

ACCIONES DE CONSERVACIÓN *EX SITU* DE LA POBLACIÓN EUROPEA DE *BOERHAVIA REPENS* L. SUBSP. *REPENS* (NYCTAGINACEAE).

Inmaculada FERRANDO PARDO, P. Pablo FERRER GALLEGO, Albert NAVARRO & Emilio LAGUNA

Centro para la Investigación y Experimentación Forestal -CIEF- de la Generalitat Valenciana. Comarques del País Valencià, 114. Quart de Poblet, Valencia. E-46930. endemica_cief@gva.es, flora.cief@gva.es

RESUMEN: Se comentan las diferentes acciones que en materia de conservación activa *ex situ* se han desarrollado con *Boerhavia repens* L. subsp. *repens* (Nyctaginaceae), especie de gran valor conservacionista y cuya única población europea se encuentran en el término alicantino de Teulada. Se aportan datos sobre el método de producción y elaboración de una colección viva *ex situ*, ensayos de germinación realizados y datos sobre las accesiones creadas y conservadas en diferentes bancos de germoplasma de la red de Bancos de Semillas del Mediterráneo (GENMEDA). En el estudio del comportamiento germinativo a diferentes condiciones de ensayo se observan grