrolladas. En el campo se cortan las ramas y se eliminan las hojas que nacen en la yema que se quiere injertar, dejando un trozo de pecíolo que facilitará la manipulación del material. Las yemas se extraen de las ramas inmediatamente antes de ser injertadas. El momento de la recogida del material depende de la especie, aunque también de las condiciones climáticas, ya que en zonas cálidas y dentro del invernadero se pueden realizar injertos con yemas en actividad (primavera), mientras que en ambientes fríos se deben de utilizar yemas en reposo recogidas entre julio y septiembre. Se debe evitar la desecación del material a injertar, envolviéndolo en papel o tela húmeda durante su transporte y hasta el momento de su multiplicación.

La recogida de material de plantas bulbosas es, en general, una actividad menos delicada que la recolección de otras partes de plantas, ya que los bulbos son estructuras adaptadas a sobrevivir en ambientes con relativa baja humedad. El momento más idóneo para su recolección es generalmente el de reposo, en verano o invierno en función de la especie, cuando la parte aérea está completamente seca. Los bulbos se extraen manualmente o con la ayuda de una azada u otro utensilio de jardinería. En el laboratorio o en el vivero se lavan, se desinfectan con fungicida y se dejan secar a la sombra. A continuación se cortan las raíces, se eliminan los restos de tierra y, si es necesario, se separan los bulbillos. La humedad más adecuada para la conservación de los bulbos depende de la especie; algunos no toleran la desecación, en particular los bulbos escamosos (ej. *Lilium*), que tienen que ser conservados en arena, vermiculita, serrín, turba o cualquier otro material que mantenga un alto grado de humedad. En general, los bulbos tunicados (ej. *Narcissus*) se conservan bien en bolsas de papel mantenidas en ambiente aireado y fresco y protegidas de temperaturas extremas hasta el momento de su multiplicación.

Se aconseja tratar el material vegetativo con fungicidas; en el caso de bulbos y estaquillas lignificadas este tratamiento se realiza, de forma preventiva, antes o durante la conservación, mientras que para las estructuras no lignificadas y para las raíces, que generalmente no toleran periodos prolongados de conservación, el tratamiento se realiza en el momento de la propagación o en la fase de enraizamiento. Asimismo, es indispensable asegurarse que el material esté correctamente etiquetado desde el momento de su recogida hasta su propagación.

Para obtener una descripción detallada sobre los diferentes métodos de propagación -los materiales y las condiciones de propagación más adecuados, la conveniencia de aplicar hormonas de enraizamiento a las estaquillas, etc.- se aconseja la consulta de obras específicas como las de HARTMANN & KESTER (1983) y MACDONALD (1987). El caso particular de la propagación de *Salicaceae* se detalla en el Cuadro 9, como paradigma de taxones en ambientes riparios o de taxones con cierto grado de amenaza (ej. *Populus nigra*) en los que la propagación vegetativa es la técnica habitualmente empleada para la producción de plantas y para su conservación.

9.4 Producción de materiales de reproducción de árboles y arbustos

9.4.1 Introducción

La producción de materiales de reproducción de los árboles y arbustos merece un tratamiento aparte debido a su importancia en el proceso de restauración del medio natural y en la conservación dinámica de los recursos genéticos de especies forestales. De hecho, existen numerosos centros cuya principal dedicación es el mantenimiento de una colección activa de lotes de semillas de diferentes especies para su uso a corto o medio plazo con el fin de producir plantas con diferentes objetivos.

El deterioro creciente de los ecosistemas y las medidas de restauración que deben adoptarse en el ámbito de la gestión del medio natural, correctoras o mitigadoras de los efectos negativos, hacen que sea necesario producir plantas de numerosas especies que juegan un papel fundamental en los ecosistemas, por su función estructural o por su relevancia en la interacción con otros seres vivos. Por otra parte, el deterioro generalizado del medio natural puede extenderse a los recursos genéticos de muchas de estas especies, incluso en aquellas que presentan una amplia distribución y que aparentemente no están amenazadas. Así, resulta imprescindible considerar la conveniencia de establecer planes de conservación de determinadas poblaciones de especies de árboles y arbustos de interés forestal o ambiental, considerando de modo especial los escenarios previstos por el cambio climático.

Es bien sabido que la diversidad genética puede ser mantenida *in situ* mediante la protección y adecuada gestión de los hábitats, o *ex situ*, a través de la recolección de germoplasma. Se reconoce que la primera opción es siempre la más recomendable por su carácter dinámico, ya que permite la acción de las fuerzas evolutivas sobre los individuos y las poblaciones. Sin embargo, en los casos en los que las poblaciones naturales estén amenazadas, es conveniente emprender el rescate de genotipos mediante la conservación de germoplasma o la creación de plantaciones de carácter estático o dinámico. No obstante, este tipo de medidas no se considera sólo en situaciones de último recurso, sino también como complemento a la conservación *in situ*, con el mantenimiento del material con vistas a su posible uso a corto, medio o largo plazo en el refuerzo de poblaciones. En cualquier caso, contar con los conocimientos necesarios para la recolección de materiales de reproducción, su adecuado manejo y conservación, así como también para la producción de plantas, es uno de los requisitos indispensables para que las medidas de conservación que se adopten sean las más convenientes y eficaces.

No se debe olvidar tampoco la importancia de la producción de plantas de aquellas especies arbóreas y arbustivas autóctonas de interés en el ámbito del aprovechamiento sostenible y de la mejora genética, cuyas técnicas y fines pueden hacerse compatibles con la conservación de recursos, especialmente en el caso del manejo de razas locales que presenten buen comportamiento para ciertos propósitos que se consideren prioritarios.

9.4.2 Gestión de semillas de especies forestales

Las técnicas empleadas para el acondicionamiento y conservación de semillas de árboles y arbustos no difieren de las aplicadas a otro tipo de plantas, aunque en ocasiones se necesitan medios mecanizados específicos, ya que se puede llegar a manejar grandes volúmenes de frutos y

foto: Martínez



foto: Herrero

Figura 9.4. (a) Recolección de semillas en un individuo de *Ulmus glabra* mediante escalada. (b) Recolección de piñas en un rodal selecto de *Pinus pinaster* mediante plataforma.

semillas. Este es el caso de la producción destinada a plantaciones masivas, como suele ocurrir con los pinos y las frondosas sociales, como hayas, encinas, robles y alcornos. En el caso de los árboles, la recolección puede llegar a ser bastante costosa, ya que en ocasiones hay que emplear medios de escalada específicos o plataformas mecánicas que faciliten el acceso a las copas (figura 9.4).

Otro de los aspectos a tener en cuenta en un gran número de especies arbóreas y algunas subarbóreas es que si el material producido y conservado está destinado a uso selvícola o a restauraciones, éste debe cumplir con los requisitos establecidos por la Directiva 1999/105/CE, en el caso de los países de la Unión Europea (ver capítulo II), y por otras normativas que hayan podido ser establecidas al respecto a nivel nacional o regional. Aunque en esta normativa no se fijan criterios de recogida de material, es conveniente tener en cuenta el principio de mantenimiento de una amplia base genética, debido a que los árboles y arbustos son especies longevas que están sometidas a presiones de selección cambiantes. La variación genética está directamente relacionada con la capacidad de adaptación de una población y por lo tanto con las probabilidades de éxito de la intervención, además de contribuir a la creación de poblaciones estables con un mayor valor natural.

De hecho, la variación genética puede verse reducida por una inadecuada gestión, desde la población originaria hasta la plantación. Sin embargo, los momentos más críticos parecen ser las fases de recolección de semillas, su posterior limpieza y tratamiento, y la fase de vivero (DUCCI, 2003). Así, mediante el empleo de técnicas moleculares, se ha puesto en evidencia la reducción de la diversidad genética en un huerto semillero compuesto por 19 clones en relación con las poblaciones de origen, y de las plantas obtenidas a partir de la cosecha del propio huerto respecto de la variación estimada en el mismo (MONTELEONE & al., 2005B). La necesi-

dad de aplicar unos criterios mínimos en la recolección de materiales se confirma también en el estudio realizado por BURGARELLA *et al.* (2004) sobre *Quercus ilex* L. en Andalucía, usando marcadores moleculares; los resultados ponen en evidencia la posibilidad de reducir la variación genética o de promover una diferenciación genética en las repoblaciones respecto de la población de origen. Se han obtenido conclusiones similares en una plantación de *Quercus pedunculata* Hoffm. en Lombardía, establecida con material de dos procedencias y estudiada con el fin de valorar su potencial para la recolección de semillas. Según los resultados obtenidos, la representatividad de la diversidad genética de una de las poblaciones de origen estaría representada en la nueva población, ya que se habría recolectado el material de un número adecuado de individuos; sin embargo, el conjunto de pies procedentes de la otra población acusaban una considerable pérdida de diversidad genética, debido seguramente a que procedía de la recolección de un escaso número de pies (CASTAGNA *et al.*, 2005).

Cuando el material tiene como destino la producción de plantas para restauración de hábitats y el establecimiento de plantaciones con fines protectores se debe procurar cosechar una cantidad equilibrada de semillas por pie, muestreando el mayor número de pies posible y dejando cierta distancia entre individuos recolectados. Este último criterio debe ser tenido en cuenta muy especialmente en especies que se propagan vegetativamente de manera natural (ej. brotes generados por las raíces) y que pueden dar lugar a grupos de individuos aparentemente independientes pero con un único genotipo (GRAUDAL *et al.*, 1995; WILSON *et al.*, 2003). Se suele indicar que el número de genotipos no emparentados utilizados para la producción de semillas no debería ser inferior a 30. La recolección de material de un número de genotipos mínimo es particularmente relevante en especies de árboles y arbustos que pueden llegar a producir una gran cantidad de semillas en un solo individuo, como por ejemplo en las encinas.

En la recolección de material para la creación o el refuerzo de poblaciones o para su mantenimiento estático a medio-largo plazo, dentro de programas de conservación de recursos genéticos, se debe ser aún más riguroso con el mantenimiento de una base genética amplia. Para realizar un muestreo en condiciones óptimas, debería valorarse inicialmente la distribución espacial de la variación genética dentro de las poblaciones con el fin de establecer distancias de muestreo, o bien efectuar selecciones al azar (ver capítulo 2). Como regla general, la recolección no debe efectuarse en individuos entre los cuales existan distancias inferiores a 100-200 metros (FAO, 1995). El número de individuos muestreados debe ser de varios centenares para promover que la diversidad genética recolectada sea representativa de la variación de la población original. Se pueden considerar como idóneas para la recolección áreas no inferiores a 10 ha y superficies proporcionalmente superiores para especies con distribución dispersa, como ocurre con nogales, serbales, cerezos, tilos, etc. (DUCCI *et al.*, 2001). Cuando se va a efectuar la recolección de frutos o semillas en poblaciones que ocupan cierta extensión, generalmente de especies anemófilas, es posible realizar un muestreo aleatorio simple, dividiendo la población mediante una gradilla y efectuando la recolección en un mínimo de 30 parcelas.

En ocasiones es conveniente efectuar un control estricto de la variación genética de la planta que se produce; por ejemplo, la destinada al refuerzo o creación de poblaciones en el marco de programas de conservación de recursos genéticos. En estos casos las semillas de los distin-

tos genotipos se mantienen individualizadas en lotes separados a lo largo de todo el proceso de producción. Ya en campo, se planta el mismo número de individuos (progenies) de cada lote, registrando su posición en la plantación mediante un croquis o estimando sus coordenadas con la ayuda de un GPS.

Sin embargo, cuando el objetivo es la producción de plantas con ciertas características genéticas, se deberá poner especial cuidado en efectuar una buena selección de los pies que van a ser recolectados, de acuerdo con su fenotipo o genotipo. Este es el caso de las recolecciones en las que se buscan determinadas características relacionadas con productividad, calidad, resistencia a plagas y enfermedades o adaptación a condiciones particulares. Normalmente este tipo de materiales constituye la base a partir de la cual se establece un programa de mejora genética, que incluye la instalación de plantaciones específicas, como huertos semilleros, ensayos de progenies o de clones, que permiten el desarrollo de nuevos ciclos de selección y mejora.

Además de la variación genética, en la recolección y el uso de los materiales de reproducción se debe tener en cuenta su origen geográfico y las condiciones ecológicas del sitio donde van a ser finalmente plantados. La transferencia de germoplasma procedente de áreas distantes, especialmente si las condiciones edafo-climáticas son diferentes, podría resultar contraproducente, incluso aunque proporcionen una mayor amplitud genética, ya que ésta no habría sido sometida a las presiones de selección locales y podría no adaptarse a su nueva situación ambiental. Los aspectos ecológicos que revisten mayor importancia a la hora de definir la adaptación de una población parecen ser, en primer lugar, las características climáticas, sobre todo en lo que concierne a la tendencia de las temperaturas. Un papel importante deriva igualmente de los aspectos topográficos como la altitud y la latitud, mientras que el tipo de sustrato parece tener una importancia menor (MONTELEONE & *al.*, 2005A).

No se debe infravalorar el posible efecto de la modificación del patrón de variación espacial de la variación genética de los taxones; esto es, la modificación del *pool* genético de las poblaciones naturales, resultado de una larga evolución y por lo tanto seguramente bien adaptado a las condiciones locales. En la actualidad, el escaso control existente sobre el origen de las plantas que se emplean en las restauraciones parece preocupante. La aplicación de la certificación sobre el origen de las semillas arbóreas y arbustivas está prevista en la normativa sólo para las especies más empleadas, mientras que en el resto de casos se suele utilizar material de origen desconocido. Aunque evidente, es importante recalcar que resulta ineludible el empleo de germoplasma de la población local, cuando se llevan a cabo actividades de refuerzo de poblaciones en áreas destinadas a la conservación *in situ*.

Es conveniente poner especial cuidado en el mantenimiento de la variación genética de los lotes de semillas durante todas las fases posteriores a la recolección, evitando en lo posible selecciones direccionales del material, voluntarias o no, como puede ser la selección por tamaño de semillas o para una velocidad de germinación determinada, etc. Las semillas de la mayoría de las especies de árboles y arbustos autóctonos del área mediterránea son, salvo importantes excepciones entre las que destacan las fagáceas, las salicáceas, el avellano, el nogal, los olmos y algunos arces, ortodoxas y pueden ser conservadas fácilmente durante largos periodos de tiempo sin deterioro de las mismas. No se puede decir lo mismo de la germinación, ya que las semillas de muchas especies están adaptadas al incendio o forman parte de la dieta de frugí-

voros, procesos naturales que promueven la germinación y que son difíciles de reproducir en laboratorio o vivero.

En el material digital complementario a este volumen se ofrece información resumida sobre aspectos relevantes para la producción, el acondicionamiento, la conservación y la producción de plantas a partir de semillas de un gran número de especies arbóreas y arbustivas autóctonas del área mediterránea. Dentro de la información aportada se señala la época en la que los frutos están maduros para su recolección y algunas indicaciones que pueden ser relevantes en dicha fase. Asimismo, se recomienda el proceso a seguir para la extracción de las semillas de los frutos y la eliminación de determinadas estructuras, algunas de ellas consideradas como impurezas según las normas ISTA (GORDON & *al.*, 1991). Se señala además el tipo de semilla de acuerdo con su tolerancia a la desecación, dato que permite elegir las condiciones de conservación más adecuadas para cada caso. En relación con la producción de plantas en vivero, se ofrece información sobre el periodo más propicio para la germinación y el tratamiento requerido para romper dormiciones u homogeneizar la emergencia, si cabe. La descripción detallada de los posibles tratamientos, como estratificaciones y escarificados, ha sido expuesta en profundidad y puede ser consultada en el capítulo 8. La información incluida procede principalmente de la edición italiana, basada en PIOTTO & DI NOI (2003), disponible en internet (ver publicaciones de manuales en www.apat.gov.it) y en datos aportados por el *Centro Nazionale per lo Studio e la Conservazione della Biodiversità Forestale*, en Peri (VR) (*Ministerio delle Politiche Agricole e Forestale, Corpo Forestale dello Stato*). Para la edición en castellano se ha empleado también información procedente de CATALÁN (1991), CERVELLI (2005), GARCÍA-FAYOS (2001), MAC CÁRTHAIGH & SPETHMANN (2000) y YOUNG & YOUNG (1992), así como también datos y protocolos empleados en el *Banco de Semillas Forestales de la Generalitat Valenciana*.

9.4.3 Propagación de germoplasma del género *Populus*

Dentro de las especies arbóreas, la conservación de los recursos genéticos de los chopos autóctonos es considerada prioritaria. Al igual que otras especies de ribera, los chopos han visto reducidas sus poblaciones de una manera particularmente dramática debido a numerosos factores; entre ellos cabe destacar la alteración del régimen natural de los caudales y la ocupación de su hábitat para diferentes usos. En particular, se han dedicado grandes esfuerzos a la conservación de *Populus nigra* L., tanto por su carácter autóctono y la acusada reducción de sus poblaciones, como también por su estrecha relación con los programas de selección y mejora de híbridos comerciales. De hecho, el programa europeo de conservación de recursos genéticos forestales EUFORGEN (*European Forest Genetic Resources Programme*) ha considerado prioritario coordinar diferentes iniciativas existentes en la conservación *ex situ* de los recursos genéticos de esta especie, como bancos clonales, huertos semillero y otro tipo de colecciones (figura 9.6). En este sentido, se ha establecido una colección de base que incluye genotipos de diferentes puntos del área de distribución de la especie y una base de datos que gestiona la información referente a un gran número de individuos conservados en los países participantes (VIETTO & BIANCO, 2005). Además, y gracias a la experiencia acumulada en torno a *Populus nigra* L., se han podido establecer unos principios básicos a considerar para su conservación en su hábitat natural (LÉFÈVRE & *al.*, 2001). Algunos países como Italia (VIETTO & *al.*, CHIARA-



foto: L. Vietto

Figura 9.6: Huerto semillero de *Populus nigra* L.

BAGLIO, 2004) y Bélgica (VANDEN BROECK & al., 2002) han iniciado planes de conservación de tipo dinámico, con la creación de poblaciones artificiales con una elevada diversidad genética en ambientes favorables para la persistencia natural de la especie. De esta manera estas nuevas poblaciones se regenerarían normalmente a partir de semilla y los complejos génicos evolucionarían como respuesta a la presión del ambiente. Este tipo de medidas es considerada como una excelente vía para promover la supervivencia de la especie en los hábitats de ribera que le son propios.

Las actividades de conservación de *P. alba* y *P. tremula* no están tan avanzadas como en *P. nigra*. Sin embargo se considera importante abordarlas o desarrollarlas; quizás con un carácter menos intenso en la primera, centrándose en el uso adecuado de los materiales de reproducción en las restauraciones de ribera, y sí con más profundidad en el caso del chopo temblón, con actividades que promuevan su conservación *ex situ*, tanto estática como dinámica.

Las especies de *Populus* se propagan generalmente sin problemas por semillas o vegetativamente. Este género puede considerarse paradigmático en cuanto a la puesta a punto de técnicas de multiplicación, particularmente asexual, por la facilidad de su propagación por esta-

quillado de estructuras leñosas. De hecho, la posibilidad de mantener la identidad genética de los individuos mediante la propagación agámica ha sido empleada en los programas de mejora genética para la multiplicación de genotipos seleccionados de clones comerciales y ha promovido la evolución de las técnicas culturales empleadas de manera específica en populicultura.

Sin embargo, la posibilidad de recolectar material vegetativo de ejemplares de chopo vigorosos, su fácil propagación y cultivo hacen que en muchos casos no se tenga en cuenta la importancia que tiene la diversidad genética, con el mantenimiento de los mecanismos de recombinación propios de la reproducción sexual, para la conservación de los recursos genéticos a largo plazo y su gestión sostenible (BISOFFI *et al.*, 1999). Por ello, en caso de emplear material producido vegetativamente, es conveniente tomar una serie de precauciones, como son el empleo de una mezcla de genotipos en las restauraciones y la limitación del número de *ramets* que se recolectan de un *ortet* o cepa madre.

La propagación vegetativa es una herramienta muy útil en los programas de conservación *ex situ* de recursos genéticos de estas especies, ya que permite el establecimiento de bancos clonales. Este tipo de plantaciones también es interesante para el mantenimiento y producción de materiales de reproducción de poblaciones locales de las especies autóctonas, en el caso que se prevean restauraciones hidrológicas en una determinada zona. Se debe tener en cuenta que este tipo de mantenimiento *ex situ* requiere disponer de terreno adecuado y garantizar unos recursos humanos y económicos para asegurar su adecuada gestión. No obstante, uno de los inconvenientes más serios a los que están sujetas estas plantaciones es el riesgo fitosanitario.

Otra alternativa más económica es la conservación de polen y semillas, que puede ser empleada como complemento de otras técnicas de conservación, ya sea en forma de polen o en forma de semillas. El cultivo y mantenimiento *in vitro* es una vía bastante más costosa, pero que podría presentarse como la única alternativa para genotipos estériles o con dificultades para su propagación vegetativa convencional. Lógicamente, este tipo de mantenimiento reduce considerablemente los problemas fitosanitarios, además de facilitar el movimiento de material entre instituciones.

Propagación vegetativa

La actividad de propagación vegetativa de los chopos se lleva a cabo normalmente durante el periodo de reposo vegetativo, a finales de invierno (febrero-marzo). Los tallos de un año de edad se emplean para obtener estaquillas de longitud estándar (aproximadamente 20 cm) con un buen número de yemas, que se adaptan muy bien a su plantación con medios mecánicos. En el caso de que se pretenda multiplicar material de árboles adultos, también se puede recolectar material de 3 ó 4 años de edad, por ejemplo cortando las ramas más vigorosas de la parte superior de la copa; en este caso, las estacas deben tener una longitud mayor, de aproximadamente 1 m, y sobre todo deben presentar yemas latentes en la base de las ramas laterales o inmediatamente debajo del anillo que separa el crecimiento entre dos años sucesivos. Este tipo de material se planta manualmente enterrando al menos 2/3 de su longitud. En la mayor parte de las especies de chopo los *ramets* mantienen algunas de las características externas y de comportamiento del *ortet*, como el porte, el vigor y la capacidad de enraizamiento. Este hecho, en condiciones de producción adecuadas, puede ser aprovechado para la obtención de

individuos con un comportamiento muy homogéneo en cuanto a su crecimiento y desarrollo. La obtención de material procedente de ejemplares adultos puede dar lugar a una cierta variación intraclonal para algunas características morfológicas y fisiológicas, todo ello en función de la edad de la planta madre, de las condiciones climáticas y edáficas en las que se encuentra y de la parte de la copa de la que se haya extraído el material (FRISON, 1996).

Es fundamental tener en cuenta que los chopos son, en general, plantas dioicas, por lo que a la hora de recolectar material para propagación vegetativa destinado a conservación del germoplasma, éste debe provenir de pies de ambos sexos en proporciones similares (LANDIS & *al.*, 2004).

El material destinado a la propagación (ramas o varetas) y las estaquillas producidas pueden conservarse durante uno o dos meses en el frigorífico a temperaturas entre -2°C y 4°C . A veces se efectúan tratamientos químicos con ditiocarbamato como fungicida antes de su conservación. Cuando la cantidad, es reducida, el material se suele conservar en bolsas de plástico; si se conservan grandes cantidades se pueden emplear cajones, protegiendo el material con sacos de yute para evitar una desecación excesiva. En determinadas ocasiones, cuando se prevé un periodo de tiempo prolongado desde el despacho a la recepción, se recomienda sellar los extremos de los tallos con cera o cualquier otro material moldeable inerte o simplemente emplear bolsas al vacío.

La capacidad de enraizamiento de las estaquillas depende sobre todo de factores genéticos, variables entre especies y entre individuos. También son importantes otros factores como las características morfológicas y fisiológicas del material y las condiciones ambientales de enraizamiento. En particular esta capacidad suele reducirse cuando aumenta la edad del material utilizado para la propagación. Es conveniente hidratar las estaquillas antes de su plantación, sumergiéndolas en agua durante 24 a 48 horas, en función de su estado de hidratación, sobre todo cuando el material ha sufrido estrés hídrico en el periodo de crecimiento vegetativo anterior a su recolección.

Las estaquillas de *Populus nigra* suelen enraizar con mucha facilidad. Cuando el material tiene dos años de edad o más, es siempre conveniente producir estaquillas de mayor longitud (30 a 50 cm) que las de dimensión estándar. *Populus deltoides* tiene, respecto de *P. nigra*, menor capacidad de enraizamiento, con fuertes diferencias entre genotipos. En esta especie, la dificultad de propagación se acentúa en individuos que se caracterizan por tener ciclos vegetativos más bien largos, lo que implica escasa lignificación de los tejidos y predisposición a la deshidratación. Los híbridos procedentes del cruzamiento entre *P. nigra*, actuando como progenitor marculino, y *P. deltoides* como progenitor femenino (*P. x canadensis*) también muestran una excelente aptitud para el enraizamiento. Esta capacidad es heredada del progenitor masculino pues la especie que actúa como parental femenino no posee esta cualidad.

Populus alba muestra una gran variación individual en la capacidad de enraizamiento. Sin embargo, también en esta especie se pueden mejorar los resultados empleando estaquillas de 30 a 50 cm de longitud. Las posibilidades de propagación vegetativa por medio de estaquillas aéreas (obtenidas a partir de ramas o varetas) es muy reducida en los chopos temblones (*P. tremula*, *P. tremuloides* y *P. grandidentata*). En estas especies suelen emplearse estaquillas de raíz que se extraen con facilidad del sistema radical próximo a la superficie. También es habitual

foto: L. Cagelli



foto: C. Lioia



Figura 9.7: a- Injerto de aproximación.
b- Recolección de ramas con amentos próximos a la diseminación.

propagar el chopo temblón mediante sierpes, o rebrotes de raíz formados por unos centímetros de parte aérea y un segmento de sistema radical. De este modo se puede obtener material de propagación en el período estival (junio y julio); en este caso, se debe aplicar un tratamiento con hormonas de enraizamiento y mantener el material en condiciones controladas de temperatura y humedad, en sustrato estéril.

La capacidad rizogénica de otras especies de chopo es muy variable: *P. euphratica*, *P. lasiocarpa*, *P. heterophylla*. muestran grandes dificultades para enraizar, mientras que *P. trichocarpa* y *P. balsamifera*, *P. laurifolia*, *P. maximowiczii*, *P. koreana*, *P. simonii* y *P. yunnanensis* pueden propagarse fácilmente por estaquilla (FRISON, 1996).

En los casos en los que las estaquillas de chopo estén destinadas a uso en repoblaciones o restauraciones hidrológicas deberá tenerse en cuenta las normativas vigentes sobre comercialización y pasaporte fitosanitario, en cuanto a su calidad genética y calidad exterior, donde se exigen unas dimensiones mínimas y unos requerimientos específicos de edad, forma, número de yemas y, por supuesto, estado sanitario.

La técnica de injerto puede ser una alternativa válida para propagar genotipos de chopo con escasa aptitud para el estaquillado. Su uso comercial está limitado a ciertos clones de *Populus tremula*, empleándose los injertos oblicuo o de yema y plantas de un año de la misma especie o de *Populus alba* como portainjerto. También se emplea con éxito el injerto por aproximación para la producción de plantas de *Populus tremula* para realizar hibridaciones controladas en el campo de la experimentación e investigación (figura 9.7). Este último tipo de técnica se realiza en el mes de agosto, empleando ramas florales recolectadas de pies femeninos adultos (figura 9.7) e injertadas en plantas jóvenes, generalmente del clon I-214, cultivadas en maceta. Para inducir floraciones tempranas se puede usar el injerto inglés de doble hendidura.

foto: L. Cagelli



Figura 9.8: Semillas de chopo.

También se dispone del método de propagación *in vitro* para la multiplicación de clones de interés comercial (LUBRANO, 1992). Esta técnica permite conseguir una mayor rapidez de enraizamiento respecto del estaquillado convencional, además de que tiene la ventaja de poder mantener el material a largo plazo sin problemas fitosanitarios. No obstante, resulta una vía costosa, que requiere mano de obra cualificada para su manipulación, además de los posibles problemas de modificación de la identidad genética por variación somaclonal.

Las técnicas de criopreservación, aunque con resultados muy dispares hasta la fecha, parecen abrir interesantes posibilidades como vía de conservación de este grupo de especies. Con la vitrificación seguida de inmersión directa en nitrógeno líquido (-196°C) de ápices de yemas o tejidos embriogénicos se han obtenido altos porcentajes de supervivencia en *P. alba* (82%), algo más bajos en *P. x canescens* (54%) y muy bajos en *P. nigra* (22%) (LAMBARDI, 2002).

Propagación sexual

La disponibilidad de una elevada diversidad genética es una condición esencial para una buena gestión de los recursos genéticos y para el avance en los ciclos de selección y cruzamiento en programas de mejora genética. Por ello, es necesario conocer los aspectos relacionados con la manipulación y conservación de semillas y polen que pueden ser empleados con diferentes objetivos, como la producción de plantas para la creación o el refuerzo de poblaciones con material con una amplia base genética o las hibridaciones artificiales entre parentales de particular interés en programas de selección y mejora.

Se han efectuado numerosas investigaciones entorno a los protocolos de validación de la viabilidad y facultad germinativa de polen y semillas, en la determinación de aquellos factores que pueden incidir de manera negativa en la germinación y sobre los métodos más adecuados para su conservación a largo plazo.

Recolección de semillas y conservación

La floración de los chopos tiene lugar entre febrero y marzo, según regiones. En ambiente controlado, como puede ser un invernadero, la floración puede adelantarse y la rapidez de aparición de los amentos aumenta si el material se ha recolectado hacia el final del periodo invernal, sobre todo si las ramas florales, una vez recogidas, han estado sometidas a un periodo de vernalización a 4°C durante un mes. Los mejores individuos productores de semillas son los pies

foto C. Lioia



a

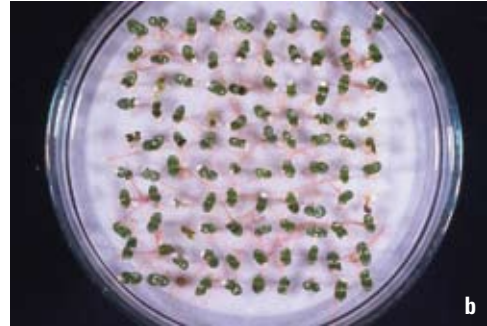


foto: L. Cagelli

b

Figura 9.9: a- Separación de semillas de *Populus nigra* de los penachos de pelos.
b- Ensayo de germinación de semillas de *Populus nigra*.

adultos que crecen de manera aislada. El chopo tiene capacidad de florecer y producir semillas a partir de los 5-10 años de edad e incluso antes, como respuesta a condiciones de estrés.

Las semillas de chopo son muy pequeñas (figura 9.8); en un gramo se pueden contar unas 1.000 semillas. El peso de las semillas es variable entre especies y entre lotes; por ejemplo, en el caso de *Populus deltoides* el número de semillas por gramo es de 442 a 3.300; para *Populus nigra* las cifras oscilan entre 1.000 – 1.100 semillas por gramo; en *Populus alba* entre 1.600 – 1.800; mientras que en *P. tremula* las cifras se elevan hasta unas 5.900 – 19.700 semillas por gramo (PIOTTO, 1992; PIOTTO & DI NOI, 2001).

La recolección de las semillas debe efectuarse lo más cerca posible del momento de la dispersión natural, en la fase de apertura de las cápsulas. En caso de recolectarse con más anticipación se corre el riesgo de obtener semillas con muy baja viabilidad. En cualquier caso, el periodo comprendido entre la recolección y el inicio de la fase de conservación debe ser lo más breve posible. Con el fin de evitar el deterioro del material, los frutos deben disponerse en capas muy finas para su secado a temperatura ambiente durante 1 – 2 días y extraer las semillas en el lapso de una semana como máximo. La separación de las semillas de los penachos de pelos en *P. nigra* y *P. deltoides* puede llevarse a cabo con buenos resultados empleando una pistola de aire comprimido y una serie de cedazos con malla de 1,6 mm (figura 9.9).

La facultad germinativa es normalmente elevada (80-90%), pero puede reducirse sensiblemente en solo 3-4 semanas, sobre todo si las semillas se han dejado expuestas al aire algunos días después de la dehiscencia de las cápsulas. Las semillas de chopo germinan rápidamente; en condiciones favorables y si la semilla es fresca, la germinación puede producirse en solo 6-12 horas. Un ensayo de germinación rápido, propuesto por SIMAK (1980), consiste en disponer semillas, 100 por réplica y tres réplicas, en placas Petri, empleando para ello papel de filtro embebido en agua desionizada (figura 9.9); la valoración de la germinabilidad se efectúa a los 7-10 días. Para determinar con mayor precisión los resultados del ensayo de germinación, conviene

llevar a cabo una prueba colorimétrica con el fin de evaluar la viabilidad efectiva del lote de semillas. Se ha observado una amplia variación entre especies y genotipos en la producción de plántulas anormales, siendo en algunos casos relativamente frecuente.

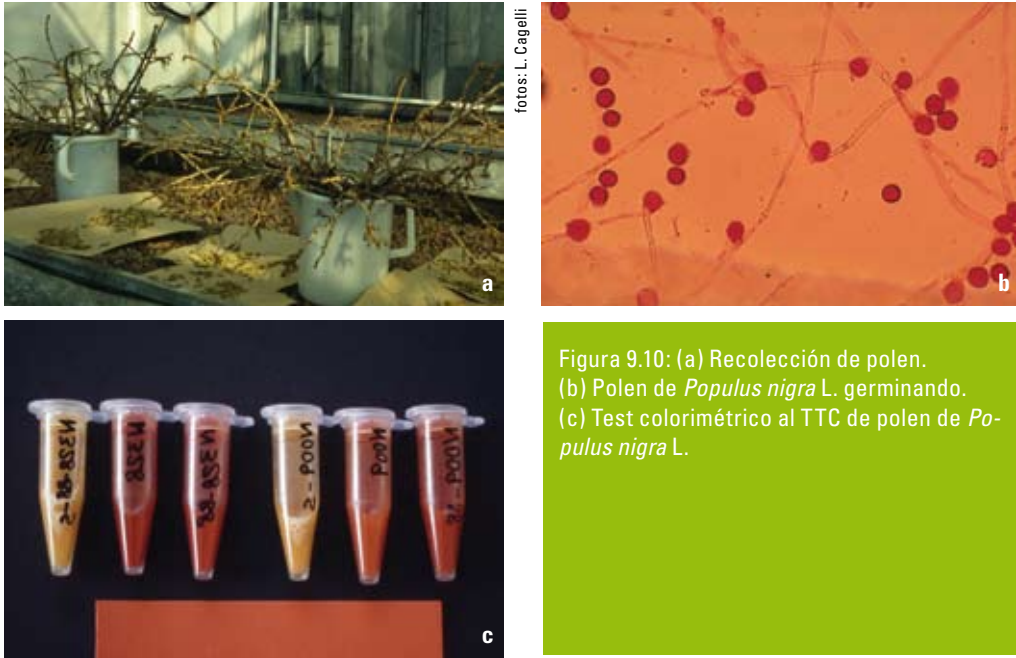
Para la producción de plántulas por siembra directa se suele emplear contenedores alveolados de 20 cm³ de capacidad con sustrato turboso, que se mantienen en invernaderos a una temperatura controlada de 18-20 °C. En estas condiciones la emergencia de las plántulas tiene lugar aproximadamente en una semana.

Los factores que influyen en la germinación de las semillas de los chopos son numerosos; entre ellos y como ya se mencionó, es fundamental la época de recolección y el tiempo transcurrido durante la extracción y el acondicionamiento de las semillas, así como su contenido de humedad y la temperatura de conservación. La deshidratación es un factor muy importante para la buena conservación; la semilla puede ser conservada con éxito durante varios años a baja temperatura, pero solo si el contenido de humedad se ha reducido a un 5-8%. El nivel de hidratación puede ser determinado rápidamente usando termobalanzas y muestras de unos 200 mg de semilla. La reducción del contenido de humedad para una buena conservación debe efectuarse gradualmente; un método válido para alcanzar los niveles óptimos consiste en dejar las semillas bajo corriente de aire por un periodo de 2 a 5 días a 20°C ó, aún mejor, secar el material en estufa a una temperatura de 35°C durante 10 a 30 minutos, en función del contenido de humedad inicial. Es bastante frecuente que las semillas de *P. nigra* se deshidraten de manera natural durante el periodo de su manipulación, por lo que en este caso no es necesario su tratamiento.

La temperatura de conservación es también un factor a tener muy en cuenta; por ejemplo, a 4°C no es posible conservar la viabilidad de las semillas, ni aún durante periodos inferiores a un año. En el caso de lotes de semillas de *P. nigra*, *P. deltoides* y *P. x canadensis*, los mejores resultados se han obtenido a temperaturas comprendidas entre -18°C y -40°C (CAGELLI, 1997). Hasta el momento no se han observado diferencias significativas en la calidad de conservación de lotes de semillas a temperaturas comprendidas en dicho rango, por lo que la conservación a -18°C, en un congelador normal, puede considerarse como adecuada para una estrategia a largo plazo. En estas condiciones, lotes de semilla de las especies mencionadas han mantenido una aceptable facultad germinativa (40-50%) por un periodo de 10 años. Cuando se vaya a utilizar el material conservado, éste debe ser sometido a un aumento de temperatura gradual hasta alcanzar la temperatura ambiente; lo mismo debe hacerse con la rehidratación, ya que una imbibición muy rápida puede causar daños irreversibles en las semillas.

Recolección y conservación de polen

Como en el caso de las semillas, la viabilidad del polen está condicionada por diversos factores, como son el momento y método de recogida, el periodo transcurrido desde esta operación hasta el momento de su conservación, el contenido de humedad y la temperatura de conservación. Sin embargo, mientras que la calidad de las semillas puede ser de fácil verificación en el laboratorio, los ensayos de viabilidad del polen presentan cierta dificultad. Todavía no se dispone de suficiente información sobre la correlación entre la viabilidad del polen y su capacidad de fecundar. Este último parámetro se estima de manera indirecta mediante la cantidad



fotos: L. Cagelli

Figura 9.10: (a) Recolección de polen.
 (b) Polen de *Populus nigra* L. germinando.
 (c) Test colorimétrico al TTC de polen de *Populus nigra* L.

de semilla producida tras la fecundación de flores femeninas. Según resultados preliminares parecería que, aún empleando lotes de polen con baja viabilidad es posible obtener en general una buena cantidad de semillas.

Las ramas florales masculinas pueden recolectarse a lo largo de todo el periodo invernal y ser conservadas en recipientes con agua (figura 9.10), manteniéndolas en ambiente controlado a temperaturas próximas a 20°C y una humedad relativa del 70%. No obstante, la mayor cantidad de polen se obtiene de ramas recolectadas en estadios próximos al momento de brotación de la planta en condiciones naturales. La recolección del polen se puede efectuar de dos maneras, o bien directamente de las anteras en el momento de la dehiscencia natural o a partir de amentos recolectados al final de su desarrollo, secados de manera artificial durante 24 horas a una temperatura de aproximadamente 25°C y 40% de humedad relativa.

La germinabilidad del polen es alta inmediatamente después de la recogida, pero puede descender rápidamente hasta perderse totalmente si se conserva durante una semana a 4°C en gel de sílice. Uno de los métodos más utilizados para estimar la facultad germinativa *in vitro* es el propuesto por BREWBACKER & KWACK (1963). Este método consiste en cultivar los granos de polen sobre un sustrato agarizado (KNO_3 0,1 g/l; CaNO_3 0,3 g/l; H_3BO_3 0,1 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l; sacarosa 100 g/l para *P. deltoides*, 200 g/l para *P. nigra*). La germinación se valora a las 12 y 24 horas después de la inoculación, midiendo la longitud del tubo polínico (figura 9.10). Otro método rápido es el que emplea tetrazolio, en el que la viabilidad del polen se establece de acuerdo con la intensidad de la coloración obtenida (figura 9.10). La muestra que reacciona

positivamente adquiere una coloración que va desde el rosa claro al rojo intenso, iniciándose el viraje a la coloración rojiza a los treinta minutos de iniciado el ensayo y adquiriendo su máxima intensidad a los 60 minutos (RAJORA & ZUFFA, 1986).

El contenido de humedad de los granos de polen varía sensiblemente entre especies y genotipos de la misma especie, en un rango entre el 10% y el 80%. En la conservación de polen el contenido hídrico también se muestra como el factor fundamental. Antes de poner el material en condiciones de conservación es necesario reducir su contenido de humedad por debajo del 10%. Como método generalizado para contenidos de humedad inicial variables, el polen se suele deshidratar manteniéndolo 12 horas a 4°C en deshumidificador con gel de sílice. En el caso de *P. nigra* y *P. deltoides* un tiempo de 2 horas es suficiente para reducir el contenido de humedad a valores del 7-10%. Como en las semillas, también se puede estimar el contenido de humedad del polen en termobalanza para determinación de contenido de humedad, empleando una muestra de 120 mg.

Una vez deshidratado, el polen puede ser conservado entre -18°C y -40°C durante un periodo de al menos un año. Por el momento no existen trabajos específicos sobre protocolos de acondicionamiento para la conservación de polen durante periodos de tiempo más prolongados. No obstante, en cruzamientos controlados efectuados con polen conservado durante 5 años a -40°C se han obtenido buenos resultados en cuanto al número y la calidad de las semillas obtenidas. Una precaución importante a tener en cuenta es la gradual y progresiva rehidratación del material conservado antes de su empleo. Si el periodo de conservación ha sido breve, es suficiente mantenerlo durante un periodo de 1-2 horas en un ambiente con una humedad relativa alta (60-70%) y una temperatura de aproximadamente 20°C, mientras que si el polen se ha conservado durante más tiempo se debe someter a una temperatura de 4°C durante una hora y posteriormente a 20°C durante dos horas (STANTON & VILLAR, 1996).

Cultivo *ex situ* de plantas amenazadas en los Jardines Botánicos Españoles: El proyecto PHOENIX-2014 de la AIMJB

Introducción

Gran parte de los Bancos de Germoplasma conservan semillas de plantas silvestres amenazadas que en principio podrían ser utilizadas en futuros proyectos de recuperación, etc. Para ello es imprescindible conocer las condiciones de germinación de cada taxón conservado, y de hecho es una de las prioridades actuales en las líneas de trabajo de los Bancos de Germoplasma. Pero una vez que hemos logrado hacer germinar nuestras semillas ¿sabemos acaso dar el segundo paso y somos capaces de cultivar *ex situ* las plantas? Casi nunca sabemos hacerlo, o dicho de otro modo, son muy pocas las plantas silvestres de nuestra flora con las que hemos experimentado. Pero, incluso si somos capaces de cultivar esas plantas *ex situ*, en jardines botánicos, arboretos, o parcelas de viverismo asociadas a las instituciones que albergan los Bancos de Germoplasma ¿somos capaces de hacerlo *in situ* en el campo, en el hábitat natural de la especie amenazada y sin las condiciones de cultivo óptimas y reguladas que tenemos en nuestras instalaciones? Pocas veces lo hemos intentado y es muy probable que nos encontremos con dificultades importantes. En España, salvo notables excepciones (Red Andaluza de Jardines Botánicos, Jardín Botánico Viera y Clavijo, Parque Nacional del Teide, y Jardín Botánico de Soler principalmente) existe muy poca experiencia de cultivo con plantas amenazadas, y esta laguna es la que quiere cubrir el Proyecto *Phoenix 2014*.

El problema

El número de taxones amenazados en el territorio español es muy elevado, teniendo en cuenta la gran diversidad florística que el país alberga (1.414 especies según la Lista Roja de la Flora Vascular Española del año 2000 -pendiente de ser publicada la actualización- de un total estimado de plantas vasculares entre 7.300 a 8.300 especies). En el Atlas y Libro Rojo de la Flora Amenazada de España (2004) se recogen 478 taxones considerados *a priori* los más amenazados del país. En esta misma obra se analizan las principales medidas de conservación existente y propuestas en esos documentos, así como medidas de conservación *ex situ*. Se propone que al menos 1281 taxones estén conservados en bancos de germoplasma, teniendo noticia sin embargo de que sólo lo están hasta el momento 419, y se propone también que se trabaje en el cultivo y propagación de 628 especies, teniendo noticia de que sólo se ha hecho para 278. Si tomamos estos datos como referencia, el Libro Rojo Nacional estima que es necesaria al menos la puesta en cultivo *ex situ* de 350 taxones de nuestra flora más amenazada. Estas cifras dan una idea de la magnitud del trabajo que resta por hacer y muestran la necesidad de poner en marcha proyectos coordinados entre instituciones que puedan abordar los trabajos

Esta iniciativa pretende que los JB's Españoles se vuelquen aún más con la Estrategia Mundial para la Conservación de las Plantas (GSPC) en el marco del Convenio de Diversidad Bio-

lógica (CBD) y la iniciativa *Cuenta Atrás 2010*. A pesar de los esfuerzos realizados en Europa en los últimos años, recientemente se ha publicado la nueva *Estrategia Europea para la Conservación de las Plantas 2008-2014*, elaborada por Planta Europa y el Consejo de Europa, y en ella se llama la atención sobre la necesidad de abordar casos de estudio para la reintroducción de plantas amenazadas, y la necesidad de redoblar los esfuerzos para lograr el cultivo *ex situ* de al menos el 60 % de la plantas amenazadas europeas, horizonte del que estamos aún muy alejados, y que previsiblemente no lograremos en el 2010. Con el proyecto Phoenix 2014, los JB de la AIMJB, quieren contribuir a remediar en parte estas lagunas ya detectadas.

Promotor

El proyecto *Phoenix 2014* es una iniciativa de la Asociación Ibero-Macaronésica de Jardines Botánicos (AIMJB). Se contempla su desarrollo en el seno de los Jardines Botánicos Españoles integrados en la AIMJB. El proyecto pretende asentar las bases para cultivar y exhibir en los Jardines Botánicos una representación de las plantas españolas más amenazadas. Estas bases deberán ser el punto de partida para futuros estudios que lleguen a incorporar todas las especies amenazadas de España. De esta forma se contribuirá a que el Gobierno español cumpla una parte de los compromisos adquiridos por las iniciativas nacionales e internacionales en el campo de la conservación vegetal.

Objetivos principales

El proyecto *Phoenix 2014* persigue tres objetivos principales:

- 1- Desarrollar los protocolos de germinación y cultivo de las especies más amenazadas de la flora española en los viveros de los Jardines Botánicos de la AIMJB.
- 2- Conocer el momento del desarrollo de la planta más adecuado para introducir con éxito las especies en su hábitat natural.
- 3- Exponer una muestra de las especies seleccionadas en las colecciones de cada Jardín Botánico y desarrollar un plan de divulgación para dar a conocer a la sociedad nuestras plantas amenazadas y contribuir a crear una concienciación social sobre el problema creciente de pérdida de biodiversidad.

Desarrollo

El proyecto propone establecer un Programa Nacional de cultivo *ex situ* de especies amenazadas, utilizando las instalaciones y los equipos humanos de los diferentes JB españoles de la AIMJB. Ya se han dado primeros pasos, y tras varias reuniones de trabajo realizadas al amparo del *Grupo de trabajo de conservación de planta viva* en el seno de la AIMJB, son ya más de 15 los JB comprometidos, habiéndose planteado en una primera fase el compromiso de cultivar



Instalaciones para el cultivo *ex situ* de plantas amenazadas en el Jardín Botánico Atlántico.

y exponer un mínimo de 5 especies en cada uno de los JB's participantes, con lo cual se conseguirá al final del proyecto la representación y conocimiento del cultivo de otras 75 especies amenazadas más de España.

La selección de las especies se ha realizado utilizando para ello principalmente la información de la última versión disponible de la Lista Roja de plantas vasculares amenazadas de España y del Atlas y Libro Rojo de España. Siempre que sea posible las semillas para iniciar los ensayos de germinación y cultivo proceden de los fondos de la REDBAG (ver capítulo III.1).

Previo acuerdo con las CCAA, esta selección incluye en ocasiones taxones protegidos (amenazados o no) a nivel regional que se ha considerado oportunos, principalmente aquellos sobre los cuales se esté realizando o preparando un plan de conservación. Con ello, el proyecto pondrá a disposición de las administraciones competentes las facilidades de gestión y el material necesario para llevar a cabo el compromiso de ejecutar los planes de recuperación de un mínimo del 10% de las especies amenazadas antes del 2010.

En la planificación del Proyecto, los distintos técnicos de los JB's se están reuniendo para trabajar de manera consensuada y coordinada y abordan las diversas fases de cultivo de los taxones, utilizando experimentos similares y homologados. Se está trabajando en los siguientes protocolos:

- 1.- Obtención del material para el cultivo (ya sea vía Bancos de Germoplasma o recolecciones de poblaciones naturales).
- 2.- Diseño y ejecución de la experimentación de propagación en los viveros.
- 3.- Ensayos de trasplantes en las distintas fases del desarrollo de las plantas para obtener información sobre el mejor momento del trasplante al medio natural.
- 4.- Introducción de las colecciones en los espacios de exposición.
- 5.- Elaboración de un manual de protocolos de cultivo de especies amenazadas
- 6.- Activación de la campaña de divulgación.

Programa de divulgación y concienciación social

Se está trabajando también en la creación de un programa de divulgación y concienciación social en torno a conservación de la biodiversidad vegetal. Supone el conjunto de actividades de carácter educativo y de difusión del Proyecto *Phoenix-2014*, de contenido común y normalizado, y adaptadas a su desarrollo en cada uno de los JB's vinculados al proyecto.

El programa contemplará tres aspectos:

- 1.- Concienciación sobre la problemática de la pérdida de biodiversidad.
- 2.- Información del proyecto en los JB's.
- 3.- Implicación y participación ciudadana en la conservación de la biodiversidad a través del proyecto.

Referencias bibliográficas

- AFFRE L. & THOMPSON J.D., 1999. Variation in self-fertility, inbreeding depression and levels of inbreeding in four *Cyclamen* species. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 113-122.
- AFFRE L., THOMPSON J.D. & DEBUSSCHE M., 1995. The reproductive biology of the Mediterranean endemic *Cyclamen balearicum* Willk Primulaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 118: 309-330.
- AGRAWAL D.C., PAWAR S.S. & MASCARENHAS A.F., 1993. Cryopreservation of spores of *Cyathea spinulosa* Wall. ex. Hook. f. An endangered tree fern. *Journal of Plant Physiology* 142: 124-126.
- AKÇAKAYA R., FERSON S., BURGMAN M.A., KEITH D.A., MACE G.M. & TODD C.R., 2000. Making Consistent IUCN Classifications under Uncertainty. *Conservation Biology* 144: 1001-1013.
- ALBERT, M. J., IRIONDO, J. M. & PÉREZ-GARCÍA, F., 2002: Effects of temperature and pretreatments on seed germination of nine semiarid species from NE Spain. *Israel Journal of Plant Science* 50: 103-112.
- ALLENDORF F.W. & LUIKART G., 2007. *Conservation and the genetics of populations*. Blackwell Publishing. 642 PP.
- ARAGÓN C.F. & PANGUA E., 2004. Spore viability under different storage conditions in four rupicolous *Asplenium* L. taxa. *American Fern Journal* 941: 28-38.
- ARONNE G. & WILCOCK C.C., 1994. First evidence of myrmecochory in fleshy fruited shrubs of the Mediterranean region. *New Phytologist* 127: 781-788.
- ARROYO M.T. & DE KALIN M.T., 1975. Electrophoretic studies of genetic variation in natural populations of allogamous *Limnanthes alba* and autogamous *Limnanthes floccosa* Limnanthaceae. *Heredity* 35: 153-164.
- ATICI Ö. & NALBANTOGLU B., 2003. Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry* 64: 1187-1196.
- ATKINS KEN., 2005. *Declared rare and priority flora list for Western Australia* (V. 22 February 2005). Dept of Conservation and Land Management. Como, W.A. (En línea). <http://florabase.calm.wa.gov.au/conservationtaxa>
- AVERY M., GIBBONS D.W., PORTER R., TUCKER T. & WILLIAMS G., 1994. Revising the British Red Data List for birds: the biological basis of U.K. conservation priorities. *Ibis* 137 (supplement): 232-239.
- BACCHETTA G., 2009 – Conservare la natura. In: TAFFETANI F. (eds.), 2009 – Manuale sugli erbari. Edagricole, Bologna, in press.
- BACCHETTA G., FENU G., MATTANA E., PIOTTO B. & VIREVAIRE M. (EDS.), 2006A. *Manuale per la raccolta, studio, conservazione e gestione ex situ del germoplasma*. Manuali e Linee guida APAT 37: 1-244.
- BACCHETTA G., FENU G., IIRITI G., MATTANA E., MELONI F., MULÉ P. & PODDA L., 2006B. Territory defence throughout conservation of the plant diversity: the project of the Protected Sea Area of Capo Carbonara (South eastern Sardinia), *Atti First International Symposium on Environment Identities and Mediterranean Area* - ISEIM 2006, Corte-Ajaccio (France): 302-307.
- BACCHETTA G., GRILLO O., MATTANA E. & VENORA G., 2008. Morpho-colorimetric characterization by image analysis to identify diaspores of wild plant species. *Flora* 203(8): 669-682.
- BADESCU V., 1997. Verification of some very simple clear and cloudy sky models to evaluate global solar irradiance. *Solar Energy* 61(4): 251-264.
- BAEK H.J., BEHARAV A. & NEVO E., 2003. Ecological-genomic diversity of microsatellites in wild barley, *Hordeum spontaneum*, populations in Jordan. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 397-410.
- BAKER H.G., 1955. Self-compatibility and establishment after "long-distance" dispersal. *Evolution* 9: 347-348.
- BALLESTER-HERNÁNDEZ S., ROSSELLÓ-GRAELL A., DRAPER D. & CORREIA A.I.D., 2000. Monitorização de plantas prioritárias na área da albufeira do Alqueva. Linhas metodológicas. *Portugaliae Acta Biologica* 19: 201-218.

- BALLESTEROS D., IBARS A.M., ESTRELLES E., 2002. Soil spore bank of *Phyllitis sagittata* (DC.) Guinea & Heywood. *Fern Gazette* 16(6): 424.
- BALLESTEROS D., ESTRELLES E. & IBARS A.M., 2006. Responses of Pteridophyte spores to ultrafreezing temperatures for long-term conservation in Germplasm Banks. *Fern Gazette* 175: 293-302.
- BALLESTEROS D. & WALTERS C., 2007A. Water properties in fern spores: sorption characteristics relating to water affinity, glassy states and storage stability. *Journal of Experimental Botany* 58: 1185-1196.
- BALLESTEROS D. & WALTERS C., 2007B. Calorimetric properties of water and triacylglycerols in fern spores relating to storage at cryogenic temperatures. *Cryobiology* 55: 1-9.
- BARNABAS B. & RAJKI E., 1981. Fertility of deep-frozen maize (*Zea mays* L.) pollen. *Annals of Botany* 48: 861-864.
- BARRETT S.C.H. & ECKERT C.G., 1990. Variation and evolution of mating systems in seed plants. In: KAWANO S. (ED). *Biological approaches and evolutionary trends in plants*. London, Academic Press. pp. 229-254.
- BARRETT S.C.H., 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in Plant Sciences* 9: 335-341.
- BARROS M.A., FALEIRO F.G., KARIA C.K., SHIRATSUCHI L.S., ANDRADE R.P. & LOPES G.K.B., 2005. Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 409: 899-909.
- BARTHOLOTT W., RAUER G., IBISCH P.L., VON DEN DRIESCH M. & LOBIN W., 2000. Biodiversity and Botanic Gardens. In: *Botanic Gardens and Biodiversity*. Bundesamt für Naturschutz, Bonn. Landwirtschaftsverlag, Münster, 1-24.
- BASKIN C.C. & BASKIN J.M., 1998. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- BASKIN C.C. & BASKIN J.M., 2003A. When breaking dormancy is a problem. Try a move-along experiment. *Native Plants Journal* 4(1): 17-21.
- BASKIN J.M. & BASKIN C.C. 2003B. Classification, biogeography, and phylogenetic relationships of seed dormancy. In: SMITH R.D., DICKIE J.B., LININGTON S.L., PRITCHARD H.W. & PROBERT R.J. (EDS), 2004. *Seed conservation: turning science into practice*. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 518-544.
- BASKIN J.M. & BASKIN C.C., 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1-16.
- BASKIN C.C., THOMPSON K. & BASKIN J.M., 2006. Mistakes in germination ecology and how to avoid them. *Seed Science Research* 16: 165-168.
- BATISTA F., BAÑARES A., CAUJAPÉ-CASTELLS J., MARRERO-GÓMEZ M., CARQUÉ E. & SOSA P.A., 2001. Allozyme diversity in three endemic species of *Cistus* Cistaceae from the Canary islands: Intraspecific and interspecific comparisons and implications for genetic conservation. *American Journal of Botany* 88: 1582-1592.
- BEARDMORE T. & VONG W., 1998. Role of the cotyledonary tissue in improving low and ultralow temperature tolerance of butternut *Juglans cinerea* embryonic axes. *Canadian Journal of Forest Research* 28: 903-910.
- BEARDMORE T. & WHITTLE C.-A., 2005. Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple *Acer saccharinum* embryonic axes. *Tree Physiology* 25: 965-972.
- BEATTIE A.J. & LYONS N., 1975. Seed dispersal in *Viola* (Violaceae): adaptations and strategies. *American Journal of Botany* 62: 714-722.
- BEDINI G., ROSSI G. & BONOMI C., 2005. RIBES, la Rete Italiana di Banche del germoplasma per la conservazione *Ex Situ* della flora spontanea. *Informatore Botanico Italiano* 37(1 parte a): 114-115.
- BENGTSSON B.O., WEIBULL P. & GHATNEKAR L., 1995. The loss of alleles by sampling: a study of the common outbreeding grass *Festuca ovina* over three geographical scales. *Hereditas* 122: 221-238.
- BENNETT E., 1970. Tactics of plant exploration. In: FRANKEL O.H. & BENNETT E. (EDS). *Genetic resources in plants: Their exploration and conservation*. F.A. Davis Company, Philadelphia. pp. 157-179.
- BENNETT S.J. & BULLITTA S., 2003. Ecogeographical analysis of the distribution of six *Trifolium* species in Sardinia. *Biodiversity and Conservation* 12: 1455-1466.
- BENSON E.E., 1999. Cryopreservation. In: BENSON E.E. (ED). *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor & Francis, Ltd.

- BENSON E.E., KRISHNAPILLAY B. & MARZALINA M., 1996. The potential of biotechnology in the in vitro conservation of Malaysian forest germplasm: an integrated approach. In: NORHARA H., BACON P.S. & KHOO K.C. (EDS). *Proceedings of the 3rd conference on Forestry and Forest Products Research*, FRIM 1: 76-90.
- BERGER J., ABBO S. & TURNER N.C., 2003. Ecogeography of annual wild *Cicer* species: the poor state of the world collection. *Crop Science* 43: 1076-1090.
- BERI A. & BIR S.S., 1993. Germination of stored spores of *Pteris vittata* L. *American Fern Journal* 833: 73-78.
- BERJAK P. & PAMMENTER N.W., 2002. Orthodox and recalcitrant seeds. In: VOZZO (ED). *Tropical tree seed manual*. USDA Forest Service. Agriculture Handbook.
- BERJAK P., WALKER M., MYCOCK D.J., WESLEY-SMITH J., WATT M.P. & PAMMENTER N.W., 2000. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: ENGELMANN F. & TAKAGI H. (EDS). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. IPGRI, Rome.
- BERJAK P. & PAMMENTER N.W., 1994. Recalcitrance is not an all-or-nothing situation. *Seed Science Research* 4: 263-264.
- BERNARDELLO G., ANDERSON G.L., LÓPEZ P., CLELAND M.A., STUESSY T.F. & CRAWFORD D.J., 1999. Reproductive biology of *Lactoris fernandeziana* Lactoridaceae. *American Journal of Botany* 86: 829-840.
- BERNARDELLO G., AGUILAR R. & ANDERSON G.J., 2004. The reproductive biology of *Sophora fernandeziana* Leguminosae, a vulnerable endemic species from Isla Robinson Crusoe. *American Journal of Botany* 91: 198-206.
- BESNIER F., 1989. *Semillas. Biología y Tecnología*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid. 637 pp.
- BEWLEY J.D. & BLACK M., 1982. *Physiology and chemistry of seeds* (II Ed.). Springer Verlag, Berlin. 375 pp.
- BIANCHINI M. & PACINI E., 1996. The caruncle of *Ricinus communis* L. (castor bean): its development and role in seed dehydration, rehydration and germination. *International Journal of Plant Science* 40: 40-48.
- BISOFFI S., CAGELLI L. & VIETTO L., 1999. Risorse genetiche di pioppo per la conservazione e il miglioramento genetico. *Workshop S.I.S.E.F. Analisi e conservazione delle risorse genetiche forestali italiane*. Roma, 14 Dicembre 1998.
- BLACK M. & PRITCHARD H.W. (EDS), 2002. *Dessication and survival in plants, drying without dying*. CABI Publishing, Oxon, UK.
- BLAKESLEY D., PASK N., HENSHAW G.G. & FAY M.F., 1996. Biotechnology and the conservation of forest genetic resources: in vitro strategies and cryopreservation. *Plant Growth Regulation* 20: 11-16.
- BLASCO S. & MATEU I., 1995. Flowering and fruiting phenology and breeding system of *Cistus albidus* L. *Acta Botanica Gallica* 142: 245-251.
- BORTWICK H.A. & HENDRICKS S.B., 1960. Photoperiodism in plants. Growth is controlled by light and the measurement of night length through reversible reaction of a pigment. *Science* 132: 1223-1228.
- BORTWICK H.A., HENDRICKS S.B., TOOLE E.H. & TOOLE V.K., 1954. Action of light on lettuce seed germination. *Botanical Gazette* 115: 205-225.
- BOSCH J., 1992. Floral biology and pollinators in three co-occurring *Cistus* species (Cistaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 109: 39-55.
- BOSCH M., 1999. *Biología de la reproducción de la tribu Delphinieae a la Mediterrània occidental*. Institut d'Estudis Catalans. Barcelona. 375 pp.
- BOSCH M., SIMON J., MOLERO J. & BLANCHÉ C., 1998. Reproductive biology, genetic variation and conservation of the rare endemic dysploid *Delphinium bolosii* Ranunculaceae. *Biological Conservation* 86: 57-66.
- BOTHMER R. VON, JACOBSEN N., BADEN C., JØRGENSEN R.B. & LINDE-LAURSEN I., 1995. *An ecogeographical study of the genus Hordeum*. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Gene pools 7. 2nd edition. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome.
- BOWLES M.L., JACOBS K.A., ZETTLER, L.W. & DELANEY T.W., 2002. Crossing effects on seed viability and experimental germination of the federal threatened *Platanthera leucophaea* Orchidaceae. *Rhodora* 104: 14-30.
- BREWBACKER J.L. & KWACK B.H., 1963. The essential role of Calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany* 50: 859-864.

- BRITTEN H.B., 1996. Meta-analyses of the association between multilocus heterozygosity and fitness. *Evolution* 50: 2158-2164.
- BROWN A.H.D. & MARSHALL D.R., 1995. A basic sampling strategy: theory and practice. In: GUARINO L., RAMANANTHA RAO V. & REID R. (EDS). *Collecting Plant Genetic Diversity. Technical guidelines*. CABI. Wallingford, Oxon, UK.
- BUENO SÁNCHEZ A. & FERNÁNDEZ PRIETO J.A., 2003..El Jardín Botánico Atlántico. *Naturalia Cantabrigiae* 2: 63-66.
- BUENO SÁNCHEZ A., JIMÉNEZ-ALFARO B. & FERNÁNDEZ PRIETO J.A., 2007. Prioridades para la flora cantábrica. Perspectivas para la Red Cantabrica de Conservación de flora. *Naturalia Cantabrigiae* 3: 7-13.
- BUITINK J., WALTERS-VERTUCCI C., HOEKSTRA F.A. & LEPRINCE O., 1996. Calorimetric properties of dehydrating pollen: analysis of a desiccation-tolerant and an intolerant species. *Plant Physiology* 111: 235-242.
- BULGARINI F., ARDUINO S. & TEOFILI C., 2003. *ERC (Ecoregional Conservation). Il processo di Conservazione Ecoregionale e la sua applicazione in Italia*. WWF Italia.
- BURGARELLA C., LORA GONZALEZ A. & FICI S., 2004. Conservation of genetic diversity in artificially regenerated holm oak (*Quercus ilex* L) populations. In: *Proceedings of the 4th European Conference on the Conservation of Wild Plants*. Valencia (Spain) 17-20 th September 2004.
- BURLEY F.W., 1988. Monitoring biological diversity for setting priorities in conservation. In: WILSON E.O. & PETER F.M. (EDS). *Biodiversity*. National Academy Press, Washington DC. pp. 227-230.
- C.N.A., 1983. *Atlas do ambiente*. Direcção Geral do Ambiente. Ministerio do Ambiente e dos Recursos Naturais, Lisboa.
- CAGELLI L., 1997. Guidelines for seed and pollen storage. In: TUROK J., LEFÉVRE F., DE VRIES S. & TOTH B. (EDS), 1997. *Populus nigra* Network. *Report of the Third Populus nigra Network meeting*. Sárvar, Hungary, 5-7 October 1996. IPGRI, Rome.
- CAMLOH M., 1999. Spore age and sterilization affects germination and early gametophyte development of *Platyterium bifurcatum*. *American Fern Journal* 89: 124-132.
- CAPELO J., 1996. Esboço da paisagem vegetal da bacia portuguesa do rio Guadiana. *Silva Lusitana* 13-64.
- CARRIÓ E.R., HERREROS G., BACCHETTA G. & GÜEMES J., 2008. Evidence of delayed selfing in *Fumana juniperina* (Cistaceae). *Internacional Journal of Plant Science* 169(6): 761-767.
- CASTAGNA R., MONTELEONE I., FERRAZZINI C., CALVO E. & BELLETTI P., 2005. Seme di farnia ad elevato valore genetico. *Sherwood* 111: 5-9.
- CATALÁN G., 1991. *Semillas de árboles y arbustos forestales*. ICONA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- CAUJAPÉ-CASTELLS J., 2006. *Brújula para botánicos desorientados en la genética de poblaciones*. EXEGEN Ediciones, Las Palmas de Gran Canaria <http://www.exegen.org/en/publications.php>.
- CAUJAPÉ-CASTELLS J., 2007. ¿Son artefactos de muestreo los elevados valores de G_{ST} estimados para muchas plantas endémicas canarias? *Resúmenes del III congreso de biología de la conservación de plantas*. Puerto de la Cruz, Tenerife. pp. 62-64.
- CAUJAPÉ-CASTELLS J. & PEDROLA-MONFORT J., 1997. Space-time patterns of genetic structure within a stand of *Androcymbium gramineum* Cav. McBride Colchicaceae. *Heredity* 79: 341-349.
- CAUJAPÉ-CASTELLS J. & PEDROLA-MONFORT J., 2004. A sampling design for the ex-situ genetic conservation of the Ibero-Moroccan endangered endemic *Androcymbium gramineum*: implications for the assessment of a conservation strategy from a survey of genetic diversity for neutral markers. *Conservation Genetics* 5: 131-144.
- CERABOLINI B., CERIANI R.M., CACCIANIGA M., DE ANDREIS R. & RAIMONDI B., 2003. Seed size, shape and persistence in soil: a test on Italian flora from Alps to Mediterranean coasts. *Seed Science and Restoration* 13: 75-85.
- CERVELLI C. (ED), 2005. *Le specie arbustive della macchia mediterranea, un patrimonio da valorizzare*. Collana Sicilia Foreste n. 26. Regione Siciliana, Agrigento. 222 pp.
- CHALMERS K., WAUGH J.R., SPRENT J.I., SIMONA A.J. & POWELL W., 1992. Detection of genetic variation bet-

- ween and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculate* using RAPD markers. *Heredity* 69: 465-472.
- CHAMBERLAIN J.R., 1998. Isozyme variation in *Calliandra calothyrsus* Leguminosae: its implications for species delimitation and conservation. *American Journal of Botany* 85: 37-47.
- CHARLESWORTH D. & CHARLESWORTH B., 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 237-268.
- CHEYNE P., 2004. Access and Benefit-Sharing Agreements: bridging the gap between scientific partnership and The Convention on Biological Diversity. In: SMITH R.D., DICKIE J.B., LININGTON S.L., PRITCHARD H.W. & PROBERT R.J. (EDS). 2004. *Seed conservation: turning science into practice*. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 3-26.
- COATES J.D. & ATKINS K.A., 2001. Priority setting and the conservation of Western Australia's diverse and highly endemic flora. *Biological Conservation* 97: 251-263.
- COLLI AUREA M.T. & PEREZ SONIA C.J.G., 1999. The effect of red light on the germination of a brazilian pteridophyte. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 422: 169-174.
- CÔME D. & CORBINEAU F., 1992. Les semences et le froid. In: COME D. *Les végétaux & le froid*. Hermann Editeur des sciences & des arts, Paris.
- CÔME D., 1970. *Les obstacles à la germination*. Masson & CIE, Paris.
- COMUNIDAD ECONÓMICA EUROPEA, 1982. *Decisión 82/72/CEE del Consejo, de 3 de diciembre de 1981, referente a la celebración del Convenio relativo a la conservación de la vida silvestre y del medio natural de Europa (Convenio de Berna)*.
- COMUNIDAD EUROPEA, 2001. *Reglamento (CE) nº 1808/2001 de la Comisión, de 30 de agosto de 2001, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 338/97 del Consejo relativo a la protección de especies de la fauna y flora silvestres mediante el control de su comercio*.
- CONSTANTINO S., SANTAMARIA L.M. & HODSON E., 2000. Storage and in vitro germination of tree fern spores. *Botanic Gardens Micropropagation News* 24: 58-60.
- CONTI F., MANZI A. & PEDROTTI F. 1992. *Libro rosso delle piante d'Italia*. Associazione italiana per il World Wildlife Fund, Roma.
- CONTI F., MANZI A. & PEDROTTI F., 1997. *Liste rosse regionali delle piante d'Italia*. Dipartimento di Botanica ed Ecologia, Università degli Studi di Camerino, Camerino.
- COOLBEAR P., GRIERSON D. & HEYDECKER W., 1980. Osmotic pre-sowing treatments and nucleic acid accumulation in tomato seeds (*Lycopersicon lycopersicum*). *Seed Science and Technology* 8: 289-303.
- COUR P. & LOUBLIER Y., 1980. Contrôle d'identité et de pureté des lots de pollens destinés à la préparation d'extraits allergénique à usage diagnostique ou thérapeutique. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 20: 197-201.
- CROSTI R., LADD P.G., DIXON K.W. & PIOTTO B., 2006. Post-fire germination: The effect of smoke on seed of selected species from the central Mediterranean basin. *Forest Ecology and Management* 221: 306-312.
- CRUDEN R.W., 1976. Intraspecific variation in pollen-ratio and nectary secretion. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 63: 277-289.
- CRUDEN R.W., 1977. Pollen-ovule ratios: conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.
- CULLEY T.M., WALLACE L.E., GENGLER-NOWAK K.M. & CRAWFORD D.J., 2002. A comparison of two methods of calculating G_{ST} , a genetic measure of population differentiation. *American Journal of Botany* 89: 460-465.
- DAFNI A., 1992. *Pollination Ecology: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford. 250 pp.
- DAFNI A. & MAUÉS M.M., 1998. A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. *Sexual Plant Reproduction* 11: 177-180.
- DAFNI A., PACINI E. & NEPI M., 2004. Pollen and stigma biology. In: DAFNI A. & KVAN P. (EDS). *Methods in Pollination Ecophysiology*. Enviroquest, Cambridge, Canada.

- DAFNI A., KEVAN P.G. & HUSBAND B.C., 2005. *Practical pollination biology*. Enviroquest Ltd., Cambridge, ON, Canada.
- DEVESA J.A. & ORTEGA A., 2004. *Especies vegetales protegidas en España: plantas vasculares*. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid. 576 pp.
- DICKIE J.B. & PRITCHARD H.W., 2002. Systematic and evolutionary aspects of desiccation tolerance in seeds. In: BLACK M. & PRITCHARD H.W. (EDS). *Desiccation and survival in plants, drying without dying*. CABI Publishing, Oxon, UK.
- DON R., 2003. *ISTA Handbook on seedling evaluation, 3rd Edition*. ISTA. Bassersdorf, Switzerland.
- DOUSSI M. A. & THANOS C. A., 2002. Ecophysiology of seed germination in Mediterranean geophytes. 1. *Muscari* spp. *Seed Science Research* 12: 193-201.
- DRAPER D., ROSSELLÓ-GRAELL A., GOMES C. & CORREIA A.I.D., 2000(A). *Segundo Relatório Parcial de Progresso. Programa de Monitorização do Património Natural Área de regolço de Alqueva + Pedrógão. PM1 Projectos e Acções de Monitorização da Vegetação/Flora. Pmo 1.1 Monitorização de Plantas Prioritárias*. Unpublished. Museu, Laboratório e Jardim Botânico da Universidade de Lisboa.
- DRAPER D., ROSSELLÓ-GRAELL A., GOMES C., BALLESTER-HERNÁNDEZ S. & CORREIA A.I.D., 2000(B). *Terceiro Relatório Parcial de Progresso. Programa de Monitorização do Património Natural Área de regolço de Alqueva + Pedrógão. PM1 Projectos e Acções de Monitorização da Vegetação/Flora. Pmo 1.1 Monitorização de Plantas Prioritárias*. Unpublished. Museu, Laboratório e Jardim Botânico da Universidade de Lisboa.
- DRAPER D., ROSSELLÓ-GRAELL A., GARCIA C., GOMES C. & SERGIO C., 2003. Application of GIS in plant conservation programmes in Portugal. *Biological Conservation* 113: 337-349.
- DRAPER D., MARQUES I. & ROSSELLÓ-GRAELL A., 2004(A). *Criação de um Banco de Sementes representativo da flora afectada pela construção da barragem do Alqueva*. Unpublished. Museu, Laboratório e Jardim Botânico da Universidade de Lisboa. 147 pp.
- DRAPER D., MARTINS-LOUÇÃO M.A. & IRIONDO J.M., 2004(B). Ecogeographical-survey based germplasm collection: Towards a national strategy of seed collecting for *ex situ* conservation in Portugal. *2^o World Botanical Gardens Congress*. Barcelona. <http://www.bcn.es/medciencias/botanicgardens2004/abstracts/>.
- DUCCI F., 2003. Criteri ed indirizzi per la raccolta del materiale forestale di propagazione. In: AA.VV. Biodiversità e vivaistica forestale. Aspetti normativi, scientifici e tecnici. *Manuali e linee guida APAT* 18: 38-48.
- DUCCI F., MALTONI A. & TANI A., 2001. La raccolta del seme di specie forestali. *Sherwood* 70: 57-62.
- DUDASH M.R., 1990. Relative fitness of selfed and outcrossed progeny in a self-compatible, protandrous species, *Sabatia angularis* L. Gentianaceae: a comparison of three environments. *Evolution* 44: 1129-1139.
- DUDASH M.R. & FENSTER C.B., 2001. The role of breeding system and inbreeding depression in the maintenance of an outcrossing mating strategy in *Silene virginica* Caryophyllaceae. *American Journal of Botany* 88: 1953-1959.
- DUNN E.H., HUSSELL D.J. & WELSH D.A., 1999. Priority-Setting Tool Applied to Canada's Lands Birds Based on Concern and Responsibility of Species. *Conservation Biology* 13(6): 1404-1415.
- DYER A.F., 1979. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In: DYER A.F. (ED). *The experimental biology of ferns*. Academic Press, London, UK.
- DYER A. F., 1994. Natural soil spore banks – can they be used to retrieve lost ferns? *Biodiversity and Conservation* 3: 160-175.
- DYER A. F., LINDSAY S., 1992. Soil spore banks of temperate ferns. *American Fern Journal* 82: 89-122.
- EATON M.A., GREGORY R.D., NOBLE D.G., ROBINSON J.A., HUGHES J., PROCTER D., BROWN F. & GIBBONS D.W., 2005. Regional IUCN Red Listing: the Process as Applied to Birds in the United Kingdom. *Conservation Biology* 19(5): 1557-1570.
- ECKERT C.G. & BARRET S.C.H., 1994. Inbreeding depression in partially self-fertilizing *Decodon verticillatus* Lythraceae: population genetic and experimental analyses. *Evolution* 48: 952-964.
- EDMONDS J.E., 1990. Herbarium survey of African *Corchorus* L. species. *Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Gene pools*. 4. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy.

- EHRMAN T. & COCKS P.S., 1990. Ecogeography of annual legumes in Syria: Distribution patterns. *Journal of Applied Ecology* 27: 578-591.
- ELIAS S., GARAY A. & SCHWEITZER L., 2006. Seed quality testing of native species. *Native Plants* (spring 2006): 15-19.
- ELLE E. & CARNEY R., 2003. Reproductive assurance varies with flower size in *Collinsia parviflora* Scrophulariaceae. *American Journal of Botany* 90: 888-896.
- ELLIS R.H., 1988. The viability equation, seed viability nomographs, and practical advice on seed storage. *Seed Science and Tecnology* 16: 29-50.
- ELLIS R.H., 1998. Longevity of seeds stored hermetically at low moisture contents. *Seed Science Research* 8(1): 9-10.
- ELLIS R.H. & ROBERTS E.H., 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany* 45: 13-30.
- ELLIS R.H. & ROBERTS E.H., 1981. An investigation into the possible effects of ripeness and repeated threshing on barley seed longevity under six different storage environments. *Annals of Botany* 48: 93-96.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D. & ROBERTS, E. H., 1985. *Handbook of Seed Technology for Genebanks. Volume II. Compendium of Specific Germination and Test Recommendations*. IBPGR, Rome.
- ELLIS R.H., HONG T.D. & ROBERTS E.H., 1988. A low moisture content limit to logarithmic relations between seed moisture content and longevity. *Annals of Botany* 61: 405-408.
- ELLIS R.H., HONG T.D., ROBERTS E.H. & TAO K-L., 1990. Low moisture content limits to relations between seed longevity and moisture. *Annals of Botany* 65: 493-504.
- ELLIS R.H. & HONG T.D., 2007. Seed longevity. moisture content relationships in hermetic and open storage. *Seed Science and Technology* 35, 423-431.
- ENGELMANN F., 1997. In vitro conservation methods. In: FORD-LLOYD B.V., NEWBERRY H.J. & CALLOW J.A. (EDS). *Biotechnology and Plant Genetic Resources. Conservation and Use*. CABI, Wallingford, UK.
- ENGELMANN F., 1999. In vitro conservation of horticultural genetic resources review of the state of the art. *Acta Horticulturae* 495: 245-250.(www.actahort.org/books/495/495_10.htm).
- ENGELMANN F., 2004. Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 40: 427-433.
- EPPELSON B.K., 1990. Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: BROWN A.H.D., CLEGG M.T., KAHLER A.L. & WEIR B.S. (EDS). *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*. Sinauer Assoc. Inc. Sunderland, Massachusetts. pp 229-253.
- ESTRELLES E., IBARS A. M., IRANZO J., MORALES F., 2001. Recuperación y reintroducción de *Marsilea quadri-foia* en los arrozales del delta del Ebro (Tarragona, España). *Botanica Complutensis* 25: 251-259.
- EVANS M.E.K., MENGES E.S. & GORDON D.R., 2003. Reproductive biology of three sympatric endangered plants endemic to Florida scrub. *Biological Conservation* 111: 235-246.
- EVENARI, M. 1980-1981. The history of germination research and the lesson it contains for today. *Israel Journal of Botany* 29: 4-21.
- FABRE J. & DEREUDDRE J., 1990. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *CryoLetters* 11: 413-426.
- FAGUNDEZ J. & IZCO J., 2003. Seed morphology of *Erica* L. Sect. *Callicodon* Benth. Taxonomic implications. *Plant Biosystems* 137(1): 111-116.
- FAHY G.M., 1988. Vitrification. In: MCGRATH J.J. & DILLER K.R. (EDS). *Low Temperature Biotechnology, Emerging Applications and Engineering Contributions*. The American Society of Mechanical Engineers, New York.
- FALK D.A., MILLAR C.I. & OLWELL M., 1996. *Restoring diversity: strategies for reintroduction of endangered plants*. Island Press, Washington DC. 400 pp.
- FALUSH D., STEPHENS J. & PRITCHARD J.K., 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.

- FAO, 1995. Collecting woody perennials. In: *Collecting Plant Genetic Diversity. Technical Guidelines*. CABI, Wallingford, UK.
- FAO, 2001. International Standards for Phytosanitary Measures Publication No. 12: *Guidelines for phytosanitary certificates*. FAO, Roma.
- FAO/IPGRI, 1994. *Genebank standards*. Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- FARNSWORTH E.J., KLIONSKY S., BRUMBACK W.E. & HAVENS K., 2006. A set of simple decision matrices for prioritizing collection of rare plant species for ex situ conservation. *Biological Conservation* 128: 1-12.
- FAY M.F., 2003. Using genetic data to help guide decisions about sampling. In: SMITH RD, DICKIE J.B., LINGINGTON S.H., PRITCHARD H.W. & PROBERT R.J. (EDS). *Seed Conservation: turning science into practice*. The Royal Botanic Gardens, Kew. The Cromwell Press Ltd, London. pp. 91-96.
- FENNER M. & THOMPSON K., 2005. *The Ecology of seeds*. Cambridge University Press. Cambridge, U.K.
- FERGUSON M.E., ROBERTSON L.D., FORD-LLOYD B.V. & NEWBURY H.J., 1998. Contrasting genetic variation amongst lentil landraces from different geographical origins. *Euphytica* 102: 265-273.
- FERGUSON M.E., JARVIS A., STALKER H.T., VALLS J.F.M., PITTMAN R.N., SIMPSON C.E., BRAMEL P., WILLIAMS D., GUARINO L., 2005. Biogeography of wild *Arachis*: Distribution and environmental characterization. *Biodiversity and Conservation* 14(7): 1777-1798.
- FLOR A., BETTENCOURT E., ARRIEGAS P.I. & DIAS S.R., 2006. European crop wild relative conservation criteria—indicators for the CWR species' list prioritization. In: FORD-LLOYD B.V., DIAS S.R. & BETTENCOURT, E. (EDS). Genetic Erosion and Pollution Assessment Methodologies. *Proceedings of PGR Forum Workshop 5*, Terceira Island, Autonomous Region of the Azores, Portugal, 8-11 September 2004. Published on behalf of the European Crop Wild Relative Diversity Assessment and Conservation Forum, by Bioersivity International, Rome, Italy.
- FORD M.V., 1992. Growing ferns from spores in sterile culture. In: IDE J.M., JERMY A.C. & PAUL A.M. (EDS). *Fern horticulture: past, present and future perspectives*. Intercept, Andover, UK. An evaluation of threatened species categorization systems used on the american continent
- FORD-LLOYD B. & JACKSON M., 1986. *Plant Genetic Resources: An Introduction to their Conservation and Use*. Edward Arnold Publishers. London.
- FRANCHI G.G., BELLANI L., NEPI M. & PACINI E., 1996. Types of carbohydrate reserves in pollen: localization, systematic distribution and ecophysiological significance. *Flora* 191: 143-159.
- FRANCHI G.G., NEPI M. & PACINI E., 2002. Partially hydrated pollen: taxonomic distribution, ecological and evolutive significance. *Plant Systematics and Evolution* 234: 211-227.
- FRANCISCO-ORTEGA J., SANTOS-GUERRA A., KIM S.C. & CRAWFORD D.J., 2000. Plant genetic diversity in the Canary Islands: a conservation perspective. *American Journal of Botany* 87: 909-919.
- FRANKEL O.H., BROWN A.H.D., BURDON J.J., 1995. *The conservation of plant biodiversity*. Cambridge University Press, Cambridge.
- FREELAND P.W., 1976. Tests for the viability of seeds. *Journal of Biological Education* 10: 57-64.
- FRISON E.A. & JACKSON G.V.H., 1995. Plant health and germplasm collectors. Collecting Plant Genetic Diversity. In: GUARINO L., RAMANANTHA RAO V. & REID R. (EDS). *Collecting Plant Genetic Diversity. Technical guidelines*. CABI, Wallingford, Oxon. UK.
- FRISON G., 1996. *Propagazione del pioppo*. Edizioni L'Informatore Agrario, Verona.
- FU J.R., XIA Q.H. & TANG L.F., 1993. Effects of desiccation on excised embryonic axis of three recalcitrant seeds an studies on cryopreservation. *Seed Science and Technology* 21: 85-95.
- GALICIA HERBADA D., 2004. *Lysimachia minoricensis*. In: BAÑARES A., BLANCA G., GÜEMES J., MORENO J.C. & ORTIZ S., 2003. *Atlas y libro rojo de la flora vascular amenazada de España. Táxones prioritarios*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid. p. 78.
- GAMBORG, O.L. & PHILLIPS, G.C., 1995. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods*. Springer.

- GARCÍA M.B., 2002. Interés de los estudios demográficos en la conservación. Catalogación de especies amenazadas. In: BAÑARES A. (ED.). *Biología de la conservación de plantas amenazadas*. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Ministerio de Medio Ambiente (Serie técnica), Madrid. pp. 27-42.
- GARCÍA-FAYOS P. (ED.), 2001. *Bases ecológicas para la recolección, almacenamiento y germinación de semillas de especies de uso forestal de la Comunidad Valenciana*. Banc de Llavors Forestals, Conselleria de Medi Ambient, Generalitat Valenciana.
- GAUDEUL M. & TILL-BOTTRAUD I., 2004. Reproductive ecology of the endangered alpine species *Eryngium alpinum* L. Apiaceae: phenology, gene dispersal and reproductive success. *Annals of Botany* 93: 711-721.
- GEORGE, E.F. (ED), 1993. Storing and distributing clonal material. In: *Plant propagation by tissue culture*, part 1: 163-181. Exegetics Ltd, Edington, Wilts. England.
- GIVEN D.R., 1987. What the conservation requires of *ex situ* collections. In: BRANWELL D., HAMANN O., HEYWOOD V. & SYNGE H. (EDS). *Botanic gardens and the world conservation strategy*. Academic Press. London, UK. pp 103-116.
- GÓMEZ J.M., 2002. Self-pollination in *Euphrasia willkommii* Freyn Scrophulariaceae, an endemic species from the alpine of the Sierra Nevada Spain. *Plant Systematics and Evolution* 232: 63-71.
- GÓMEZ-CAMPO C., 1972. Preservation of West Mediterranean members of the cruciferous tribe Brassicaceae. *Biological Conservation* 4: 355-360.
- GÓMEZ-CAMPO C., 2001. La práctica de la conservación de semillas a largo plazo. In: GÓMEZ-CAMPO C. (ED). *Conservación de especies vegetales amenazadas en la región mediterránea occidental*. Centro de estudios Ramon Areces, Madrid, Spain.
- GÓMEZ-CAMPO C., 2002. Long term seed preservation: the risk of using inadequate containers is very high. *Monographs ETSIA, Universidad Politécnica de Madrid* 163: 1-10. (Disponible en www.seedcontainers.net).
- GONÇALVES S., CORREIA P.J., MARTINS-LOUÇAO M.A. & ROMANO A., 2005. A new medium formulation for in vitro rooting of carob tree based on leaf macronutrients concentrations. *Biologia Plantarum* 49: 277-280.
- GONZÁLEZ-BENITO M.E., 1998. Cryopreservation as a tool for preserving genetic variability: its use with Spanish wild species with possible landscaping value. *Acta Horticulturae* 457: 133-142.
- GORDON A.G., GOSLING P. & WNG B.S.P. (EDS), 1991. *Tree and shrub seed handbook*. ISTA, Switzerland.
- GORIAN F., 2001. La lavorazione di sementi di alberi e arbusti. In: PIOTTO B. & DI NOI A. (EDS). *Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea*. ANPA, Roma.
- GOTTLIEB LD., 1984. Electrophoretic analysis of the phylogeny of the selfpollinating populations of *Clarkia xantiana*. *Plant Systematics and Evolution* 147: 91-102.
- GOVEIA M., KIOKO J.I. & BERJAK P., 2004. Developmental status is a critical factor in the selection of excised recalcitrant axes as explants for cryopreservation: a study on *Trichilia dregeana* Sond. *Seed Science Research* 14: 241-248.
- GRAMMONT (DE) P.C. & CUARÓN A.D., 2006. An evaluation of threatened species categorization systems used on the American continent. *Conservation biology* 20(1): 14-27.
- GRANT V., 1989. *Especiación vegetal*. Limusa ed, México DF, 587.
- GRAUDAL L., KJAER E.D. & CANGER S., 1995. A systematic approach to the conservation of genetic resources of trees and shrubs in Denmark. *Forest Ecology and Management* 73: 117-134.
- GREENE S.L., HART T.C. & AFONIN A., 1999A. Using geographical information to acquire wild crop germplasm for *ex situ* collections, I. map development and field use. *Crop Science* 39: 836-842.
- GRENIER C., BRAMEL-COX P.J. & HAMON P., 2001. Core collection of *Sorghum*, I. stratification based on ecological data. *Crop Science* 41: 234-240.
- GRIFFITH M. & YAISH M.W.F., 2004. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in Plant Science* 9: 399-405.
- GROSS K.L., 1990. A comparison of methods for estimating seed number in the soil. *Journal of Ecology* 78: 1079-1093.
- GROVES C., 2003. *Drafting a conservation blueprint: A practitioner's guide to planning for biodiversity*. Washington, The Nature Conservancy. Island Press.

- GRUPO DE GRAN CANARIA., 2006. *Gran Canaria Declaration on Climate Change and Plant Conservation*. Cabildo de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain.
- GUARA M. & CINCANA M.J., 2002. Ritmo fenológico floral de *Silene cambessedesii* Boiss. & Reuter en condiciones controladas de invernadero. *Flora Montiberica* 21: 27-37.
- GUARINO L., 1995. Geographic information systems and remote sensing for plant germplasm collectors. In: GUARINO L., RAMANATHA RAO V. & REID, R. (EDS). *Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines*. CABI. Wallingford. pp. 315-328.
- GUARINO L., RAMANANTHA R.V. & REID R., 1995. *Collecting Plant Genetic Diversity. Technical guidelines*. CABI. Wallingford, Oxon.
- GUARINO L., MAXTED N. & SAWKINS M., 1999. Analysis of georeferenced data and the conservation and use of plant genetic resources. In: GREENE S.L. & GUARINO L. (EDS). *Linking genetic resources and geography: emerging strategies for conserving and using crop biodiversity*. American Society for Agronomy Special Publication 27. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, Wisconsin. pp. 1-24.
- GUARINO L., JARVIS A., HIJMANS R. J. & MAXTED N., 2002. Geographic information systems GIS and the conservation and use of plant genetic resources. In: ENGELS J.E.A. (ED). *Managing Plant Genetic Diversity*. CAB International, Wallingford. pp. 387-404.
- GUARINO L., MAXTED N. & CHIWONA E.A., 2005. *Ecogeography of Crops*. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Technical Bulletin No. 9. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- GUDIN S., ARENE L. & CHAVAGNAT A., 1992. Relation entre imbibition, densité, taux de remplissage et faculté germinative chez l'akène de *Rosa hybrida* L. *Agronomie* 12: 123-126.
- GÜEMES J., 2003. *Fumana juniperina* (Lag. ex Dunal) Pau. In : BAÑARES A., BLANCA G., GÜEMES J., MORENO J.C. & ORTIZ S. (EDS). *Atlas y libro rojo de la flora vascular amenazada de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid. pp. 258-259.
- GÜEMES J. & BOSCAIU M., 2001. The breeding system of *Fumana ericifolia*: first evidence of autogamy in woody Cistaceae. *Nordic Journal of Botany* 21: 467-474.
- GUERRANT E.O. & PAVLIK B. M., 1998. Reintroduction of rare plants: genetics, demography, and the role of *ex situ* conservation methods. In: FIEDLER P.L. & KAREIVA P.M. (EDS). *Conservation Biology: for the Coming Decade*. Chapman & Hall, New York. pp. 80-108.
- GUPTA P.K., SHARMA P.K., BALYAN H.S., ROY J.K., SHARMA S., BEHARAV A. & NEVO E., 2002. Polymorphism at rDNA loci in barley and its relation with climatic variables. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 473-481.
- HAMILTON R.G., 1988. The significance of spore banks in natural populations of *Athyrium pycnocarpon* and *Athyrium thelypteroides*. *American Fern Journal* 86: 96-104.
- HAMRICK J.L. & GODT M.J.W., 1989. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN A.H.D., CLEGG M.T., KAHLER A.L. & WEIR B.S. (EDS). *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland Sinauer, Massachusetts. pp. 43-63.
- HAMRICK J.L., GODT M.J.W., MURAWSKI D.A. & LOVELESS M.D., 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: FALK D.A. & HOLSINGER K. (EDS). *Genetics and Conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York. pp. 75-86.
- HAMRICK J.L., 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: CHAMBERS S.M. & SCHONEWALD-COX C.M. (EDS). *Genetics and Wild Population Management*. Addison-Wesley, New York. pp. 335-348.
- HAMRICK J.L. & GODT M.J.W., 1996A. Conservation genetics of endemic plant species. In: AVISE J.C. & HAMRICK J.L. (EDS). *Conservation genetics: case histories from nature*. Chapman & Hall, New York.
- HAMRICK J.L. & GODT M.J.W., 1996B. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 351: 1291-1298.
- HAMRICK J.L., LINHART Y.B. & MITTON J.B., 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10: 173-200.

- HARRINGTON J.F., 1972. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI T.T. (ED). *Seed Biology. Volume 3. Insects, and seed collection, storage, testing and certification*. New York, Academic Press. pp. 145-245.
- HARRIS G.M., JENKINS C.N. & PIMM S.L., 2005. Refining Biodiversity Conservation Priorities. *Conservation Biology* 19: 1957-1968.
- HARTMANN H.T. & KESTER D.E., 1983. *Plant propagation: principles and practices*, 4th Edition. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- HARVENGT L., MEIER-DINKEL A., DUMAS E. & COLLIN E., 2004. Establishment of a cryopreserved gene bank of European elms. *Canadian Journal of Forest Research* 34: 43-55.
- HAVENS K., GUERRANT E.O., MAUNDER M. & VITT P., 2004. Guidelines for ex situ conservation collection management: minimizing risks. In: GUERRANT E., HAVENS K. & MAUNDER M. (EDS). *Ex situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild*. Island Press, Washington, DC. pp. 454-473.
- HEDRICK P.W. & KALINOWSKI S.T., 2000. Inbreeding depression in conservation biology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31: 139-162.
- HEEDE V.D.A. & LECOURT M., 1989. *El Estaquillado. Guía práctica de multiplicación de las plantas*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 197 pp.
- HENDRIX S.D., 1984. Variation in seed weight and its effects on germination in *Pastinaca sativa* L. (Umbelliferae). *American Journal of Botany* 71: 795-802.
- HENRIQUES R.G., 1990. *Introdução aos Sistemas de Informação Geográfica*. 1º ESIG. INIP: Lisboa
- HERNÁNDEZ BERMEJO J.E. & HERRERA MOLINA F. (EDS), 2002. *El acceso a la biodiversidad vegetal y los recursos fitogenéticos*. Colecciones del Jardín Botánico de Córdoba. Jardín Botánico de Córdoba y Asociación Ibero-Macaronésica de Jardines Botánicos. 64 pp.
- HERNÁNDEZ BERMEJO J.E. & HERRERA MOLINA F., 2005. REDBAG: the Spanish Network of genebanks for wild plants. *BGjournal* 2(2): 18-20.
- HERRERA J., 1992. Flower variation and breeding system in Cistaceae. *Plant Systematics and Evolution* 179: 245-255.
- HERRERA C.M., SÁNCHEZ-LAFUENTE A.M., MEDRANO M., GUITIÁN J., CERDÁ X. & REY P., 2001. Geographical variation in autonomous self-pollination levels unrelated to pollinator service in *Helleborus foetidus* Ranunculaceae. *American Journal of Botany* 88: 1025-1032.
- HESLOP-HARRISON J.S., HESLOP-HARRISON Y. & SHIVANNA K.R., 1984. The evaluation of pollen quality and further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 367-375.
- HEYWOOD V.H. & IRIONDO J.M., 2003. Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation* 113: 321-335.
- HEYWOOD V.H. & DULLOO M.E., 2006. *In situ conservation of wild plant species: a critical global review of good practices*. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Technical Bulletin, 11, Rome. 174 pp.
- HIJMANS R.J. & SPOONER D., 2001. Geographic distribution of wild potato species. *American Journal of Botany* 88: 2101-2112.
- HIJMANS R.J., GARRETT K., HUAMAN Z., ZHANG D., SCHREUDER M. & BONIERBALE M., 2000. Assessing the geographic representativeness of gene bank collections: The case of Bolivian wild potatoes. *Conservation Biology* 14: 1755-1765.
- HIJMANS R.J., SCHREUDER M., DE LA CRUZ J. & GUARINO L., 1999. Using GIS to check coordinates of gene bank accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46: 291-296.
- HILLEL J., FELDMAN M.W. & SIMCHEN G., 1973. Mating systems and population structure in two closely related species of the wheat group, I. Variation between and within populations. *Heredity* 30: 141-167.
- HIRANO T., GODO T., MII M. & ISHIKAWA K., 2005. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Reports* 23: 534-539.
- HIRATA K., PHUNCHINDAWAN M., TUKAMOTO J., GODA S. & MIYAMOTO K., 1996. Cryopreservation of microalgae using encapsulation-dehydration. *CryoLetters* 17: 321-328.
- HODGKIN T. & GUARINO L., 1997. Ecogeographical surveys: a review. *Bocconea* 7: 21-26.

- HOEKSTRA F.A., 1995. Collecting pollen for genetic resources conservation. In: GUARINO L., RAMANANTHA RAO V. & REID R. (EDS). *Collecting Plant Genetic Diversity*. Technical guidelines. CABI. Wallingford, Oxon, UK.
- HOLTSFORD T.P. & ELLSTRAND N.C., 1989. Variation in outcrossing rate and population genetic structure of *Clarkia tembloriensis* Onagraceae. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 480-488.
- HONG T.D. & ELLIS R.H., 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. In: ENGELS J.M.M. & TOLL J. (EDS). *IPGRI Technical Bulletin No. 1*. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy.
- HONG T.D., LININGTON S. & ELLIS R.H., 1998. *Compendium of information on seed storage behaviour, I: A-H*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- HUGHES C.E., 1998. *Leucaena. A genetic resources Handbook*. Tropical Forestry Paper 37. Oxford Forestry Institute, University of Oxford. 274 pp.
- HULME P.E., 1994. Post-dispersal seed predation in grassland. Its magnitude and sources of variation. *Journal of Ecology* 82: 645-652.
- HULME P.E., 1998. Post-dispersal seed predation: consequence for plant demography and evolution. *Perspect. Plant Ecology, Evolution & Systematics* 1: 32-46.
- HUSBAND B.C. & SCHEMSKE D.W., 1996. Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution* 50: 54-70.
- IBPGR, 1982. *The design of seed storage facilities for genetic conservation*. Handbooks for genebanks, 1. Revised 1985 and 1990. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- IBPGR, 1985(A). *Handbook of seed technology for genebanks*. Vol. I. Principles and Methodology. Handbooks for genebanks, 2. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- IBPGR, 1985(B). *Handbook of seed technology for genebanks*. Vol. II. Compendium of Specific Germination Information and Test Recommendations Handbooks for genebanks, 3. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- IGARTUA E., GRACIA M.P., LASA J.M., MEDINA B., MOLINA-CANO J.L., MONTOYA J.L. & ROMAGOSA I., 1998. The Spanish barley core collection. *Genetic Resources and Crop Evolution* 45: 475-481.
- ISTA, 2004. *International rules for seed testing*. Edition 2004. The International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, CH-Switzerland.
- ISTA, 2006. *International rules for seed testing*. Edition 2006. The International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, CH-Switzerland.
- IUCN, 1994. *IUCN Red List Categories*. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland and Cambridge.
- IUCN, 2001. *IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1*. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland and Cambridge.
- IUCN, 2003(A). *Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria*. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland and Cambridge.
- IUCN, 2003(B). *Guidelines for Application of IUCN Red List Criteria at Regional Levels: Version 3.0*. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland and Cambridge.
- JAIMES I. & RAMÍREZ N., 1999. Breeding systems in a secondary deciduous forest in Venezuela: The importance of life form, habitat, and pollination specificity. *Plant Systematics and Evolution* 215: 23-36.
- JARVIS A., GUARINO L., WILLIAMS D., WILLIAMS K. & HYMAN G., 2002. Spatial analysis of wild peanut distributions and the implications for plant genetic resource conservation. *Plant Genetic Resources Newsletter* 131: 29-35.
- JARVIS A., FERGUSON M., WILLIAMS D., GUARINO L., JONES P., STALKER H., VALLS J., PITTMAN R., SIMPSON C. & BRAMEL P., 2003. Biogeography of wild *Arachis*: Assessing conservation status and setting future priorities. *Crop Science* 43: 1100-1108.
- JIMÉNEZ R. & CABALLERO M., 1990. *El cultivo industrial de plantas en maceta*. Ediciones de Horticultura SL. Reus.
- JIMÉNEZ-ALFARO B., 2008. *Biología de la conservación de plantas vasculares en la Cordillera Cantábrica. Prioridades y casos de estudio*. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo. 274 pp.

- JIMÉNEZ-ALFARO B., BUENO SÁNCHEZ A. & FERNÁNDEZ PRIETO J.A., 2007. Valoración de plantas prioritarias en Asturias a partir de un índice de responsabilidad. *Naturalia Cantabrica* 3: 25-36.
- JOHNSON S.D., NEAL P.R., PETER C.I. & EDWARDS T.J., 2004. Fruiting failure and limited recruitments in remnant populations of the hawkmoth-pollinated tree *Oxyanthus pyriformis* subsp. *pyriformis* Rubiaceae. *Biological Conservation* 120: 31-39.
- JONES L.E. & HOOK P.W., 1970. Growth and development in microculture of gametophytes from stored spores of *Equisetum*. *American Journal of Botany* 544: 430-435.
- JÜRGENS A., WITT T. & GOTTSBERGER G., 2002. Pollen grains numbers, ovule numbers and pollen-ovule ratios in Caryophylloideae: correlation with breeding system, pollination, life form, style number and sexual system. *Sexual Plant Reproduction* 14: 279-289.
- KEARNS C.A. & INOUE D.W., 1993. *Techniques for Pollination Biologists*. University Press of Colorado, Niwot, CO.
- KELLER V. & BOLLMANN K., 2004. From Red Lists to Species of Conservation Concern. *Conservation Biology* 18(6): 1636-1643.
- KNOX R.B., WILLIAMS E.G. & DUMAS C., 1986. Pollen, pistil, and reproductive function in crop plants. *Plant Breeding Reviews* 4: 9-79.
- KOLBERG H., 2003. Targeting Collecting for Conservation. In: SMITH D., DICKIE J.B., LININGTON S.H., PRITCHARD H.W. & PROBERT R.J. (EDS). *Seed Conservation. Turning science into practice*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- KOO B., PARDEY P. & WRIGHT B., 2004. *Saving seeds*. IPGRI and IFPRI. CABI Publishing, Wallingford, UK. pp. 209-217.
- LAGUNA E., DELTORO V., PEREZ-BOTELLA V., SERRA L., OLIVARES A. & FABREGAT C., 2004. The role of small reserves in plant conservation in a region of high diversity in eastern Spain. *Biological Conservation* 119: 421-426.
- LAHIRI A.N. & KHARABANDA B.C., 1961. Dimorphic seeds in some arid zone grasses and the significance of growth differences in their seedlings. *Science and Culture* 27(9): 448-450.
- LAMBARDI M., 2002. Biotechnology in agriculture and forestry. In: TOWILL L.E. & BAJAJ Y.P.S. (EDS). *Cryopreservation of Plant germplasm* II, 50. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- LAMONT B.B., KLINKHAMER P.G.L. & WITKOWSKI E.T.F., 1993. Population fragmentation may reduce fertility to zero in *Banksia goodii*: a demonstration of the Allee effect. *Oecologia* 94: 446-450.
- LANDIS T., LUCCI S. & PIOTTO B., 2004. Propagazione delle Salicaceae, conservazione della biodiversità nel ripristino ambientale. *Sherwood* 88: 31-33.
- LAWRENCE M.J., 2002. A comprehensive collection and regeneration strategy for ex situ conservation. *Genetic Resources and Crop Evolution* 49: 199-209.
- LAYTON C.R. & GANDERS F.R., 1984. The genetic consequences of contrasting breeding systems in *Plectritis* Valerianaceae. *Evolution* 38: 1308-1325.
- LÁZARO A. & TRAVESET A., 2005. Spatio-temporal variation in the pollination mode of *Buxus balearica* Buxaceae, an ambophilous and selfing species: mainland-island comparison. *Ecography* 28: 640-652.
- LECK M.A., 1989. Wetland seed banks. In: LECK M.A., PARKER V.T. & SIMPSON R.L. (EDS). *Ecology of Soil Seed Bank*. Academic Press, San Diego.
- LEE T.D., 1988. Patterns of fruit and seed production. In: LOVETT DOUST J. & LOVETT DOUST L. (EDS). *Plant reproductive ecology: patterns and strategies*. Oxford University Press, New York.
- LEE P.-C., TAYLOR A.G., ZHANG M. & ESASHI Y., 2001. Evolution of volatiles during seed aging: exogenous gas application. *Journal of New Seeds* 2: 77-91.
- LÉFÈVRE F., BARSOUM N., HEINZE B., KAJBA D., ROTACH P., DE VRIES S.M.G. & TUROK J., 2001. *In situ conservation of Populus nigra*. International Plant Genetic Resources (IPGRI), Rome.
- LEVIN D.A., 1978. Genetic variation in annual *Phlox*: self-compatible versus self-incompatible species. *Evolution* 32: 2445-263.
- LIENERT J. & FISCHER M., 2004. Experimental inbreeding reduces seed production and germination inde-

- pendent of fragmentation of populations of *Swertia perennis*. *Basic and Applied Ecology* 5: 43-52.
- LINDSAY S., DYER A.F., 1990. Fern spore banks. Implications for gametophyte establishment. In: RITA J. (ED). *Taxonomia. Biogeografía i conservacion de pteridofitos*. Palma de Mallorca: Societat d'Historia Natural de les illes Balears. IME. 243-253.
- LINDSAY S., SHEFFIELD E., DYER A.F., 1992A. Soil spore banks, fern conservation and isozyme analysis. In: IDE J.M., JERMY A.C. & PAUL A.L. (EDS). *Fern horticulture: past, present and future perspectives*. Intercept, Andover, UK. pp. 279- 283.
- LINDSAY S., WILLIAMS N. & DYER A.F., 1992B. Wet storage of fern spores: unconventional but far more effective!. In: IDE J.M., JERMY A.C. & PAUL A.L. (EDS). *Fern horticulture: past, present and future perspectives*. Intercept, Andover, UK. pp. 285-291.
- LININGTON S.H., 2003. The Design of Seed Banks. In: SMITH R.D., DICKIE J.B., LININGTON S.H., PRITCHARD H.W. & PROBERT R.J. (EDS). *Seed Conservation: turning science into practice*. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 591-636.
- LIÑÁN (DE) C., 2004. *Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales*. 20ª edición. Ediciones Agrotécnicas, SL. Madrid.
- LISCI M. & PACINI E., 1997. Fruit and seed structural characteristics and seed dispersal in *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 66: 379-386.
- LISCI M., BIANCHINI E. & PACINI E., 1996. Structure of the elaiosome in some angiosperm species. *Flora* 191: 131-141.
- LIU H. & KOPTUR S., 2003. Breeding system and pollination of a narrowly endemic herb of the Lower Florida Keys: Impacts of the urban-wildland interface. *American Journal of Botany* 90: 1180-1187.
- LIU K., EASTWOOD R.J., FLYNN S., TURNER R.M. & STUPPY W.H., 2008. *Seed Information Database* (release 7.1, May 2008). <http://www.kew.org/data/sid>.
- LLOYD R.M. & KLEKOWSKI E.J. JR., 1970. Spore germination and viability in Pteridophyta: evolutionary significance of chlorophyllous spores. *Biotropica* 2: 129-137.
- LLOYD D.G. & WEBB C.K., 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. 1. Dichogamy. *New Zealand Journal of Botany [New Zealand J. Bot.]* 24: 135-162.
- LOBIN W. & BARTHOLOTT W., 1988. *Sophora toromiro* Leguminosae: the lost tree of Easter Island. *Botanic Gardens Conservation News* 13: 32-34.
- LUBRANO L., 1992. Micropropagation of poplars (*Populus* sp.). Biotechnology in agriculture and forestry. In: BAJAJ Y.P.S. (ED). *High tech and micropropagation II*, vol 18. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- LYNCH P.T., 1999. Tissue culture techniques in in vitro plant conservation. In: BENSON E.E. (ED). *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor & Francis, Ltd.
- MAC-CÁRTHAIGH D. & SPETHMANN W., 2000. *Krüssmanns Gehölzvermehrung*. Parey Buchverlag, Berlin.
- MACDONALD B., 1987. *Practical woody plant propagation for nursery growers*. Timber Press. Portland, Oregon.
- MACE G.M. & COLLAR N.J., 2002. Priority-setting in species conservation. In: NORRIS K. & PAIN (EDS). *Conserving bird biodiversity*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 61-73.
- MACE G.M. & LANDE R., 1991. Assessing extinction threats: toward a reevaluation of IUCN threatened species categories. *Conservation biology* 5: 148-157.
- MACE G.M., POSSINGHAM H.P. & LEADER-WILLIAMS N., 2007. Prioritizing choices in conservation. In: MACDONALD D. & SERVICE K. (EDS). *Key Topics in Conservation Biology*. Blackwell Publishing, UK. pp 17-34.
- MADSEN T., SHINE R., OLSSON M. & WITZELL H., 1999. Restoration of an inbreed adder population. *Nature* 402: 34-35.
- MAENE L. & DEBERGH P., 1986. Optimisation of plant micropropagation. *Med Fac Landbouwwet Rijksuniv Gent* 51: 1479-1488.
- MARGULES C.R., 1989. Introduction to some Australian developments in conservation evaluation. *Biological Conservation* 50: 1-11.
- MARODER H.L., PREGO I.A., FACCIUTO G.R. & MALDONADO S.B., 2000. Storage behaviour of *Salix alba* and *Salix matsudana* seeds. *Annals of Botany* 86: 1017-1021.

- MARQUES I. & DRAPER D., 2004. Creating management guidelines for hybrid plants. The case of *Narcissus x perezlarae* Font Quer. *Planta Europa IV Proceedings*. Valencia, Spain. http://www.nerium.net/plantaeuropa/Download/Proceedings/Marques_Draper.pdf
- MARQUÉS I., DRAPER D. & MARTINS LOUÇAO M.A., 2004. *Germination ecology of autumnal mediterranean geophytes*. Seed ecology 2004. Rodhes. Greece.
- MARSH H., DENNIS A., HINES H., KUTT A., McDONALD K., WEBER E., WILLIAMS S. & WINTER J., 2007. Optimizing Allocation of Management Resources for Wildlife. *Conservation Biology* 21(2): 387-399.
- MARSHALL D.R. & BROWN A.H.D., 1983. Theory of forage plant collection. In: MCIVOR J.G. & BRAY R.A. (EDS). *Genetic Resource of Forage Plants*. CSIRO, Melbourne.
- MARTIN A.C. & BARKLEY W.D., 1961. *Seed identification manual*. University of California Press, Berkeley.
- MARTIN A.C., 1946. The comparative internal morphology of seeds. *American Midland Naturalist* 36: 513-660.
- MARTIN C., MARTINEZ-LABORDE J.B. & PEREZ C., 1998. The use of X-ray radiography in the assessment of conserved seeds of six halophytic species of *Limonium*. *Journal of Arid Environments* 38: 245-253.
- MARTÍNEZ M.T., BALLESTER A. & VIEITEZ A.M., 2003. Cryopreservation of embryogenic cultures of *Quercus robur* using desiccation and vitrification procedures. *Cryobiology*, 46: 182-189.
- MARZALINA M. & KRISHNAPILLAY B., 1999. Recalcitrant seed biotechnology applications to rain forest conservation. In: BENSON E.E. (ED). *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor & Francis, Ltd.
- MATTANA E., FENU G. & BACCHETTA G., 2005. La Banca del Germoplasma della Sardegna (BG-SAR): uno strumento per la conservazione del germoplasma autoctono sardo. *Informatore Botanico Italiano* 37(1): 144-145.
- MATTANA E., GRILLO O., VENORA G. & BACCHETTA G., 2008. Germplasm image analysis of *Astragalus maritimus* and *A. verrucosus* (subgen. *Trimeniaeaus*). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 65(1): 149-155.
- MAUNDER M., HAVENS K., GUERRANT E.O. & FALK D.A. 2004. Ex situ Methods. A vital but underused set of conservation resources. In: GUERRANT E., HAVENS K. & MAUNDER M. (EDS). *Ex situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild*. Island Press, Washington, DC. pp. 1-20.
- MASTER L.L., 1991. Assessing threats and setting priorities for conservation. *Conservation Biology* 5:559-563.
- MAXTED N., 1995. An Ecogeographic Study of *Vicia* Subgenus *Vicia*. In: IBPGR. *Systematic and Ecogeographic Studies in Crop Gene pools*, 8. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome. p. 184.
- MAXTED N. & KELL S., 1998. Ecogeographic techniques and in situ conservation: a case study for the legume genus *Vicia* L. in Turkey. In: ZENCIRCI N., KAYA Z., ANIKSTER Y. & ADAMS W. (EDS). *Proceedings of International Symposium on in Situ Conservation of Plant Genetic Diversity*. Central Research Institute for Field Crops, Ankara, Turkey. pp. 323-344.
- MAXTED N. & GUARINO L., 2003. Plannig Plant Genetic Conservation. In: SMITH D., DICKIE J.B., LININGTON S.H., PRITCHARD H.W. & PROBERT R.J. (EDS). *Seed Conservation. Turning science into practice*. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 37-78.
- MAXTED N., VAN SLAGEREN M.W. & RIHAN J., 1995. Ecogeographic surveys. In: GUARINO L., RAMANATHA RAO V. & REID R. (EDS). *Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines*. CAB International, Wallingford. pp. 255-286.
- MAXTED N., PAINTING K. & GUARINO L., 1997. *Ecogeographic surveys. Material de capacitación*. Unidad 5.2. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Italia, Roma.
- MAXTED N., MABUZA-DLAMINI P., MOSS H., PADULOSI S., JARVIS A. & GUARINO L., 2004. An Ecogeographic Survey: African Vigna. In: IBPGR. *Systematic and Ecogeographic Studies in Crop Gene pools*, 10. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome. pp. 1-468
- MAXTED N., FORD-LLOYD B., KELL S.P., IRIONDO J., DULLOO E. & TUROK J., 2007. *Crop Wild Relative Conservation and Use*. Oxford University Press. 720 pp
- MAXTED N., DULLOO E., FORD-LLOYD B.V., IRIONDO J. & JARVIS A., 2008. Genetic gap analysis: a tool for more effective genetic conservation assessment. *Diversity and Distributions* (on-line first DOI).

- MÉDAIL F. & QUÉZEL P., 1997. Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean basin. *Mediterranean plant biodiversity* 84(1): 112-127.
- MEZZALIRA G. & PIOTTO B. (EDS), 2003. Biodiversità e vivaistica forestale: aspetti normativi, scientifici e tecnici. *Manuali e Linee Guida APAT*, 18: 1-122.
- MILLER M., 2000. Fire autoecology. In: BROWN J.K. & SMITH J.K. *Wildland fire in ecosystems, effects on fire and flora*. Gen.Tech. Rep. RMRS-42, 2. Ogden UT, USDA Forest Service, Rocky Mt. Res. St.
- MIMAM, 2006. Estrategia española para la conservación y el uso sostenible de los recursos genéticos forestales. Dirección General de Biodiversidad, Madrid. 81 pp.
- MITTON J.B. & GRANT M.C., 1984. Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 479-499.
- MOELLER D.A. & GEBER M.A., 2005. Ecological context of the evolution of self-pollination in *Clarkia xantiana*: Population size, plant communities, and reproductive assurance. *Evolution* 59: 786-799.
- MONTELEONE I., FERRAZZINI D., CAMERANO P., GRIECO C., PIOTTO B. & BELLETTI P., 2005(A). Definizione di regioni di provenienza per il frassino maggiore. *Sherwood* 115: 5-10.
- MONTELEONE I., GORIAN F. & BELLETTI P., 2005(B). Strategie di conservazione e gestione della biodiversità nella filiera di produzione di materiale forestale di propagazione. *Atti IV Convegno SISEF*, Pignola (PZ), 7-10 ottobre 2003.
- MONTMOLLIN (DE) B. & STRAHM W. (EDS), 2005. *The Top 50 Mediterranean Island Plants*. Wild plants at the brink of extinction, and what is needed to save them. IUCN/SSC Mediterranean Islands Plant Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- MORENO SAIZ J.C., MOTA POVEDA J.F. & GOMEZ-CAMPO C., 2006. *Diploptaxis siettiana*. In: IUCN, 2007. *IUCN Red List of Threatened Species*. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 02 June 2008.
- MORINI S., 2000. In vitro culture of *Osmunda regalis* fern. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 75(1): 31-34.
- MOZA M.K. & BHATNAGAR A.K., 2007. Plant reproductive studies crucial for conservation. *Current Science* 92: 1207.
- MURASHIGE T. & SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- MURASHIGE T., 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 25: 135-166.
- MUSMARRA A., 1996. *Dizionario di Botanica*. Edagricole, Bologna.
- MYERS N., MITTERMEIER R.A., MITTERMEIER C.G., DA FONSECA & KENT J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 40(3): 853-858.
- NAMKOONG G., 1988. Sampling for germplasm collections. *HortScience* 23:79-81.
- NAVARRO L. & GUITIÁN J., 2002. The role of floral biology and breeding system on the reproductive success of the narrow endemic *Petrocoptis viscosa* Rothm. (Caryophyllaceae). *Biological Conservation* 103: 125-132.
- NATURE SERVE EXPLORER, 2005. *An online encyclopedia of life* web application version 1.6. NatureServe, Arlington, Virginia, USA. <http://www.natureserve/explorer/>.
- NEEL M.C. & CUMMINGS M.P., 2003. Genetic consequences of ecological reserve design guidelines: an empirical investigation. *Conservation Genetics* 4: 427-439.
- NEI M., 1973. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 70: 3321-3323.
- NEI M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.
- NEPI M. & PACINI E., 1993. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. *Annals of Botany* 72: 526-536.
- NEPI M., FRANCHI G.G. & PACINI E., 2001. Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. *Protoplasma* 216: 171-180.
- NEPI M. & PACINI E., 1993. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. *Annals of Botany* 72: 526-536.

- NETTANCOURT (DE) D., 1977. *Self-autoincompatibility in Angiosperms*. Berlin, Springer-Berlag.
- NIKOLAIEVA M.G., 1969. *Physiology of deep dormancy in seeds*. Israel Programme for Scientists Translations, Jerusalem. 220 pp.
- NIKOLAIEVA, M.G. 1977. Factors controlling the seed dormancy pattern. In: KHAN, A.A. (ED.). *The physiology and biochemistry of feed dormancy and germination*. Amsterdam, North-Holland. pp. 51-74.
- NORMAH M.N. & MARZALINA M., 1996. Achievements and prospects of in vitro conservation for tree germplasm. In: NORMAH, M.N. (ED). *Proceedings of the International Workshop on In Vitro Conservation of Plant Genetic Resources*. Kuala Lumpur, Malaysia.
- O'BRIEN SJ., 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 5748-5755.
- OGAWA K. & IWABUCHI M., 2001. A mechanism for promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide. *Plant and Cell Physiology* 42(3): 286-291.
- OJA T., 2005. Isozyme evidence on the genetic diversity, mating system and evolution of *Bromus intermedium* Poaceae. *Plant Systematics and Evolution* 254: 199-208.
- ORTEGA M., LEVASSOR C. & PECO B., 1997. Seasonal dynamics of Mediterranean pasture seed banks along environmental gradients. *Journal of Biogeography* 24: 177-195.
- ORTEGA-OLIVENCIA A. & DEVESA J.A., 1993. Sexual reproduction in some *Scrophularia* species Scrophulariaceae from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *Plant Systematics and Evolution* 184: 159-174.
- PACINI E., 1990. *Mercurialis Annuua* L. (Euphorbiaceae). Seed Interactions With The Ant Messor Structor (Latre.), Hymenoptera: Formicidae. *Acta Botanica Neerlandica* 39: 253-262.
- PACINI E., 1996. Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sexual Plant Reproduction* 9: 362-366.
- PACINI E., 1997. Tapetum character states: analytical keys for tapetum types and activities. *Canadian Journal of Botany* 75: 1448-1459.
- PACINI E., 2000. From anther and pollen ripening to pollen presentation. *Plant Systematics and Evolution* 222: 19-43.
- PACINI E., FRANCHI G.G., LISCI M. & NEPI M., 1997. Pollen viability related to type of pollination in six angiosperm species. *Annals of Botany* 80: 83-87.
- PACINI E. & FRANCHI G.G., 1998. Pollen dispersal units, gynoeceum and pollination. In: OWENS S.J. & RUDALL P.J. (EDS). *Reproductive Biology*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- PACINI E. & HESSE M., 2004. Cytophysiology of pollen presentation and dispersal. *Flora* 199: 273-285.
- PACINI E. & HESSE M., 2005. Pollenkitt. its composition, forms and functions. *Flora* 200: 399-415.
- PACINI E., GUARNIERI M. & NEPI M., 2006. Pollen carbohydrates and water content during development, presentation and dispersal: a short review. *Protoplasma* 228(1-3): 73-77.
- PAGE C.N., 1979. Experimental aspects of fern ecology. In: DYER, A.F. (ED). *The experimental biology of ferns*. Academic Press, London. pp. 552-589.
- PÁLFI G. & MIHALIK E., 1985. Proline staining as a new method for determining the viability of pollen in wind and insect pollinated plants. *Acta Botanica Hungarica* 31: 315-321.
- PANGUA E., LINDSAY S. & DYER A.F., 1994. Spore germination and gametophyte development in three species of *Asplenium*. *Annals of Botany* 73: 587-593.
- PANIS B. & LAMBARDI M., 2005. Status of cryopreservation technologies in plants crops and forest trees. In: *The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources*. International Workshop, Turin, Italy, 5-7 March 2005.
- PANIS B., SWENNEN R. & ENGELMANN F., 2001. Cryopreservation of plant germplasm. *Acta Horticulturae* 560: 79-86.
- PARKER V.T., LECK M.A. & SIMPSON R.L., 1989. Pattern and process in the dynamics of seed banks. In: LECK M.A., PARKER V.T. & SIMPSON R.L. (EDS). *Ecology of Soil Seed Bank*. Academic Press, San Diego.
- PARKER V.T. & KELLY V.R., 1989. Seed banks in California chaparral and other Mediterranean climate shrublands. In: LECK M.A., PARKER V.T. & SIMPSON R.L. (EDS). *Ecology of Soil Seed Bank*. Academic Press, San Diego.

- PARRA-QUIJANO M., DRAPER D. & IRIONDO J.M., 2003. Assessing *in situ* conservation of *Lupinus* sp. in Spain through GIS. *Crop Wild Relative* 1: 8-9
- PARRA-QUIJANO M., DRAPER D., TORRES E. & IRIONDO J.M., 2007. Ecogeographical Representativeness in Crop Wild Relative *Ex Situ* Collections. In: MAXTED N. & AL. (EDS) *Crop Wild Relative Conservation and Use*. CAB International. pp. 248-272.
- PÄRTEL M., KALAMEES R., REIER Ü., TUVI E-L., ROOSALUSTE E., VELLAK A. & ZOBEL M., 2005. Grouping and prioritization of vascular plant species for conservation: combining natural rarity and management need. *Biological conservation* 123: 271-278.
- PARTON E., VERVAEKE I., DELEN R., VANDENBUSSCHE B., DEROOSE R. & DE PROFT M., 2002. Viability and storage of bromeliad pollen. *Euphytica* 125: 155-161.
- PASTORINO M.J. & GALLO L.A., 2006. Mating system in a low-density natural population of the dioecious wind-pollinated Patagonian Cypress. *Genetica* 126: 315-321.
- PEARSE D.E. & CRANDALL K.A., 2004. Beyond FST: Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics* 5: 585-602.
- PECO B., LEVASSOR C. & ORTEGA M., 1998. Similarity between seed banks and vegetation in Mediterranean grassland: a predictive model. *Journal of Vegetation Science* 9: 815-828.
- PENCE V.C., 1999. The application of biotechnology for the conservation of endangered plants. In: BENSON E.E. (ED). *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor & Francis, Ltd.
- PENCE V.C., 2000. Survival of chlorophyllous and nonchlorophyllous fern spores through exposure to liquid nitrogen. *American Fern Journal* 90(4): 119-126.
- PÉREZ-BAÑÓN C., JUAN A., PETANIDOU T., MARCOS-GARCÍA M.A. & CRESPO M.B., 2003. The reproductive ecology of *Medicago citrina* Font Quer Greuter Leguminosae: a bee-pollinated plant in Mediterranean islands where bees are absent. *Plant Systematics and Evolution* 241: 29-46.
- PÉREZ-GARCÍA F., GONZÁLEZ-BENITO M.E. & GÓMEZ-CAMPO C., 2007. High viability recorded in ultra-dry seeds of 37 species of Brassicaceae after almost 40 years of storage. *Seed Science and Technology* 35: 143-153.
- PÉREZ-GARCÍA F., GONZÁLEZ-BENITO M.E. & GÓMEZ-CAMPO C., 2008. Germination of fourteen endemic species from the Iberian Peninsula, Canary and Balearic Islands after 32-34 years of storage at low temperature and very low water content. *Seed Science and Technology* 36(2): 407-422.
- PÉREZ-GARCÍA F. & GONZÁLEZ-BENITO M.E., 2008. Seed cryopreservation of *Halimium* and *Helianthemum* species *CryoLetters* 29(4): 271-276.
- PERRINO P. & TERZI M., 2003. Importanza della conservazione del germoplasma. In: BRESSAN M., MAGLIARETTA L. & PINO S. (EDS). *Cereali del Veneto*. Regione Veneto/Prov. Di Vicenza/Veneto Agricoltura.
- PIGNATTI S., MENEGONI P. & GIACANELLI V. (EDS.), 2001. *Liste rosse e blu della flora italiana*. ANPA, Roma.
- PIOTTO B., 1992. *Semi di alberi e arbusti coltivati in Italia*. Società Agricola e Forestale. Gruppo E.N.C.C. 78 pp.
- PIOTTO B., 1997. Nuove tecniche per preservare la variabilità dei caratteri genetici in alberi e arbusti con semi dormienti. *EM-Linea Ecologica* 29(2): 51-54.
- PIOTTO B., 2005. La propagazione per seme. In: CERVELLI C. (ED). *Le specie arbustive della macchia mediterranea, un patrimonio da valorizzare*. Collana Sicilia Foreste, 26. Regione Siciliana, Agrigento.
- PIOTTO B., FALLERI E. & PORTA-PUGLIA A., 2001. La qualità del seme. In: PIOTTO B. & DI NOI A. (EDS). *Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea*. ANPA, Roma.
- PIOTTO B. & DI NOI A., 2001. *Manuale ANPA. Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea*. ANPA, Roma.
- PIOTTO B. & DI NOI A. (EDS), 2003. *Seed propagation of Mediterranean trees and shrubs*. APAT, Roma.
- PIOTTO B. & AMADEI M., 2004. Conserviamo i semi per difendere la natura. *Alberi e Territorio* 10/11: 48-55.
- PIOTTO B. & CROSTI R., 2005. Metodo per individuare le esigenze ecofisiologiche per la germinazione. *Alberi e Territorio* 12: 41-44.

- PIOTTO B., FALLERI E. & BRUNORI A. (EDS) 2005. Propagazione di specie vegetali di particolare valore ecologico dell'Appennino Umbro-Marchigiano. *APAT Rapporti* 52: 1-103.
- POPOV A.S., POPOVA E.V., NIKISHINA T.V. & VYSOTSKAYA O.N., 2006. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. *International Journal of Refrigeration* 29: 403-410.
- PORCEDDU E. & JENKINS G., 1982. Seed regeneration in cross-pollinated species. In: *Proceedings of the C.E.C./EUCARPIA Seminar*. Nyborg, Denmark, 15-17 July 1981.
- PRESS S.J. & WILSON S., 1978. Choosing between logistic regression and discriminant analysis. *Journal of the American Statistical Association* 73: 699-705.
- PRITCHARD P.C.H., 1999. Status of the black Turtle. *Conservation Biology* 13: 1000-1003.
- PRITCHARD J.K., STEPHENS M. & DONNELLY P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- PRITCHARD H.W. & DICKIE J.B., 2003. Predicting Seed Longevity: the use and abuse of seed viability equations. In: SMITH R.D., DICKIE J.B., LININGTON S.H., PRITCHARD H.W. & PROBERT R.J. (EDS). *Seed Conservation: turning science into practice*. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 653-722.
- PROBERT R.J., 2003. Seed Viability under Ambient Conditions, and the Importance of Drying. In: SMITH R.D., DICKIE J.B., LININGTON S.H., PRITCHARD H.W. & PROBERT R.J. (EDS). *Seed Conservation: turning science into practice*. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 337-365.
- QUINTANILLA L.G., AMIGO J., PANGUA E. & PAJARON S., 2002. Effect of storage method on spore viability in five globally threatened fern species. *Annals of Botany* 90: 461-467.
- QUINTANILLA L.G., PAJARÓN S., PANGUA E. & AMIGO J., 2000. Effect of temperature on germination in Northernmost populations of *Culcita macrocarpa* and *Woodwardia radicans*. *Plant biology* 2: 612-617.
- RABINOWITZ D., 1981. Seven forms of rarity. In: H. SYNGE (ED). *The biological aspects of rare plant conservation*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass. pp. 205-217.
- RAJORA O.P. & ZUFFA L., 1986. Pollen viability of some *Populus* species as indicated by in-vitro pollen germination and tetrazolium chloride staining. *Canadian Journal of Botany* 64: 1086-1088.
- RAMSEY M. & VAUGHTON G., 1996. Inbreeding depression and pollinator availability in a partially self-fertile perennial herb *Blandfordia grandiflora* Liliaceae. *Oikos* 76: 465-474.
- RAO V.R. & HODGKIN T., 2002. Genetic diversity and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 1-19.
- RAYMOND A.T.G., 1989. *Producción de semillas de plantas hortícolas*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- REED B.M., 2001. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *CryoLetters* 22: 97-104.
- REGAN T.J., MASTER L.L. & HAMMERSON G.A., 2004. Capturing expert knowledge for threatened species assessments: a case study using NatureServe conservation status ranks. *Acta Oecologica* 26: 95-107.
- REID R. & STRICKLAND R.W., 1983. Forage plant collection in practice. In: MCLIVOR, J.G. & BRAY, R.A. (EDS). *Genetic resources of forage plants*. pp. 149-156.
- REINHOUD P.J., VAN IREN F. & KIJNE J.W., 2000. Cryopreservation of undifferentiated plant cells. In: ENGELMANN F. & TAKAGI H. (ED). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. JIRCAS/International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome. pp. 91-102.
- RICE K.J., 1989. Seed aging, delayed germination and reduced competitive ability in *Bromus tectorum*. *Plant Ecology* 155: 237-243.
- RICHARDS A.J., 1997. *Plant Breeding Systems*. Chapman & Hall, London.
- RIO A.H. (DEL), BAMBERG J.B., HUAMAN Z., SALAS A. & VEGA S.E., 2001. Association of ecogeographical variables and RAPD marker variation in wild potato populations of the USA. *Crop Science* 41: 870-878.
- RITLAND C. & RITLAND K., 1989. Variation of sex allocation among eight taxa of the *Mimulus guttatus* species complex Scrophulariaceae. *American Journal of Botany* 76: 1731-1739.
- ROBERTS E.H., 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1: 499-514.
- ROBERTS H.A., 1981. Seed banks in soil. *Advances in Applied Biology* 6: 1-55.
- RODRÍGUEZ-PÉREZ J., 2005. Breeding system, flower visitors and seedling survival of two endangered species of *Helianthemum* (Cistaceae). *Annals of Botany* 95: 1229-1236.

- RODRÍGUEZ-HIRALDO C., DELGADO A., PLAZA L., 2006. Pteridofitos en Andalucía. Proyecto de conservación. *Medio Ambiente* 55: 16-20.
- ROGGE G.D., VIANA A.M. & RANDI A.M., 2000. Cryopreservation of spores of *Dicksonia sellowiana*: An endangered tree fern indigenous to South and Central America. *CryoLetters* 214: 223-230.
- ROSSELLÓ J.A. & MAYOL M., 2002. Seed germination and reproductive features of *Lysimachia minoricensis* Primulaceae, a wild-extinct plant. *Annals of Botany* 89: 559-562.
- ROSSELLÓ-GRAELL A., DRAPER D., CORREIAL A.I.D. & IRIONDO J.M., 2002. Translocación de una población de *Narcissus cavanillesii* A. Barra & G. López en Portugal como medida de minimización de impacto *Ecosistemas* 11(3).
- RUANO R., 2003. *Viveros Forestales*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- RUÍZ-ZAPATA T.R. & ARROYO M.T.K., 1978. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica* 10: 221-230.
- RUNIONS C.J. & GEBER MA., 2000. Evolution of the self-pollinating flower in *Clarkia xantiana* Onagraceae, I. Size and development of floral organs. *American Journal of Botany* 87: 1439-1451.
- SAKAI A., KOBAYASHI S. & OIYAMA I., 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9: 30-33.
- SÁNCHEZ J.L., REYES-BETANCORT J.A., SCHOLZ S. & CAUJAPÉ-CASTELLS J., 2004. Patrones de variación genética poblacional en el endemismo canario *Matthiola bolleana* Webb ex Christ. *Botánica Macaronésica* 25: 1-11.
- SÁNCHEZ PALOMARES O., SÁNCHEZ SERRANO F. & CARRETERO CARRERO M.P., 1999. *Modelos y cartografía de estimaciones climáticas termopluviométricas para la España peninsular*. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- SÁNCHEZ J.L., CAUJAPÉ-CASTELLS J., REYES-BETANCORT A. & SCHOLZ S., 2006. Population genetics of *Matthiola bolleana* Brassicaceae in the Canary Islands. *Plant Systematics and Evolution* 262: 139-151.
- SARASAN V., CRIPPS R., RAMSAY M.M., ATHERTON C., MCMICHEN M., PRENDERGAST G. & ROWNTREE J.K., 2006. Conservation in vitro of threatened plants. Progress in the past decade. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 42: 206-214.
- SCHEMSKE D.W. & LANDE R., 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. *Evolution* 39: 41-52.
- SCHMIDT L. & JØKER D., 2001. *Technical note no. 59. Glossary of seed biology and technology*. Danida Forest Seed Centre. Humlebaek, Denmark.
- SCHNELLER J.J., 1988. Spore bank, dark germination and gender determination in *Athyrium* and *Dryopteris*. Results and implications for population biology of Pteridophyta. *Botanica Helvetica* 98: 77-86.
- SCHNELLER J.J., HAUFLE C.H., RANKER T.A., 1990. Antheridiogen and natural gametophyte populations. *American Fern Journal* 80: 143-152.
- SCHNELLER J.J., 1998. How much genetic variation in fern populations is stored in the spore banks? A study of *Athyrium filix-femina* (L.) Roth. *Botanical Journal of the Linnean Society* 127: 195-206.
- SCHOEN D.J. & BROWN A.H.D., 2001. The conservation of wild plant species in seed banks. *Bioscience* 5, 960-966.
- SCHOEN D.J., 1982. The breeding system of *Gilia achilleifolia*: variation in floral characteristics and outcrossing rate. *Evolution* 36: 352-360.
- SCHOEN D.J., JOHNSTON M.O., L'HEUREUX A.M. & MARSOLAIS J.V., 1997. Evolutionary history of the mating system in *Amsinckia* Boraginaceae. *Evolution* 51: 1090-1099.
- SCHOENIKE R.E. & BEY C.F., 1981. Conserving genes through pollen storage. In: FRANKLIN E.C. (ED). *Pollen management han book*. USDA. Forest Service Agriculture Handbook, 287. pp. 72-73.
- SCHUMACHER H.M., 1999. Cryo-conservation of industrially important plant cell cultures. In: BENSON E.E. (ED). *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor & Francis, Ltd.
- SCOPPOLA A. & SPAMPINATO G. (EDS), 2005. Atlante delle specie a rischio di estinzione. In: SCOPPOLA A. & BLASI C. (EDS). *Stato delle conoscenze sulla flora vascolare d'Italia*. Palombi Editore, Roma.

- SERNARDER R., 1906. Entwurf Enier Monographie Der Europäischen Myrmekochoren. Kungl. Svensk. Ver-ternsk. *Handligar* 41: 1-410.
- SEVERNS P., 2003. Inbreeding and small population size reduce seed set in a threatened and fragmented plant species, *Lupinus sulphureus* ssp *kincaidii* Fabaceae. *Biological Conservation* 110: 221-229.
- SHA VALLI KHAN P.S., HAUSMAN J.F. & RAO K.R., 1999. Effect of agar, MS medium strength, sucrose and polyamines on in vitro rooting of *Syzygium alternifolium*. *Biologia Plantarum* 42: 333-340.
- SHRADES-FRECHETTE K. & MCCOY E.D., 1999. Molecular systematics, ethics, and biological decision making under uncertainty. *Conservation Biology* 13: 1008-1012.
- SIMABUKURO E.A., DYER A.F. & FELIPPE G.M., 1998. The effect of sterilization and storage conditions on the viability of the spores of *Cyathea delgadii*. *American Fern Journal* 882: 72-80.
- SIMABUKURO E. A., ESTEVES L. M., FELIPPE G. M., 1998. Analysis of a fern spore bank in Southeast Brazil. *Hoehnea* 25: 45-57.
- SIMABUKURO E. A., BEGOVACZ A., ESTEVES L. M., FELIPPE G. M., 1999. Fern spore bank at Pedregulho (Itirapina, São Paulo, Brazil). *Revista Brasileira de Biologia* 59(1): 131-139.
- SIMAK M., 1980. Germination and storage of *Salix caprea* L. and *Populus tremula* L. seeds. IUFRO Working party on seeds problems, *Proceedings of the International Symposium on Forest Tree Seeds Storage*, Petawawa Nat. For. Inst, Canada.
- SMITH D.L. & ROBINSON P.M., 1975. The effects of spore age on germination and gametophyte development in *Polypodium vulgare* L. *New Phytologist* 74: 101-108.
- SMITH R.D., 1995. Collecting and handling seeds in the field. In: GUARINO L., RAMANANTHA RAO V. & REID R. (EDS). *Collecting Plant Genetic Diversity. Technical guidelines*. CABI. Wallingford, Oxon. UK.
- SOIL SURVEY STAFF, 1998. *Keys to Soil Taxonomy*. 8th edition. USDA-NRCS. Washington D.C.
- SOKAL R.R., 1979. Testing statistical significance of geographical variation patterns. *Systematic Zoology* 8: 227-232.
- SOLTIS P.S. & GITZENDANNER M.A., 1999. Molecular systematics and the conservation of rare species. *Conservation Biology* 13: 471-483.
- SPERANZA A., CALZONI G.L. & PACINI E., 1997. Occurrence of mono- or disaccharides and polysaccharide reserves in mature pollen grains. *Sexual Plant Reproduction* 10: 110-115.
- STANTON B.J. & VILLAR M., 1996. Controlled reproduction of *Populus*. In: STETTLER R.F., BRADSHAW H.D., HEILMAN P.E. & HINCKLEY T.M. (EDS). *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. NRC Research Press, Ottawa, Ontario, Canada.
- STOLTON S., MAXTED N., FORD-LLOYD B., KELL S.P. & DUDLEY N., 2006. *Food Stores: Using Protected Areas to Secure Crop Genetic Diversity*. WWF Arguments for protection series. Gland, Switzerland. pp. 1-133.
- SUN M. & WONG K.C., 2001. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. *American Journal of Botany* 88: 2180-2188.
- SUSZKA B., MULLER C. & BONNET-MASIMBERT M., 1994. *Graines des feuillus forestiers, de la récolte au semis*. INRA Editions, Paris.
- SUSZKA B., CHIMIELARZ P. & WALKENHORST R., 2005. How long can seeds of Norway spruce *Picea abies* L. Karst. be stored? *Annals of Forest Science* 62: 73-78.
- TAKAGAWA S., WASHITANI I., UESUGI R. & TSUMURA Y., 2006. Influence of inbreeding depression on a lake population of *Nymphoides peltata* after restoration from the soil seed bank. *Conservation genetics* 7: 705-716.
- TALAVERA S. & MUÑOZ GARMENDIA F., 1989. Sinopsis del género *Silene* L. (Caryophyllaceae) en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 45(2): 407-460.
- TALAVERA S., GIBBS P.E. & HERRERA J., 1993. Reproductive biology of *Cistus ladanifer* Cistaceae. *Plant Systematics and Evolution* 186: 123-134.
- TALAVERA S., GIBBS P.E. & ARISTA M., 1997. Reproductive biology of *Halimium atriplicifolium* (Lam.) Spach and *H. halimifolium* (L.) Willk. (Cistaceae). *Lagascalia* 19: 571-578.

- TALLMON D.A., LUIKART G. & WAPLES R.S., 2004. The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 489-496.
- TÉBAR F.J., GIL L. & LLORENS L., 1997. Reproductive biology of *Helianthemum apenninum* (L.) Mill. and *H. caput-felis* Boiss. (Cistaceae) from Mallorca (Balearic Islands, Spain). *Acta Botanica Malacitana* 22: 53-63.
- TENNER C., 2003. Establishing Priorities for a Plant Conservation Programme. In: SMITH D., DICKIE J.B., LININGTON S.H., PRITCHARD H.W. & PROBERT R.J. (EDS). *Seed Conservation. Turning science into practice*. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 27-35.
- TERRY J., PROBERT R.J. & LININGTON S.H., 2003. Processing and Maintenance of the Millenium Seed Bank Collections. In: SMITH R.D., DICKIE J.B., LININGTON S.H., PRITCHARD H.W. & PROBERT R.J. (EDS). *Seed Conservation: turning science into practice*. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 307-325.
- THANOS C.A., GEORGHIOU K. & SKAROU F., 1989. *Glaucium flavum* seed germination: an ecophysiological approach. *Annals of Botany* 63:121-130.
- THANOS C.A., GEORGHIOU K., DOUMA D.J. & MARANGAKI C.J., 1991. Photoinhibition of seed germination in Mediterranean maritime plants. *Annals of Botany* 68: 469-475.
- THANOS C.A., GEORGHIOU K. & DELIPETROU P., 1994. Photoinhibition of seed germination in the maritime plant *Matthiola tricuspidata*. *Annals of Botany* 73: 639-644.
- THANOS C.A. & DOUSSI M.A., 1995. Ecophysiology of seed germination in endemic *Labiates* of Crete. *Israel Journal of Plant Science* 43: 227-237.
- THOMPSON K., 1986. Small-scale heterogeneity in the seed banks of an acidic grassland. *Journal of Ecology* 74: 733-738.
- THOMPSON K., 1993. Persistence in soil. In: HENDRY G.A.F. & GRIME J.P. (EDS). *Methods in Comparative Plant Ecology. A Laboratory Manual*. Chapman & Hall, The Netherlands.
- THOMPSON J.D., 2005. *Plant evolution in the Mediterranean*. New York, Oxford University Press.
- THOMPSON K., BAND S.R. & HODGSON J.G., 1993. Seed size and shape predict persistence in the soil. *Functional Ecology* 7: 236-241.
- THOMSON J.R., 1979. *Introducción a la Tecnología de las semillas*. Ed. Acribia, Zaragoza. 301 pp.
- TOKUHARA K. & MII M., 1993. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Reports* 13: 7-11.
- TOMPSETT P.B. & PRITCHARD H.W., 1998. The effect of chilling and moisture status on the germination, desiccation tolerance and longevity of *Aesculus hippocastanus* L. seed. *Annals of Botany* 82: 249-261.
- TOOLE V.K., BAILEY W.K. & TOOLE E.H., 1964. Factors influencing dormancy of peanut seeds. *Plant physiology* 39(5): 768-772.
- TORRES E., IRIONDO J.M., ESCUDERO A. & PÉREZ C., 2003. Analysis of within-population spatial genetic structure in *Antirrhinum microphyllum* Scrophulariaceae. *American Journal of Botany* 90: 1688-1695.
- TOWILL L.E. & WALTERS C., 2000. Cryopreservation of pollen. In: ENGELMANN F. & TAKAGI H. (EDS). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. JIRCAS/International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome. pp. 115-129.
- TRAVERSE A., WILLSON M.F. & SABAG C., 1998. Effect of nectar-robbing birds in fruit set of *Fuchsia magellanica* in Tierra del Fuego. *Functional Ecology* 12: 459-464.
- TSVETKOV I., JOUVE L. & HAUSMAN J.F., 2006. Effect of alginate matrix composition on regrowth of in vitro-derived encapsulated apical microcuttings of hybrid aspen. *Biologia Plantarum* 50: 722-724.
- TUOMISTO H., RUOKOLAINEN K., YLI-HALLA M., 2003. Dispersal, environment, and floristic variation of western amazonian forests. *Science* 299: 241-244.
- UESUGI R., NISHIHIRO J., TSUMURA Y. & WASHITANI I., 2007. Restoring of genetic diversity from soil seed banks in a threatened aquatic plant, *Nymphoides peltata*. *Conservation genetics* 8: 111-121.
- URAGAMI A., SAKAI A., NAGAI M. & TAKAHASHI T., 1989. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* L. cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Reports* 8: 418-421.
- URAGAMI A., SAKAI A. & MAGAI M., 1990. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown in vitro. *Plant Cell Reports* 9: 328-331.

- VANDEN BROECK A., JOCHEMS H., STORME V. & VAN LOY K., 2002. *Strategies for restoration of natural populations of Black Poplar (Populus nigra L.) along the Maas valley*. Vlaams Impulsprogramma Natuurontwikkeling. Eindrapport 0010.
- VV.AA., 2000. Lista Roja de la Flora Vasculare Española (valoración según categorías de la UICN). *Conservación Vegetal* 6 (extra): 11-38.
- VENORA G., GRILLO O., RAVALLI C. & CREMONINI R., 2007(A). Tuscany beans landraces, on-line identification from seeds inspection by image analysis and Linear Discriminant Analysis. *Agrochimica*, LI(4-5): 254-268.
- VENORA G., GRILLO O., SHAHIN M.A. & SYMONS S.J., 2007(B). Identification of Sicilian landraces and Canadian cultivars of lentil by image analysis system. *Food Research International* 40: 161-166.
- VERTUCCI C. & ROOS E.E., 1990. Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiology* 94: 1019-1023.
- VESPRINI J.L., NEPI M., CRESTI L., GUARNIERI M. & PACINI E., 2002. Changes in cytoplasmic carbohydrate content during *Helleborus* pollen presentation. *Grana* 41: 16-20.
- VIEGI L., EVANGELISTI R. & PACINI E., 2003. The achene pappi and elaiosomes of *Centaurea* L.: dispersal and germination in some Italian species. *Israel Journal of Plant Science* 51: 45-54.
- VIETTO L. & BIANCO B., 2005. *Progress on national activities on gene conservation of Black poplar (Populus nigra L.) and White poplar (Populus alba L.) in Italy*. European Forest Genetic Resources Programme (EU-FORGEN) *Populus nigra* Network. Report of the seventh (25-27 October 2001, Osijek, Croatia) and eighth (22-24 May 2003, Treppeln, Germany). (J. Koskela, S.M.G. de Vries, D. Kajba and G. von Wuelish, compilers). International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- VIETTO L. & CHIARABAGLIO P.M., 2004. Restoration of floodplain woodlands with native Poplars (*Populus nigra* and *Populus alba*): some case of study along the Po river. River Restoration 2004. Principles, Processes, Practices. *Proceedings 3rd ECRR International Conference on River Restoration in Europe*. Zagreb, Croatia, 17-21 May 2004.
- VILARNAU A. & GONZÁLEZ J., 1999. *Planteles, semilleros, viveros*. Compendios de horticultura, 13. Ediciones de Horticultura SL, Reus.
- VILCHES B., ROCA A., NARANJO J., NAVARRO B., BRAMWELL D. & CAUJAPÉ-CASTELLS J., 2002. La variación genética de *Erysimum* L. Cruciferae en Gran Canaria. *Resúmenes del 1er Congreso de la biología de la conservación de plantas*. Universitat de València.
- VILCHES B., ROCA A., NARANJO J., NAVARRO B., BRAMWELL D. & CAUJAPÉ-CASTELLS J., 2004. Estructura espacial de la variación genética de *Erysimum* L. Cruciferae en Gran Canaria: implicaciones para la conservación ex situ en bancos de germoplasma. *Botánica Macaronésica* 25: 15-30.
- VILLIERS T.A., 1974. Seed aging: chromosome stability and extended viability of seed stored fully imbibed. *Plant Physiology* 53: 875-878.
- VOLK G.M. & WALTERS C., 2003. Preservation of genetic resources in the National Plant Germplasm Clonal Collections. *Plant Breeding Reviews* 23: 291-344.
- VON BOTHMER R. & SEBERG O., 1995. Strategies for the collecting of wild species. In: GUARINO L., RAMANANTHA RAO V. & REID R. (EDS). *Collecting Plant Genetic Diversity. Technical guidelines*. CABI. Wallingford, Oxon, UK.
- WALKER L.R. & POWELL E.A., 1999. Regeneration of the Mauna Kea silverswood *Argyroxiphium sandwicense* Asteraceae in Hawaii. *Biological Conservation* 89: 61-70.
- WALTERS C., 1998. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Science Research* 8: 223-244.
- WALTERS C., 2004. Guidelines for seed storage. In: GUERRANT E., HAVENS K. & MAUNDER M. (EDS). *Ex situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild*. Island Press, Washington, DC. pp. 442-453.
- WALTERS C. & ENGELS J., 1998. The effects of storing seeds under extremely dry conditions. *Seed Science Research* 8(1): 3-8.
- WALTERS C., WHEELER L.M. & GROTENHUIS J.M., 2005. Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research* 15: 1-20.

- WAPLES R.S., 1995. Evolutionarily significant units and the conservation of biological diversity under the Endangered Species Act. In: NIELSEN J.L. (ED). *Evolution and the aquatic ecosystem: defining units in population conservation*. American Fisheries Society, Symposium 17, Bethesda, Maryland.
- WEBB C.J. & LLOYD D.G., 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. 2. Hecogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24: 163-178.
- WERKER E., 1997. *Seed Anatomy*. Encyclopedia of plant anatomy, 10. Gebr der Borntraeger, Berlin.
- WHITTIER D.P. & PINTAUD J.C., 1999. Spore Germination and Early Gametophyte Development in *Stromatopteris*. *American Fern Journal* 89: 142-146.
- WHITTIER D.P., 1973. The effect of light and other factors on spore germination in *Botrychium dissectum*. *Canadian Journal of Botany* 51: 1791-1794.
- WHITTIER D.P., 1996. Extending the viability of *Equisetum hyemale* spores. *American Fern Journal* 86: 114-118.
- WILLIAMS C., DAVIS K. & CHEYNE P., 2003. *The CBD for Botanists: An Introduction to the Convention on Biological Diversity for people working with botanical collections*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- WILSON S.M.G. & SAMUEL C.J.A., 2003. Genetic conservation of native trees. *Forest Research Annual Reports and Accounts* 2002/2003: 56-61.
- WINDHAM M.D., WOLF P.G. & RANKER T.A., 1986. Factors affecting prolonged stored spore viability in herbarium collections of three species of *Pellaea*. *American Fern Journal* 76: 141-148.
- WITHERS L.A. & KING P.J., 1980. A simple freezing unit and routine cryopreservation method for plant cell cultures. *Cryo Letters* 1: 213-220.
- WITT S., 1985. *Biotechnology and Genetic Diversity*. California Agricultural Lands Project, San Francisco. 145 pp.
- WOLF P.G., SCHNEIDER H., RANKER T.A., 2001. Geographic distributions of homosporous ferns: does dispersal obscure evidence of vicariance? *Journal of Biogeography* 28(2): 263-270.
- WOLFE J. & BRYANT G., 2001. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration* 24: 438-450.
- WOOD C.B., PRITCHARD H.W. & MILLER A.P., 2000. Simultaneous preservation of orchid seed and its fungal symbiont using encapsulation-dehydration is dependent on moisture content and storage temperature. *CryoLetters* 21: 125-136.
- WRIGHT S., 1922. Coefficients of inbreeding and relationship. *American Naturalist* 56: 330-338.
- WRIGHT S., 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics* 15: 323-353.
- WYSE JACKSON P.S. & SUTHERLAND L.A., 2000. *Agenda Internacional para la Conservación en Jardines Botánicos*. Organización Internacional para la Conservación en Jardines Botánicos (BGCI), U.K.
- XIURONG Z., YINGZHONG Z., YONG C., XIANGYUN F., QINGYUAN G., MINGDE Z. & HODGKIN T., 2000. Establishment of sesame germplasm core collection in China. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47: 273-279.
- YAWEN Z., SHIQUAN S., ZICHAO L., ZHONGYI Y., XIANGKUN W., HONGLIAN Z. & GUOSONG W., 2003. Ecogeographic and genetic diversity based on morphological characters of indigenous rice *Oryza sativa* L. in Yunan, China. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 567-577.
- YOSHIMATSU K., TOUNO K. & SHIMOMURA K., 2000. Cryopreservation of medicinal plant resources: retention of biosynthetic capabilities in transformed cultures. In: ENGELMANN F. & TAKAGI H. (ED). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. JIRCAS/International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome. pp. 77-88.
- YOUNG J.A. & YOUNG C.G., 1992. *Seeds of woody plants in North America*. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- ZORO B.I., MAQUET A., DEGREEF J., WATHELET B. & BAUDOIN J.P., 1998. Sample size collecting seeds in germplasm conservation: the case of Lima bean *Phaseolus lunatus* L. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 187-194.
- ZOUROS E. & FOLTZ D.W., 1987. The use of allelic isozyme variation for the study of heterosis. *Isozymes* 13: 1-59.

Glosario

Se definen aquí gran parte de los términos técnicos empleados en el texto, además de otros comúnmente utilizados en el desarrollo de las actividades de conservación *ex situ*. Gran parte de las definiciones proceden de la base de datos del proyecto GENMEDOC (www.genmedoc.org), si bien en algunos casos han sido corregidas o simplificadas por los autores.

Abcisión	Proceso de separación que ocurre en zonas particulares de la planta llamadas zonas de abscisión y que provoca la caída de las hojas, flores o frutos.
Accesión	Cada entrada en el banco de uno o más lotes de germoplasma relativos a una única recolección, para un único taxón, y una determinada población; generalmente identificada con un código alfanumérico unívoco.
Acolchado	Cobertura del terreno, después de la siembra o trasplante, realizado para protegerlo del frío intenso, aumentando la temperatura y limitando la evaporación, para proteger o acelerar el crecimiento. Puede practicarse con paja, hojarasca, corteza, etc.
Afilia	Ausencia total de hojas o pérdida precoz de las mismas. La fotosíntesis se completa a través de tallos jóvenes aún verdes. Característica de numerosas especies de Fabaceae arbóreas y arbustivas típicas de la vegetación mediterránea (ej. <i>Genista sp. pl.</i>).
Agamia	Tipo de reproducción asexual que se produce sin la unión de gametos. Los organismos producidos presentan un código genético idéntico al del parental materno. Ver "Propagación vegetativa o agámica".
Agamospermia	Proceso apomítico mediante el cual se forman semillas sin fusión de gametos.
Ahumado	Pretratamiento que previene la exposición al humo o la utilización de soluciones acuosas de sustancias que se desprenden durante los incendios, para interrumpir la dormición de las semillas de algunos taxones espontáneos de áreas propensas a incendios.
Albumen	Tejido parenquimático rico en sustancias de reserva presente en la semilla de las angiospermas y derivada de la cariogamia entre uno de los núcleos espermáticos y núcleos centrales del saco embrional. Cuando sus reservas están totalmente consumidas por el embrión durante la maduración de la semilla, este se denomina "exoalbuminado" (ej. Fabaceae). Si el albumen está aún presente una vez terminada la maduración, y no ha sido utilizado por el embrión durante la germinación, la semilla se llama "albuminada" (ej. Poaceae). Sinónimo de endospermo secundario.
Albuminado	Ver "Albumen"
Alelopatía	Es la capacidad de algunas sustancias de provocar efectos inhibidores en algunos procesos biológicos, entre ellos, la germinación de las semillas.
Alóctono	Táxon que forma parte de la flora de un territorio, pero no es autóctono.
Alogamia	Polinización cruzada, realizada por gametos pertenecientes a flores o individuos diversos.
Alógeno	Taxón extraño a la flora autóctona de un territorio.

Análisis de imágenes	Proceso de análisis y cuantificación de imágenes, generalmente a través de software específico.
Androceo	Aparato reproductor masculino de las flores de las angiospermas, constituido por uno o más estambres.
Anemocoria	Proceso de dispersión de los frutos, semillas o esporas a través del viento. Es uno de los mecanismos de diseminación más difundido entre los vegetales superiores.
Anfimixis	Reproducción sexual por fusión de dos núcleos germinales.
Angiosperma	División de las espermatófitas que agrupa plantas con óvulos contenidos en el ovario.
Antera	Parte fértil de los estambres, continuación del filamento, constituida por dos o más sacos polínicos, en cuyo interior se encuentra el polen.
Antesis	Fase fenológica que corresponde a la apertura del capullo floral.
Apocárpico	Gineceo con los carpelos no soldados entre ellos.
Apomixis	Desarrollo del embrión sin fecundación previa.
Aquenio	Fruto seco, indehiscente. Deriva de un ovario súpero monocárpico, conteniendo una única semilla no soldada al pericarpo (ej. <i>Ranunculus</i>). En las Asteraceae que tienen el ovario ínfero, el fruto es una cipsela.
Área homogénea	Área uniforme desde el punto de vista de los factores ambientales, en cuyo interior se pueden efectuar los muestreos para la recolección de germoplasma.
Areal	Relativo al área geográfica o distribución general de una especie. El areal de una especie puede ser unitaria o dividida por efectos de factores biológicos intrínsecos a la especie, geográficos, ecológicos e históricos.
Arilo	Cubierta de diversa naturaleza y consistencia, formada por estructuras no ovulares, que en la madurez envuelve completa o parcialmente la semilla de algunas gimnospermas (ej. <i>Taxus sp. pl.</i>).
Asociación	Representa la unidad fundamental de la fitosociología. Es un concepto abstracto de comunidad vegetal, que presenta iguales características florísticas, ecológicas, dinámicas, corológicas y singenéticas.
Autocoria	Diseminación realizada sin la ayuda de agentes externos a la planta. Es sinónimo de auto-diseminación.
Autóctono	Planta indígena de un determinado territorio; contrario de "alóctono".
Autodiseminación	Ver "Autocoria".
Autopolinización	Proceso de fecundación en el que el ovario se fecunda por el polen procedente de la misma flor.
Autótrofo	Organismo capaz de sintetizar sustancias orgánicas a partir de moléculas inorgánicas.
Axonomorfa	Raíz principal dividida. Tiene origen en el cuello, en oposición al tallo, y tiene un desarrollo prevalente sobre las otras raíces secundarias.
Banco de semillas del suelo	Persistencia en el suelo de un lugar determinado de diásporas (semillas y esporas) que permiten la regeneración natural de especies vegetales cuando las condiciones ambientales son favorables.
Banco de genes	Instalación destinada a la conservación <i>ex situ</i> de material genético, generalmente ADN.

Banco de germoplasma	Instalación en la que se conservan diversas tipologías de accesiones vitales, tanto de especies vegetales como de animales. Estas accesiones pueden estar constituidas por genes, semillas, esporas, polen, tejidos vitales o partes de vegetales como bulbos, rizomas, etc.
Banco de semillas	Instalación concebida para la conservación y almacenamiento <i>ex situ</i> de semillas.
Baya	Fruto indehisciente, totalmente carnoso, sin distinción entre mesocarpo y endocarpo. Se origina de un ovario súpero.
Bilocular	Estructura constituida por dos lóculos o cavidades.
Biocenosis	Conjunto de especies (animales o vegetales) de un territorio determinado que interactúan entre sí y están en equilibrio con el ambiente.
Bioclima	Representa la unidad base en la clasificación bioclimática de la Tierra. Se trata de un espacio biofísico delimitado por determinadas tipologías de vegetación, en relación con los correspondientes valores climáticos. Actualmente se reconocen 27 tipos de bioclimas.
Biodiversidad	Concepto introducido por W.G. Rosen en 1988, y que comprende al conjunto y a la variabilidad de todos los organismos vivos de cualquier origen y naturaleza que se encuentran sobre la Tierra.
Biología de la conservación	Ciencia multidisciplinar que tiene como objetivo conocer y definir las pautas que permitan mantener el mayor grado de diversidad biológica posible, entendida ésta desde las moléculas ribonucleicas hasta los más complejos ecosistemas funcionales.
Bosque de semillas	Población de árboles con características fenotípicas medianamente superiores a aquellas de otras poblaciones vegetales, en condiciones similares. Empleado para la recolección de semillas en un área forestal seleccionada o controlada. Se trata de un concepto en desuso desde la aplicación de los conceptos modernos de genética de poblaciones.
Bráctea	Hoja transformada y a menudo reducida, idónea para funciones particulares (ej. funciones de protección, de reserva, señalización, etc.).
Brinzal	Árbol joven procedente de semilla, de pocos metros de altura y menos de ocho o diez centímetros de diámetro a la altura del pecho, que crece vigorosamente.
Brote	Porción epigea de una planta vascular, constituida de tallo y hojas en las primeras fases de desarrollo a partir de una semilla o de una yema.
Bulbillo	Yemas similares a los bulbos en la forma, destinados a la multiplicación vegetativa (ej. <i>Allium sp.pl.</i> , <i>Cardamine bulbifera</i> (L.) Crantz., <i>Lilium bulbiferum</i> L., <i>Ornithogalum bulbiferum</i> L. ex Jackson, <i>Saxifraga bulbifera</i> L., etc.).
Bulbo	Tallo corto hipógeo rodeado de hojas con forma de escamas carnosas y engrosadas (catafilos). Según la morfología de los catafilos los bulbos se dividen en tunicados, si lo rodean totalmente de forma concéntrica (ej. <i>Allium cepa</i> L.), y escamosos, si constituyen elementos diferenciados, escumiformes e imbricados (ej. <i>Lilium sp.pl.</i>),
Caducifolia	Planta arbórea o arbustiva que pierde las hojas estacionalmente, generalmente al inicio de la estación desfavorable (fría o seca).
Cámara de crecimiento	Incubadora utilizada para estudios relativos a la biología reproductiva y en particular de la germinación, que permite disponer diversos valores de termoperiodo y fotoperiodo, y en ocasiones humedad.

Capacidad de recuperación ecológica	Capacidad de un sistema que sufre un impacto negativo inesperado (ej. incendio o tala de un bosque) de reestablecer el equilibrio homeostático. Esta capacidad refleja las posibilidades que el sistema tiene de volver a niveles de calidad aceptables después de una perturbación.
Capacidad germinativa	Porcentaje de semillas capaces de germinar en condiciones bien definidas. Corresponde a la germinación máxima de un lote, también llamada "facultad germinativa".
Cápsula	Fruto seco dehiscente, bi- o pluricarpelar, a menudo capaz de facilitar la dispersión de las semillas a distancia. Según el tipo de dehiscencia las cápsulas adoptan nombres diversos (ej. poricida, loculicida, septicida, etc.).
Cariología	Parte de la citología que estudia el núcleo de las células, en particular los cromosomas.
Cariópside	Fruto seco indehiscente, costituido por un único carpelo, que contiene una única semilla estrechamente adherente al pericarpo (ej. Poaceae).
Carpelo	Hoja transformada que compone el gineceo de las plantas con flores.
Carúncula	Pequeño cuerpo carnoso, de forma y espesor variable, que aparece en algunas semillas, en particular en las Euphorbiaceae (ej. <i>Jatropha</i> , <i>Ricinus</i>), especializado para la dispersión entomócora.
Catafilo	Hoja transformada, sésil, carente de clorofila, de consistencia carnosa o pergaminosa, que tiene función protectora, envolvente y de reserva.
Categoría de semillas	Las semillas se clasifican en ortodoxas, intermedias y recalcitrantes según su capacidad de tolerar la deshidratación (también a niveles más bajos que aquellos que se alcanzan en condiciones naturales) y con base a su conservación <i>ex situ</i> .
Ciclo vegetativo	Conjunto de las fases de desarrollo de un vegetal, que puede incluir un período de latencia o dormición.
Cicofisis	Representa el complejo proceso de maduración ontogenética y fisiológica de los ápices meristemáticos.
Cipsela	Fruto seco indehiscente de las Asteraceae, originado de un ovario bicarpelar monospermo ínfero, a menudo provisto de un vilano o de una carúncula en el ápice.
Cleistogamia	Facultad de una flor de autofecundarse y de producir semillas fértiles sin abrirse (ej. Orchidaceae).
Clímax	Máximo estadio evolutivo de la vegetación de un territorio dado, estrechamente relacionado con las condiciones ambientales (edáficas, climáticas, etc.).
Clones	Grupo de individuos (ramets o plantlets), originados de una sola muestra ("ortet") y mantenidos en cultivo mediante propagación vegetativa (injerto, estaca, estolón, vástago radical o cultivo in vitro de tejidos de cualquier tipo). Todas las muestras de un clon son genéticamente idénticas al original.
Coherencia	Grado de cohesión del substrato edáfico y, en particular, de los horizontes más superficiales.
Colección a largo plazo	Parte de los lotes contenidos en un banco destinados a la conservación a largo plazo mediante crioconservación, congelación y/o deshidratación.
Colección activa	Parte de los lotes contenidos en un banco destinados a la utilización en un plazo breve, generalmente almacenados a temperaturas de entre 0°C y 5°C.

Colorimetría	Medida cuantitativa del color. Sector de la física que tiene por objeto la determinación de magnitudes relativas al color y a su medición unívoca. Se basa en la posibilidad de lograr reproducir cualquier color a partir de una oportuna mezcla de tres colores primarios (RGB).
Comensalismo	Asociación entre dos especies que produce beneficios a una de ellas (comensal), mientras la otra no se ve afectada ni positiva ni negativamente.
Competencia	En botánica representa el conjunto de las acciones recíprocas entre las plantas de un territorio dado, en función de variables como luz, agua, nutrientes, etc. En ecología constituye la manifestación de antagonismo entre individuos o poblaciones del mismo nivel trófico (intra- o interespecífica).
Conductividad (prueba de)	Ensayo que evalúa la integridad de los tejidos y membranas celulares, por tanto indirectamente la calidad de la semilla. La semilla con membranas dañadas, sometida a imbibición, sufre una pérdida de contenidos celulares (iones carbohidratos, etc.) que condiciona los valores de conductividad eléctrica.
Congelación	Almacenamiento a temperaturas por debajo de 0 °C, a menudo entre -10 y -25°C.
Conservación <i>ex situ</i>	Estrategias adoptadas con el fin de la conservación de la diversidad genética y de los organismos fuera de los ámbitos naturales en los que éstos se encuentran.
Conservación <i>in situ</i>	Estrategias adoptadas para favorecer la recuperación o la salvaguarda en la naturaleza, de la diversidad genética, de los organismos y de los ecosistemas.
Contenido de humedad (mc%)	Referido a las semillas, es la cantidad de agua contenida en ellas, expresada en porcentaje, respecto al peso fresco de la muestra.
Convergencia ecológica	Caso en el que especies animales o vegetales no afines que ocupan el mismo nicho ecológico en hábitats similares, desarrollan formas o comportamientos similares.
Cotiledón	Lóbulo carnoso o foliáceo primordial contenido en el embrión que se inserta en el eje hipocótilo de la plántula en la semilla, y que suele tener una función de reserva. Las plantas con flores (angiospermas), se dividen en dos subclases según si la semilla lleva uno (monocotiledonias) o dos (dicotiledonias) cotiledones. Las gimnospermas tienen dos o más cotiledones.
Crioconservación	Conservación de cualquier material biológico realizada a temperaturas muy por debajo del punto de congelación y frecuentemente a la temperatura del nitrógeno líquido (-196°C) o sus vapores (-150°C).
Criovial	Contenedor, generalmente de polipropileno, apropiado para la crioconservación del material biológico en nitrógeno líquido a -196°C.
Criptógama	Término sin valor taxonómico que hace referencia a las plantas de "fructificación oculta", es decir, privadas de flores y que se reproducen mediante esporas (ej. pteridófitos y briófitos).
Cuarentena	Periodo de seguridad durante el cual los lotes destinados al banco se almacenan en locales reservados y separados del mismo, con el fin de evaluar la presencia de parásitos o de eventuales patologías (ej. micosis).
Cultivar	Conjunto de plantas cultivadas que representan una variedad de interés agronómico y se distinguen por algunos caracteres comunes (de forma, de función orgánica, química), y que, cuando se reproducen de forma sexual, conservan sus características distintivas.
Chilling	Ver "Estratificación fría".
Dehiscente	Fruto que se abre espontáneamente en la madurez liberando sus semillas.
Demografía	Estudio de los fenómenos relativos a la población en sus aspectos estático y dinámico.

Densidad de población	Número de individuos por unidad de superficie.
Desaladura	Eliminación de las alas, estructuras que forman parte de algunos tipos de semillas (ej. <i>Cedrus</i> , <i>Pinus</i> , <i>Abies</i>).
Desecación	Proceso de duración variable, que puede ocurrir de forma natural o artificial (estufas, hornos o desecantes químicos). Se someten a desecación muestras vegetales muertas (ej. pliegos de herbario, plantas medicinales) y vivas (semillas ortodoxas).
Desecamiento	Pérdida de líquido en un organismo o parte de él.
Desecantes artificiales	Productos capaces de absorber el agua disponible en un ambiente y/o contenedor (ej. gel de sílice).
Deshidratación	Proceso de eliminación progresiva, parcial o total, del agua contenida en un órgano o estructura.
Diacetato de fluoresceína	Sustancia utilizada para realizar ensayos colorimétricos y estimar la vitalidad de las semillas. Dentro de las células vitales que poseen membranas íntegras la enzima estrasa transforma el diacetato de fluoresceína en un producto fluorescente.
Diáspora	Unidad biológico-funcional de dispersión capaz de generar un nuevo individuo (propágulos, bulbillos, futos, semillas, etc.).
Diclina	Flor caracterizada por la presencia sólo del androceo o de gineceo, sinonimo de unisexual cuando se trata de flores, sin prejuizar si la planta es monoica o dioica. Cuando existe diclina la polinización tiene que ser necesariamente alogama o hibridógama.
Dicotiledónea	Que tiene dos cotiledones. Término genérico para indicar cualquier miembro de la clase de las Magnoliopsida que forma parte del filo de las Magnoliophyta, caracterizadas por tener un embrión con dos cotiledones.
Diferenciación	Transformación de células embrionarias en células especializadas.
Dioico	Taxón representado por individuos con sexos separados. (ej. <i>Juniperus sp.pl.</i>).
Diplocoria	Proceso de diseminación que se desarrolla en dos fases distintas a través de diversos vectores.
Diploide	Célula que tiene dos juegos de cromosomas (2n).
Diseminación	Dispersión natural de las semillas, y en general, de frutos, esporas u otros propágulos producto de multiplicación asexual o vegetativa.
Dispersión	Transferencia o movimiento de un área a otra de semillas, frutos u otros propágulos. Representa el proceso a través del cual una especie se expande y coloniza nuevos hábitats.
Dormición	Estado fisiológico, debido a causas físicas y/o fisiológicas intrínsecas, que impide la germinación incluso en condiciones ambientales favorables. Es una característica controlada genética o fisiológicamente, que interactúa de varias formas con los factores ambientales.
Drenaje	Grado de permeabilidad del sustrato edáfico y/o litológico.
Drupa	Fruto carnoso uní o pluricarpelar con endocarpo leñoso (<i>Corylus avellana</i> L.) que contiene la semilla y el mesocarpo carnoso.
Duplicación de las colecciones	Réplica de las colecciones en el interior de diversas estructuras de una misma institución o en instituciones diferentes, a fin de asegurar una correcta conservación <i>ex situ</i> de las accesiones en caso de graves daños, incidentes o catástrofes..

Ecosistema	Conjunto de hábitats presentes en un territorio geográfico limitado y definido, dentro del cual se verifican similares condiciones morfológicas, litoestratigráficas, edáficas, bioclimáticas y bióticas.
Ecotipo	Población vegetal o animal que se caracteriza por la adaptación a particulares condiciones ecológicas; en los vegetales esencialmente de tipo edafoclimáticas.
Ecotono	Zona de paso entre una cenosis y otra (ej. el borde de un bosque es el paso de este último a una cenosis abierta de tipo generalmente herbáceo).
Eleosoma	Apéndice de las semillas de algunos frutos secos, que no está implicado en la germinación y cuya función principal es la de atraer a los animales dispersantes (generalmente hormigas, a veces pájaros), que encuentran en él una recompensa comestible (ej. <i>Helleborus foetidus</i> o <i>Rosmarinus officinalis</i>).
Embrión	Organismo en fase de desarrollo y que se origina a continuación de un proceso gámico que tiene lugar en el interior de la semilla en los espermatófitos, o que se desarrolla sobre el gametofito de los pteridofitos.
Endemismo	Cauquiera taxón (familia, género, especie, etc.) que por un fenómeno de estenocoria de diverso origen, se encuentra restringido a un área de distribución dada.
Endosperma primario	Tejido de reserva haploide contenido en las semillas de las gimnospermas, que se origina por proliferación del gametofito femenino después del proceso gámico.
Endosperma secundario	Tejido de reserva normalmente triploide contenido en las semillas de las angiospermas, originado a continuación del proceso de doble fecundación.
Endozoocoria	Proceso de diseminación llevado a cabo por los animales que consiste en la ingestión de la diáspora y su posterior expulsión con las heces.
Entomofilia	Polinización realizada por insectos prónubos.
Envero	Momento en el que el fruto empieza a tomar el color definitivo de la maduración.
Epicarpo	Parte más superficial del pericarpo del fruto, generalmente membranosa y fina (piel).
Epicótilo	Porción de la placa embrional o de la plántula situada entre los cotiledones y la primera hoja verdadera, destinada a formar el tallo.
Epidermis	Tejido tegumental que reviste las porciones o los órganos jóvenes, es decir, primarios, de una planta.
Epífito	Vegetales autótrofos que viven sobre plantas de mayores dimensiones utilizándolas como soporte o para el propio sustento (ej. <i>Smilax aspera</i> L.), y que generalmente no producen daños aparentes.
Epizoocoria	Diseminación zoócora de semillas y esporas que se realiza externamente al cuerpo de los animales.
Escapo floral	Eje florífero alargado, foliado o privado de hoja, que sale directamente de una estructura vegetativa epígea de reserva (como en muchas Liliaceae) o de las raíces (terófitas) y lleva en el ápice una flor o una inflorescencia.

Escarificación	Pretratamiento que produce abrasión o incisión del tegumento seminal con medios mecánicos, físicos o químicos, para favorecer la absorción de agua y el intercambio de gases, permitiendo eliminar las inhibiciones tegumentarias a la germinación. La escarificación física se efectúa generalmente mediante inmersión en agua caliente, mientras que en la química las semillas son sumergidas en un ácido (o base) fuerte. La escarificación mecánica se realiza de forma manual (erosionando la superficie con papel de lija, o raspando con una herramienta) o mecánica.
Esciófila	Especie vegetal capaz de tolerar o preferir condiciones de escasa iluminación (ej especies que habitan lugares sombríos).
Esclerófila	Planta con hojas ricas en tejidos esclerenquimáticos, por tanto endurecidas y con escaso contenido en agua.
Espermatófito	Planta vascular que se reproduce y se difunde por medio de semillas.
Espora	Célula reproductiva vegetativa con paredes espesas, que puede derivar de un proceso de meiosis (meiosporas) o de mitosis (mitosporas).
Esqueje	Porción de rama o de raíz usada para propagar vegetativamente la planta.
Esquizocarpo	Fruto seco indehiscente que se divide en la madurez en diversos mericarpos (ej. diaquenio de las Apiaceae).
Estación	Localidad caracterizada por medio de parámetros físicos y geográficos en la cual se ha realizado la recolección de material vegetal. Según las dimensiones de la estación se pueden definir también macroestaciones y microestaciones.
Estambre	Estructura reproductiva masculina de la flor de las angiospermas, compuesta por la antera, que contiene el polen, y por el filamento.
Estado fitosanitario	Condiciones en que se encuentra un órgano o una planta entera en relación a la contaminación o al ataque por parte de microorganismos patógenos.
Estigma	Parte superior del carpelo, en general extendida, destinada a la captura del polen.
Estilo	Estructura cilíndrica y fina de conexión entre el estigma y el ovario.
Estivación	Ver "Estratificación caliente".
Estocaje	Indica el almacenamiento y la conservación a condiciones y parámetros ambientales definidos de estructuras vegetales y semillas, en condiciones idóneas para mantener el mayor tiempo posible sus características iniciales.
Estolones	Rebotes laterales aéreos o subterráneos con entrenudos muy alargados y hojas reducidas que enraízan a cierta distancia de la planta madre y que, después de la muerte del fragmento intermedio, se desarrollan como individuos autónomos.
Estratificación	Procedimiento o pretratamiento consistente en la disposición de semillas en capas, sobre uno o varios sustratos mullidos y húmedos (generalmente turba, agriperlita, arena o vermiculita), con el objetivo fundamental de eliminar la dormición. La estratificación a bajas temperaturas (generalmente entre +2°C y 5°C) se denomina estratificación fría, vernalización o <i>chilling</i> , mientras que en condiciones más cálidas (generalmente en torno a +20°C) se denomina estratificación caliente, estivación o <i>warming</i> .

Estratificación sin substrato	Estratificación de la semilla en contenedores, generalmente después de inmersión en agua durante 24-48 horas y tras pasar un proceso de escurrido. En ocasiones la semilla se guarda en sacos de plástico, no cerrados herméticamente para permitir el intercambio gaseoso, y en un ambiente térmicamente controlado (ej. frigorífico). Este tipo de estratificación permite ahorrar espacio y tiempo en las operaciones manuales, en los casos en que se trabaja con lotes grandes de semillas.
Estróbilo	Estructura reproductiva típica de las gimnospermas, constituida por el conjunto de micro o macrosporófilos o escamas fértiles dispuestas sobre un eje alargado. Se llama también cono o piña.
Estróbilo serótino	Piña madura, con semilla viable, que permanece sin abrir en el árbol durante un cierto tiempo; este rasgo está considerado como una adaptación a los incendios recurrentes.
Estrofiolo	Parte carnosa de la semilla que deriva del funículo.
Etiolado	Relativo al crecimiento de plantas con menor cantidad de luz de la que necesitan; se caracterizan por su consistencia débil y color verde pálido.
Exoalbuminado	Ver "Albumen".
Facultad germinativa	Germinación máxima de un lote de semillas (llamada también "capacidad germinativa"). Se define como el porcentaje de semillas que germinan en unas condiciones particulares, dentro de un período de tiempo determinado. El vocablo germinabilidad puede ser empleado como sinónimo.
Fecundación	Fusión de dos gametos con formación de un cigoto.
Fenología	Rama de la ecología que estudia las relaciones entre los factores climáticos (humedad, temperatura, fotoperiodo) y la manifestación estacional de algunos fenómenos de la vida vegetal (brotación, floración, maduración de los frutos, pérdida de las hojas).
Fenotipo	Conjunto de los caracteres morfológicos que podemos observar en un individuo y que resultan de la más o menos compleja interrelación entre los factores ambientales y los del genotipo.
Fermentación anaeróbica	Proceso biológico de producción de energía química en ausencia de oxígeno.
Fitocenosis	Ver "Asociación".
Folículo	Fruto seco dehiscente que se origina de un solo carpelo y que en la madurez se abre correspondiendo con la línea de sutura del limbo.
Forma biológica	Categoría de respuesta de las plantas superiores en la estación adversa, con base a la localización de las yemas y de su distancia al suelo.
Formaldehído	Compuesto (químicamente: aldehído fórmico) entre los más utilizados, en solución diluida, para la conservación a largo plazo de muestras biológicas.
Formazan	Compuesto nitrogenado teñido, insoluble en agua y derivado de la reducción de una sal de tetrazolio. Se utiliza para verificar en los tejidos vegetales la actividad de los enzimas oxidantes.
Fotoperiodo	Duración del periodo de iluminación diaria, factor que influye sobre la fisiología de las plantas y, en particular, sobre la germinación.

Fruto	Órgano vegetal que se forma después de la fecundación por modificación estructural del ovario maduro que encierra las semillas. Definido como “verdadero” cuando deriva exclusivamente de los carpelos de una flor fecundada (en particular de la región del ovario) y “falso” cuando proviene en origen de partes de la flor o de la inflorescencia accesorias como el receptáculo.
Funículo	Filamento constituido por un lazo conductor envuelto por parénquima que empieza en la placenta y termina en la base de la nucela del óvulo de las angiospermas con la finalidad de favorecer la nutrición.
Gábullo	Estróbilo redondeado típico de algunas Cupressaceae (ej. <i>Juniperus sp.pl.</i>) constituido en su mayor parte por escamas que, soldadas en el origen, se separan y se abren, favoreciendo la dispersión de las semillas.
Gametófito	Generación con número cromosómico haploide (n) que produce gametos en las espermatófitas. El gametófito masculino tiene su origen por mitosis de la microspora producida en los sacos polínicos (grano polínico), el gametófito femenino tiene su origen por mitosis de la megaspóra.
Gametos	Células sexuales masculinas o femeninas que en los animales y en las plantas se fusionan durante el proceso de anfimixis para formar el cigoto (ver “Anfimixis”).
Gamia	Referido a la fusión de dos gametos (ver “Propagación sexual o gámica”).
Gel de sílice	Sustancia amorfa, incolora y porosa, capaz de absorber agua y otras sustancias, por lo que se utiliza como deshidratante y decolorante.
Genotipo	Individuo genéticamente distinguible (con genes o caracteres que lo distinguen de otros). Un genotipo es también la manifestación de un alelo diverso del mismo gen o carácter (ej. la cerosidad de una planta de trigo está dominada por un único locus génico que posee diversas formas alélicas; la manifestación de las distintas formas alélicas constituye uno de los posibles genotipos que son idénticos por todos sus genes, a excepción de un solo alelo).
Geófito	Planta perenne con órganos hipógeos (ej. bulbos o rizomas) sobre los cuales se encuentran las yemas.
Germinabilidad	En sentido general representa la capacidad de germinar. Se usa comúnmente como sinónimo de “facultad germinativa” o capacidad germinativa.
Germinación	Proceso fisiológico que corresponde a la reanudación del crecimiento activo del embrión contenido en la semilla, y que se manifiesta con la emisión de la radícula. El proceso germinativo está constituido por tres fases: durante la primera se produce la absorción de agua; durante la segunda, considerada la más importante, las reservas se hidrolizan y se inicia la síntesis enzimática que posibilita el sustento y desarrollo de la plántula; la tercera fase se inicia con la emisión de la radícula. La germinación puede considerarse acabada cuando la plántula ha producido una superficie fotosintética suficiente para poder proveer a la joven plántula de carbohidratos.
Germinación epígea	Germinación en la cual los cotiledones son transportados sobre la superficie del terreno por el alargamiento del hipocotilo.
Germinación hipogea	Germinación en la que los cotiledones permanecen en la semilla por debajo de la superficie del suelo mientras el hipocótilo se alarga.

Germoplasma	Normalmente se entiende como tal toda la información genética presente en el efectivo de un taxón (suma total de los genes y de los factores citoplasmáticos que dominan en la herencia). Aplicable también a ecotipos particulares, razas, clones o variedades. En sentido amplio, constituye el complejo hereditario transmitido de una generación a otra. En términos de conservación <i>ex situ</i> , el término germoplasma suele restringirse a todo aquel material capaz de regenerar por sí mismo uno o más individuos.
Giberelinas	Hormonas vegetales que estimulan el crecimiento y la germinación permitiendo en ciertas condiciones eliminar la dormición de algunas semillas.
Gimnosperma	Espermatófitas con aparatos reproductores unisexuales, provistas de semillas desnudas no recluidas en el interior de un carpelo, equipadas con escamas u hojas especializadas en estróbilos.
Gineceo	Órgano reproductor femenino formado por el pistilo, y que ocupa el verticilo más interno de la flor.
Glicerina	Polialcohol utilizado para conservar y estabilizar material biológico fresco.
Grano polínico	Elemento reproductor masculino de las espermatófitas, inicialmente correspondiente a una micróspora que tiene la función de transportar el gametófito masculino a la proximidad del gametófito femenino (ver "Polen").
Hábitat	Espacio ecológico que permite la vida de uno o más organismos y/o de una biocenosis, caracterizado por propiedades físicas y bióticas determinadas.
Halófito	Planta que vive en terrenos ricos en sal. Su adaptación se debe a determinados procesos fisiológicos, como la acumulación de sales en los núcleos celulares, el aumento de la presión osmótica, o la eliminación de las sales a través de estructuras particulares de la epidermis, entre otras adaptaciones posibles.
Haploide	Célula que tiene el número de cromosomas reducido a un juego (n).
Heliófilo	Planta con preferencia por la irradiación elevada y directa del sol (=fotófila).
Herbívoro	Organismo animal que se nutre de plantas.
Hermafrodita	Flor bisexual, que presenta tanto las estructura reproductivas masculinas como las femeninas.
Hibridación	Cruce entre dos individuos pertenecientes a taxones genéticamente diferentes.
Híbrido	Individuo formado por la fusión entre gametos pertenecientes a taxones diferentes.
Hidrocoria	Diseminación a través del agua de frutos, semillas y de todas las diásporas en general.
Hidrófito	Planta acuática generalmente con yemas sumergidas durante la estación desfavorable. Puede estar más o menos enraizada al sustrato, si bien las emergentes y sumergidas están siempre fijadas al sustrato, y las flotantes pueden estar desvinculadas de él.
Higroscópico	Que tiene la tendencia de absorber agua o humedad.
Hilo	Cicatriz presente sobre la semilla después de su separación del funículo.
Hipocótilo	Eje embrionario que conecta la radícula con los cotiledones.

HLS	Modelo que se corresponde con las cualidades HLS (<i>Hue, Luminance, Saturation</i>) de tonalidad, luminosidad y saturación para la caracterización colorimétrica de una muestra. La tonalidad indica el tipo de color, la saturación describe la pureza de la tinta, y la luminosidad se refiere a la intensidad de la luz (una mayor luminosidad se corresponde con una mayor aproximación al blanco).
Humedad relativa	Expresada en porcentaje, se define como la relación entre el peso del vapor de agua contenido en un Kg de materia y el peso del vapor de agua contenido en un Kg de materia saturada a una temperatura dada.
Imbibición	Absorción de agua líquida por parte de la semilla. Fenómeno de naturaleza física precedente a la germinación.
Incubadora	Instrumento utilizado en las pruebas de germinación que permite evaluar la respuesta a temperaturas constantes y generalmente a la oscuridad.
Indehiscente	Se dice de un fruto que en la madurez no se abre para liberar sus semillas.
Index Seminum	Listado de las semillas de un jardín botánico o de un banco de germoplasma disponibles para intercambio <i>pro mutua commutatione</i> con otras instituciones, siempre con finalidades científicas sin fines de lucro.
Indigo-Carmín	Compuesto químico que permite realizar un test colorimétrico indicador de la vitalidad de las semillas. Las partes sanas no se colorean, los tejidos muertos se colorean en azul.
Individuo	Entidad biológica caracterizada por un patrimonio genético específico, físicamente independiente y capaz de llevar vida autónoma.
Inflorescencia	Conjunto de flores dispuestas en una estructura común (ej. corimbo, umbela, racimo, etc.).
Infrutescencia	Conjunto de frutos dispuestos en una única estructura originada de una inflorescencia compacta, en número variable, sobre un eje principal simple o ramificado.
Inquilinismo	Particular tipo de simbiosis en la que una especie animal convive con una especie diversa ocupando un espacio común.
Insolación relativa	Indica la relación entre las horas efectivas de exposición al sol y aquellas que serían posibles en el mismo lugar, prescindiendo de los obstáculos y de las condiciones de exposición e inclinación.
Lavado de la semilla para interrumpir la dormición	Pretratamiento consistente en un lavado durante varias horas en agua u otro líquido a una determinada temperatura, con el objetivo de eliminar eventuales inhibidores de la germinación presentes en la semilla.
Legumbre	Fruto seco dehiscente monocarpelar que se abre a través de dos fisuras longitudinales, una correspondiente a la zona de soldadura de los bordes carpelares y la otra, a la nervadura del carpelo (ej. Fabaceae).
Loculicida	Fruto dehiscente que se abre por las fisuras que corresponden a la línea dorsal media de cada carpelo.
Lóculo	Cada una de las cavidades en que se divide una estructura compartimentada.
Locus génico	En la cadena de ADN, indica la posición en la que se presenta un determinado gen.
Lote	Cantidad de germoplasma de calidad razonablemente uniforme. Resulta de la recolección, en una determinada población de un taxón y en una determinada fecha, de una cantidad concreta de germoplasma recolectada en esa ocasión (Ver "Accesión").

Maceración	Operación consistente en tratar con agua u otro disolvente líquido los frutos carnosos para separar las partes pulposas de aquellas duras (ej. las semillas del tejido carnoso de las bayas).
Macrobioclima	Representa la unidad de más alto rango en la clasificación bioclimática. Se trata de modelos biofísicos determinados por el efecto de valores latitudinales, climáticos y de vegetación. En la Tierra se reconocen 5 macrobioclimas: tropical, mediterráneo, templado, boreal y polar.
Macrosporófilo	Hojas fértiles especializadas en transportar estructuras reproductivas femeninas en las traqueófitas.
Maduración de las semillas	Proceso fisiológico que lleva a las semillas presentes sobre la planta al estado óptimo para la dispersión. En el momento de la maduración las semillas están en las condiciones idóneas para poder ser independientes de la planta madre y para poder, en un futuro, dar origen a un nuevo individuo. La maduración no es el momento en el que las semillas tienen la máxima germinabilidad; pueden presentar fenómenos de dormición y/o poseer necesidades de postmaduración.
Manipulación de las semillas	Conjunto de las operaciones (limpieza, valoración, selección, etc.) que sufre la semilla desde el ingreso al banco hasta su almacenamiento.
Médula	Tejido parenquimático que ocupa la parte central del tronco y de la raíz en las estructuras secundarias.
Meiosis	División celular (llamada también división reduccional) en la cual a partir de una célula diploide se forman cuatro células haploides. Consta de dos divisiones sucesivas con la duplicación de material genético. Se produce en una célula especializada representada por la célula madre de las esporas en las plantas de ciclo aplobionticas, por el cigoto en las de ciclo haploide, o por el gametocisto en las de ciclo diploide.
Membrana celular	Doble capa lipídica en la que se encuentran inmersos complejos proteicos y que delimita la célula viviente, regulando sus intercambios con el exterior.
Mericarpo	Porción única en la que se divide el esquizocarpo en la madurez, originado de un ovario pluricarpelar apocárpico o sincárpico. Un mericarpo corresponde a un aquenio.
Mesa densimétrica	Máquina dotada de un plano oscilante y vibrante sobre el cual las semillas se separan en gradientes de peso específico.
Mesocarpo	Capa media parenquimática comprendida entre el epicarpo y el endocarpo, frecuentemente carnoso.
Metapoblación	Conjunto de sub-poblaciones separadas espacialmente, pero conectadas funcionalmente por la capacidad dispersiva de sus componentes.
Micorrizas	Asociación mutualista entre las raíces de la mayor parte de las especies vegetales (cerca del 90%) y los hongos del terreno, que da lugar a relaciones simbióticas con ventajas recíprocas. Se distinguen endo- y ectomicorrizas.
Micosis	Patología causada por hongos parásitos (= micetos).
Microclima	Conjunto de condiciones climáticas que caracterizan una porción reducida de territorio (ej. microclima de una gruta).
Micrópilo	Apertura apical del óvulo antepuesta a la captura del polen que así puede alcanzar la nucela.
Microsporófilo	Hojas fértiles modificadas que transportan las estructuras reproductivas masculinas.

Mirmecocoria	Proceso de dispersión realizado por las hormigas.
Mitosis	División nuclear de una célula eucariota durante la cual cada una de las dos células hijas recibe un número cromosómico igual al de la célula madre.
Monitorización	Observación sistemática y estadística llevada a cabo sobre uno o más organismos vivos, poblaciones o fenómenos naturales. Derivado del término inglés <i>monitoring</i> , si bien en castellano resulta más conveniente utilizar el término <i>seguimiento</i> .
Monocárpica	Planta anual o perenne, que florece y fructifica una sola vez durante la vida (ej. <i>Agave sp. pl.</i> , <i>Verbascum sp. pl.</i>).
Monoclina	Flor provista bien del aparato sexual masculino o bien del femenino. Planta monoica con flores bisexuales o hermafroditas.
Monocotiledónea	Angiosperma caracterizada por un embrión con un sólo cotiledón, por hojas paralelinervias, flores trímeras, haces atactostélicos y ausencia de cambio interfascial.
Monoica	Especie en la que el mismo individuo lleva aparato reproductor masculino y femenino. Lo contrario de "Dioico".
Morfometría	Estudio cuantitativo de los caracteres morfológicos de organismos vivos o parte de ellos.
Morfotipo	Conjunto de individuos no bien definidos taxonómicamente pero sí morfológicamente.
Muestra	Parte de una población, idealmente seleccionada por representar adecuadamente las características de la misma (muestra representativa).
Muestreo	Técnicas utilizadas en campo y/o laboratorio para la individualización, recogida, análisis y determinación de una muestra.
Multiplicación de plantas	Proceso por el que se incrementa el número de individuos a partir de un conjunto limitado de ellos (material de multiplicación). En algunos sectores en los que está particularmente difundida la propagación asexual de las plantas (ej. ornamental), ésta se denomina multiplicación (o multiplicación vegetativa), en contraposición a la reproducción (utilizada para denominar a la propagación por vía sexual).
Mutualismo	Asociación entre individuos de especies diferentes que conlleva beneficio para ambos, pero que no constituye un beneficio obligado.
Naturalizada	Especie foránea introducida con el cultivo, que se vuelve espontánea accidentalmente en cuanto es capaz de reproducirse autónomamente y, después, completar el ciclo biológico entero.
Nicho ecológico	Parte del hábitat caracterizado por unas condiciones abióticas peculiares (ej. microclima), necesario para la supervivencia y el desarrollo de partes o del ciclo vital entero de una o más especies vegetales y/o animales.
Nucela	Parte interna del óvulo de las espermatófitas, constituida por un tejido diploide del que se diferencia la célula madre de las macrósporas. Corresponde al megasporangio.
Núcula o nuez	Fruto seco indehiscente pluricarpelar monospermo (ej. Fagaceae, Polygonaceae).
Ombrotipo	Unidad que expresa el cociente entre las precipitaciones medias (mm) y el sumatorio en grados centígrados de aquellos meses en que la temperatura media es superior a 0°C.
Origen	Para un territorio o una fuente de semillas autóctonas, el origen es el lugar donde viven las plantas productoras. Para un territorio y una fuente de semillas no autóctonas, el origen es el lugar de donde la planta se introdujo inicialmente. Con relativa frecuencia el origen de las semillas puede ser desconocido.

Ornamento seminal	Diseños, manchas o estructuras que caracterizan al tegumento de las semillas.
Ornitocoria	Proceso de dispersión realizado por las aves.
Orófito	Planta que prefiere las zonas montañosas.
Ortet	Individuo que se desarrolla a partir de una semilla, por lo tanto de dos progenitores por vía sexual, y que seguidamente, por clonación, origina nuevos individuos genéticamente idénticos (clones).
Ovario	Porción basal del pistilo que contiene los óvulos; puede ser <i>súpero</i> , (es decir, ubicado en la parte más alta del receptáculo, por encima de la inserción de la corola), <i>ínfero</i> (inmerso en el receptáculo o completamente rodeado por él, por debajo de la inserción de la corola), o <i>semiínfero</i> (cuando se inserta en un receptáculo ligeramente cóncavo, en el cual sólo la parte inferior está incorporada al receptáculo). Da origen al fruto después de la fecundación.
Óvulo	Estructura reproductiva que da origen a la semilla después de la fecundación; está formado por uno o dos tegumentos, la nucela y el gametófito femenino que ocupa la porción más interna.
Papel de filtro	Papel absorbente de laboratorio que se utiliza como filtro, así como sustrato en pruebas de germinación.
Papo	Estructura formada por pelos o escamas insertas en una extremidad de la semilla (Apocynaceae) o de los frutos (Asteraceae), relacionada con la diseminación anemócora. Sinónimo de vilano.
Parasitismo	Asociación biológica entre dos especies en la cual una obtiene un beneficio (ej. alimento, protección, etc.) a expensas de la otra. La primera especie se llama parásita y la segunda hospedante o huésped.
Partenocarpia	Formación y desarrollo de frutos sin que se produzca la fecundación.
Partenogénesis	Desarrollo de un individuo a partir de un gameto (o gametangio) sin la unión con otro gameto. Puede ser haploide o diploide.
Patógeno	Microorganismo que provoca una patología.
Pedología	Ciencia que estudia el origen, la formación, la composición química y la evolución de los suelos, así como los efectos inducidos por la biocenosis con la que interacciona. Puede considerarse como una rama asociada o equivalente a la edafología.
Pedregosidad	Presencia porcentual de piedras sobre una determinada superficie.
Pericarpio	Conjunto de los tejidos que forman el fruto de las angiospermas, derivados de la transformación de las paredes del ovario después de la fecundación. El pericarpio puede ser indiferenciado o subdividido en dos o tres partes: epicarpio, mesocarpio y endocarpio. Puede ser membranoso o coriáceo en los frutos secos, carnoso o jugoso en los frutos carnosos.
Perisperma	Tejido derivado del parénquima nucelar a consecuencia de la doble fecundación y que acumula la mayor parte de las reservas de algunas semillas.
Peso fresco de la accesión	Peso de la accesión en el momento de ingreso en el banco, sin que haya sufrido ningún proceso de deshidratación o de selección/limpieza.
Peso fresco de las semillas	Peso de las semillas seleccionadas y limpias antes de que sufran procesos de deshidratación.

Phylum	En términos taxonómicos es una agrupación de clases que representa una “División” (en plural, <i>phyla</i>).
Pildoración	Trabajo que consiste en el revestimiento de la semilla con sustancias inertes, a veces vehículos de pesticidas, y capas hidrosolubles hasta obtener un producto que generalmente tiene el aspecto de una píldora. Esta se deshace o se rompe en contacto con la humedad o con el agua.
Pionera	Especie dotada de capacidad colonizadora de ambientes fuertemente selectivos (ej. dunas arenosas), capaz de preparar el terreno para la colonización de otras especies.
Placa Petri	Recipiente de vidrio o plástica plano, provisto de tapa, generalmente usado para el cultivo de microbios o para la germinación de semillas, polen, etc.
Placenta	La parte del carpelo donde se insertan los óvulos, generalmente engrosada.
Plántula	<i>Sensu stricto</i> , planta joven contenida en el estado embrional en las semillas de las espermatófitas. En sentido amplio, planta joven en los primeros estados de desarrollo, cuando su crecimiento se produce a expensas de los contenidos nutritivos de la semilla.
Plumilla	Primera formación de yema del embrión de una planta, destinada a desarrollarse en el brote.
Plúmula	Ver “Plumilla”.
Pluricárpica	Planta que fructifica más de una vez durante su vida.
Población	Conjunto de individuos de un mismo taxón que comparten un espacio ecológico común y entre los cuáles existe una alta probabilidad de intercambio genético.
Polen	Unidad reproductiva y de dispersión de las plantas con flores, que contiene al gametófito masculino rodeado de una pared protectora.
Policoria	Proceso de dispersión no especializado en el que se actúa en estados diferentes, a través de diversos vectores.
Policórmico	Que presenta varios tallos, aunque sólo uno principal.
Polimorfismo	Existencia de varias formas con las que se presenta una misma entidad (ej. una especie); el polimorfismo puede derivar de causas genéticas (variabilidad genética) o ambientales (formas estacionales).
Polinización	Transporte del polen de los aparatos reproductores masculinos a los femeninos.
Polinización directa	Transferencia del polen de una flor sobre los estigmas de la misma flor, sinónimo de autogamia (ver “Autopolinización”).
Polinización indirecta o cruzada	Transferencia del polen entre flores distintas de la misma planta o entre flores de plantas diferentes pertenecientes a la misma especie.
Pollenkitt	Sustancia compuesta por lípidos, proteínas y pigmentos que envuelven las esculturas del grano polínico con una sutil capa oleosa, o con gotas; sirve de protección y permite mejores adhesiones a las pieles de los insectos.
Postmaduración	Proceso de desarrollo de las semillas después de la recolección o abscisión de los frutos, durante el cual continúan el desarrollo hasta llegar a su maduración fisiológica. Cuando se refiere a determinados tipos de dormición, indica el periodo necesario para lograr la viabilidad de la geminación de la semilla. Si el término se aplica al manejo de los frutos o semillas, indica el periodo en el cual la semilla pasa por el proceso de pérdida del contenido en agua.

Potencial hídrico	Representa la energía potencial del agua y viene dada por el cambio de lugar de las moléculas de agua de un sitio a otro gracias a las diferencias en los potenciales de energía, tanto en el mundo vivo como en el no vivo. Este parámetro predice el sentido del movimiento del agua dentro de las semillas o en el suelo, de modo que el agua se desplaza siempre del potencial hídrico mayor (menos negativo) al menor (más negativo).
Preheating	Ver "Estratificación caliente".
Pretratamiento	Acción que permite eliminar la dormición de las semillas y obtener la máxima velocidad y uniformidad de la germinación.
Prónubo	Insecto que recoge comida, néctar, polen (ej. hormigas, abejas obreras).
Propagación vegetativa o agámica	Producción de nuevas plantas fuera del proceso gámico, con la formación de individuos con características genéticas idénticas a las de partida, mediante enraizamiento de esquejes, injerto, propágulos, división de mata, micropropagación o bulbillos.
Propágulo	Modalidad de propagación vegetativa en la cual la formación de las raíces del nuevo individuo tiene lugar sobre una parte de la planta (habitualmente una rama flexible) todavía unida a la planta madre.
Protocolo de germinación	Conjunto de acciones o de procedimientos (comprendidos los pretratamientos a aplicar) tendentes a obtener una germinación óptima para una especie de un lote determinado.
Procedencia	Población de la cual se ha tomado una semilla. Se entienden como procedencias originales aquellas cuyo material de base es autóctono. Se entienden como procedencias artificiales aquellas semillas que proceden de plantaciones de especies exóticas u alóctonas no naturalizadas.
Psammófila	Especie adaptada a los ambientes arenosos costeros y no costeros (ej. dunas).
Pureza de la semilla	Para un lote de semillas, porcentaje de peso de semillas limpias e intactas de la especie considerada. Las semillas extrañas y la materia inerte son consideradas impurezas.
Ramet	Réplica vegetativa, genéticamente idéntica, de un clon a partir de un individuo ancestral (ortet). Módulo simple o conjunto de troncos fácilmente identificables y comparables, llamado también individuo funcional.
Rango ecológico	Conjunto de las diferentes condiciones ecológicas (ej. rango altimétrico) en que una especie puede adaptarse, crecer y reproducirse.
Raza local	Población o poblaciones de un taxón adaptadas a un ambiente específico en una localidad o área geográfica dada.
Renaturalización (o renaturación)	Operación de recuperación de ambientes artificializados que permite devolverlos a su estado originario en tiempo variable y dependiente tanto de las condiciones ambientales (ej. clima) como del cese del factor de perturbación.
Reposo vegetativo	Periodo durante el cual el desarrollo de la planta se ralentiza hasta permitir la superación de la estación adversa (ej. frío invernal, aridez estival).
Reproducción sexual	Fusión gamética de la cual se origina un organismo nuevo y genéticamente diferente de ambos progenitores.
Resistencia ecológica	Capacidad de un sistema de reaccionar evitando modificaciones respecto al estado originario durante un episodio de perturbación o impacto negativo.
Retardo de germinación	Tiempo necesario para el inicio de la germinación de semillas puestas en condiciones favorables.

RGB	Acónimo del inglés <i>Red Green Blue</i> (rojo verde azul). Codificación del color, impuesta como combinación de los tres colores primarios rojo, verde y azul. Variando el porcentaje de cada uno de ellos, se obtiene toda la gama del blanco (porcentual de todos los colores = 0) al negro (porcentuales = 100) .
Rizoma	Tallo subterráneo, normalmente horizontal, sin clorofila y cuyas hojas se reducen a escamas ricas en reservas, del cual nacen los tallos aéreos, las hojas y las raíces.
Rocosidad	Presencia porcentual de roca aflorante en una superficie determinada.
Sámara	Fruto seco monocarpelar indehiscente y monospermo, provisto de un ala que favorece el transporte por acción del viento (aquenio alado).
Segregación	Transmisión independiente a la progenie de los caracteres determinados por los genes llevados en cada pareja de cromosomas. La transmisión independiente hace que se pueda representar, también después de más generaciones, un carácter anteriormente oculto por la interacción del gen responsable con el resto del ADN.
Semilla	Órgano de las espermatófitas capaz de dar origen a una nueva planta, derivado del óvulo fecundado y constituido por el embrión, acompañado al menos de endospermo o albumen, y protegido de tegumentos rígidos y a menudo endurecidos.
Semilla intermedia	Semilla que soporta la deshidratación mejor que las recalcitrantes, pero peor que las ortodoxas. Una vez deshidratada (parcialmente) no tolera el estrés producido por las bajas temperaturas (próximas a 0° C) pero se comporta mejor si se expone a temperaturas medias (en torno a 15°C).
Semilla ortodoxa	Semilla que mantiene su facultad germinativa por largos periodos si se reduce su contenido en humedad (mc 5-6%) y que puede conservarse a bajas temperaturas durante largo tiempo.
Semilla pregerminada	Semilla en el primer estadio de la germinación, situación que generalmente ocurre a continuación de cualquier tratamiento. Normalmente muestra los tegumentos seminales partidos y/o la raicilla. Término utilizado en la práctica viverística, cuando se siembran semillas que ya están iniciando la germinación. En ocasiones estas semillas se definen como germinadas prematuramente durante los procesos de estratificación.
Semilla recalcitrante	Semilla que pierde rápidamente su viabilidad si el contenido de humedad desciende por debajo de un nivel crítico (variable entre el 20% y el 50% de humedad relativa), y caracterizada por contenidos hídricos muy elevados. No toleran largos periodos de conservación, ni exposiciones a temperaturas de congelación (0°C), en ocasiones ni siquiera bajas temperaturas (5°C).
Siembra	Proceso por el cual la semilla se pone en condiciones favorables para germinar.
Siembra a chorrillo	Disposición de las semillas en pequeños grupos equitativamente distanciados entre ellos.
Siembra a voleo	Esparcido de las semillas de modo uniforme, pero casual (a mano o con máquinas apropiadas).
Siembra en líneas	Disposición de las semillas en líneas y según distancias predeterminadas.
Sierpe	Brote que procede de una yema adventicia de la raíz o del cuello de la misma. Se puede emplear como propágulo en multiplicación vegetativa, arrancándola con parte de raíz para asegurar su arraigo al transplantarla.

Simbiontes	Microorganismos como bacterias, hongos y algas vivientes en simbiosis (comunidad) con un organismo superior (planta).
Sitio de recolección	Lugar donde se recoge el material vegetal.
Sufrútice	Planta perenne con base leñosa y con brotes de consistencia herbácea que se renuevan cada año.
T₅₀	Parámetro utilizado para determinar la velocidad de germinación, número entero de días correspondientes al tiempo necesario para obtener el 50% de la capacidad germinativa del lote de semillas.
Tasa de mortalidad	Índice de decrecimiento de una población.
Tasa de natalidad	Índice de crecimiento de una población.
Taxon	Grupo sistemático independientemente del rango.
Tegumento (de la semilla)	Revestimiento del óvulo constituido por uno o dos estratos con función de protección y aislamiento del ambiente externo. Después de la fecundación se divide y modifica su estructura para una mejor protección de las partes internas de la semilla.
Tejidos meristemáticos	Conjunto de células indiferenciadas que han mantenido inalterada la capacidad de dividirse y cuya función principal es la de proliferar dando origen a nuevas células que llegarán a realizar los procesos de diferenciación. Se llaman también tejidos embrión.
Temperatura óptima	La temperatura a la que el crecimiento de la planta o, en general, la manifestación de un fenómeno se producen lo más rápidamente posible.
Termobalanza	Analizador electrónico de humedad que pesa y deshidrata las semillas simultáneamente calculando la diferencia en peso porcentual. Representa un método de medida de la humedad de tipo destructivo.
Termoperíodo	Factor que influye el desarrollo de una planta a través de la alternancia de temperatura entre el día y la noche.
Terófito	Planta anual que supera la estación adversa en forma de semillas.
Test al frío	Test que suele utilizarse para estimar el vigor de las semillas de trigo y de soja. Las semillas se siembran en el terreno sobre papel absorbente y son expuestas al frío por un período específico durante el cual sufren la influencia de la temperatura, la imbibición y los microorganismos. Posteriormente a este tratamiento las semillas se someten a condiciones óptimas de germinación.
Testa	Tegumento externo de la semilla dotado de puntas, garfios, pelos o alas, jugando un papel esencial en su diseminación.
Tetraquenio	Fruto seco indehiscente compuesto de cuatro mericarpios (ej. Boraginaceae y Lamiaceae).
Tetrazolio	Compuesto químico (cloruro o bromuro de 2,3,5-trifenil tetrazolio) que permite realizar un test bioquímico (TTC) indicador de la vitalidad de las semillas, según el cual las partes vitales se colorean en tonos intensos de rojo.
Tiempo medio de germinación (TMG)	Es un modo de calcular la velocidad de germinación. Se define como el sumatorio (de 1 a <i>n</i>) de los productos entre las semillas germinadas y el día en que se ha producido su germinación, todo ello dividido por el número total de las semillas germinadas al final de la prueba. Una germinación rápida viene caracterizada por un TMG bajo.

Tipo corológico	Individualización de las áreas geográficas dentro de las que vive un taxón dado (ej.: <i>Quercus suber</i> L. es una especie del oeste del Mediterráneo).
Tomografía axial (TAC) de la semilla	Técnica radiográfica aplicada al análisis de las semillas, que ofrece una imagen unidimensional de la densidad de los tejidos, obtenidas en "secciones" virtuales cada 0.5 mm. Los diversos niveles de densidad, coloreados según unas normas establecidas, indican la calidad del material analizado. Las imágenes pueden tratarse para la obtención de modelos tridimensionales.
Topófitis	Fenómeno por el que las yemas, los brotes o los esquejes, mantienen por un lapso de tiempo variable la forma y la fase vegetativa que tenían sobre la planta de la que se ha efectuado el trasplante.
Tratamiento de la semilla	A menudo utilizado como sinónimo de pretratamiento (ver "Pretratamiento").
TTC	Ver "Tetrazolio".
Tubérculo	Órgano de reserva de las plantas constituido por un tallo o una rama subterránea con un fuerte engrosamiento a nivel de la médula (ej. la patata). Por extensión, cualquier prominencia redondeada de la superficie de un órgano vegetal.
Turba	Material extraído de los depósitos orgánicos constituidos por restos de vegetales, utilizado en el viverismo para la preparación de mantillo.
Unisexual	Flor con órganos sólo masculinos o sólo femeninos, es decir, que posee, respectivamente, sólo los estambres o los pistilos.
Validación de los protocolos	Confirmación experimental de los resultados obtenidos a través de la aplicación de protocolos de germinación individualizados mediante experimentación o elaborados por otras instituciones.
Variabilidad genética	Presencia de diferentes formas de un mismo carácter en un taxón o población.
Variedad	En términos taxonómicos, unidad de rango subespecífico que identifica áreas geográficas de una especie o subespecie, distinguible por uno o más caracteres, y diferenciada nomenclaturalmente en latín. En términos agronómicos, nombre utilizado para referirse a una serie de clones o cultivares, con un sentido práctico y sin denominación latina.
Vástago	Brote que se desarrolla tras cortes de troncos o ramas. Se distinguen vástagos verdaderos (de yemas de tallos y ramas) y vástagos radicales (de yemas radicales).
Vernalización	Proceso por el cual un período de bajas temperaturas promueve un fenómeno biológico (ej. floración, apertura de las yemas, germinación de las semillas) que de lo contrario no se produciría. En el caso de las semillas, el término es sinónimo de estratificación fría.
Viraje	Cambio de color.
Vitalidad	Capacidad de un órgano para desarrollar las funciones a las cuales está destinado a través de una serie de actividades metabólicas dirigidas a esta finalidad. Puede tratarse de polen, raíces, cultivos meristemáticos, semillas.
Warming	Ver "Estratificación caliente".
Xerófito	Planta que se adapta con facilidad o que prefiere completamente los lugares áridos y secos.
Zigoto	Célula diploide que deriva de la unión de dos gametos a continuación de la fecundación.
Zoocoria	Proceso de dispersión llevado a cabo por los animales.

Enlaces de interés

Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici

<http://www.apat.it>

Agricultural Research Service

<http://www.ars.usda.gov/is/AR/>

Association of Seed Analysts (AOSA)

<http://www.aosaseed.com>

Atlante delle piante forestali

<http://www.agraria.org/coltivazioniforestali.htm>

Australian Network for Plant Conservation

<http://www.anbg.gov.au/anpc/>

Biodiversity links

<http://www.tufts.edu/~cchester/biodiversity.html>

Botanic Gardens Conservation International (BGCI)

<http://www.bgci.org.uk/>

Canadian Botanical Conservation Network

<http://www.rbg.ca/cbcn/>

Center for Plant Conservation

<http://www.centerforplantconservation.org/>

Centro Conservazione Biodiversità – Università di Cagliari

<http://www.ccb-sardegna.it>

Instituto Universitario de Investigación CIBIO (Centro Iberoamericano de la Biodiversidad) - Universidad de Alicante

<http://www.cibio.org>

Checklist of online vegetation and plant distribution maps

<http://www.lib.berkeley.edu/EART/vegmaps.html>

Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles

<http://www.portcrosparcnational.fr/conservatoire/>

Conservatoire Botanique National Alpin de Gap-Charance

<http://www.cbn-alpin.org>

Conservatoire Botanique National de Brest

<http://www.cbnbrest.fr/>

Conservatoire Botanique National Bassin Parisien

http://inpn.mnhn.fr/cbnpb_new/

Conservatoire Botanique National de Bailleul

<http://www.cbnbl.org/>

Convención de Washington CITES

<http://www.corpoforestale.it/wai/serviziattivita/CITES/index.html>

Corpo Forestale dello Stato

<http://www.corpoforestale.it/wai/index.html>

Crop Science

<http://crop.scijournals.org/>

Cryobiology

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/622814/description#description

CryoLetters

<http://www.cryoletters.org/>

Danida Forest Seed Centre

<http://www.dfsc.dk/>

European Centre for Nature Conservation

<http://www.ecnc.nl/doc/ecnc/saxifrag/euroflor.html>

European Native Seed COnservation NETwork (ENSCONET)

<http://www.ensconet.com>

European Platform for Biodiversity
<http://www.bioplatform.info/>

Fire Effect Information System
<http://www.fs.fed.us/database/feis/>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)
<http://www.fao.org>

Forest Conservation Links
<http://forests.org/links/>

Forest Science Database
<http://www.forestscience.info>

Global Strategy for Plant Conservation in Europe
<http://www.nerium.net/plantaeuropa/main.htm>

Integrated Taxonomic Information System
<http://www.itis.usda.gov>

International Phytosanitary Portal (IPP): the official web site for the International Plant Protection Convention (IPPC)
<http://www.ippc.int>

International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI)
<http://www.ipgri.org>

International Plant Names Index
<http://www.ipni.org/index.html>

International Seed Testing Association (ISTA)
<http://seedtest.org/en/home.html>

International Society for Seed Science
<http://www.usd.edu/iss/>

International Union for the Conservation of Nature (IUCN)
<http://www.iucn.org/>

Internet Directory for Botany
<http://www.botany.net/IDB/botany.html>

IUCN 2008 Red List of Threatened Species
<http://redlist.org>

Jardín Botánico Atlántico
<http://botanicoatlantico.com>

Jardí Botànic de Barcelona
<http://www.jardibotanic.pcn.es>

Jardín Botánico Canario Viera y Clavijo
<http://www.step.es/jardcan/>

Jardín Botánico de Córdoba
<http://www.jardinbotanicodecordoba.com/>

Jardí Botànic de Sóller
<http://www.jardibotanicdesoller.org>

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

Jardí Botànic Marimurtra
<http://www.jbotanicmarimurtra.org>

Journal of New Seeds
<http://www.haworthpress.com/>

Libro nazionale dei boschi da seme
<http://www.forgen.net/main/bds.asp>

Ministère de l'Écologie et du Développement Durable
<http://www.ecologie.gouv.fr>

Museum national d'Histoire naturelle (France)
<http://www.mnhn.fr>

National Seed Laboratory (EEUU)
<http://www.nsl.fs.fed.us>

Native Plants Journal
<http://www.nativeplantnetwork.org/journal/>

Native Seed (EEUU)
<http://www.nativeseeds.org/>

National Tree Seed Centre (Canada)
<http://www.atl.cfs.nrcan.gc.ca/seedcentre/seed-center-e.htm>

Native Plants Propagation Protocol Database
<http://www.nativeplantnetwork.org/network/general.asp>

Natural Parks Service, Endangered Species
<http://www.nature.nps.gov/biology/endangered-species/>

Nursery Technology Cooperative

<http://www.cof.orst.edu/coops/ntc/ntc.htm>

Plants database, USDA Natural Resources Conservation Service

<http://plants.usda.gov/>

Plant Physiology

<http://www.plantphysiol.org>

Plant Species Life Form

<http://www.fs.fed.us/database/feis/plants/>

Proyecto Interreg III B "GENMEDOC"

<http://www.genmedoc.org/>

Proyecto Riselvitalia, producción de material forestal de propagación

http://www.ricercaforestale.it/riselvitalia/BIO-DIVERSITA/Riselvitalia1.1/sottoprogetto_1.1.htm

Real Jardín Botánico Juan Carlos I

<http://www.rjbalcala.com>

Real Jardín Botánico de Madrid

<http://www.rjb.csic.es>

Reforestation, Nursery and Genetic Resources

<http://www.rngr.net/>

Rete degli Orti Botanici della Lombardia

<http://www.reteortibotanicilombardia.it/>

Royal Botanic Gardens, Kew

<http://www.rbgkew.org.uk>

Seed Abstracts

<http://www.cabi-publishing.org/>

Seed Info

<http://www.icarda.cgiar.org>

Seed Information Database (release 7.1, May 2008)

<http://www.rbgkew.org.uk/data/sid>

Seed Room, Kirstenbosch National Botanical Garden Private Bag

<http://www.sanbi.org/products/seeds.htm>

Seed Science and Technology

<http://www.seedtest.org>

Seed Science Research

<http://www.cabi-publishing.org/>

Seed Technology

<http://www.aosaseed.com/>

Seed Testing International

<http://www.seedtest.org>

Semillero América Latina

<http://www.newforestsproject.com>

Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia

<http://www.granicoltura.it>

Tropical Tree Seed Manual

<http://www.rngr.net/Publications/ttsm>

Wageningen Seed Centre

<http://www.seedcentre.nl/>

Wild Plants in California

<http://www.calflora.org/index0.html>

Woody Plant Seed Manual

<http://www.nsl.fs.fed.us/wpsm/>

World Atlas of Biodiversity

<http://stort.unep-wcmc.org/imaps/gb2002/book/viewer.htm>

XILOGLOS – Glosario multilingüe de términos utilizados en la tecnología de la madera

<http://www.populus.it/xilo.php>



Obra Social "la Caixa"



GOBIERNO DEL
PRINCIPADO DE ASTURIAS

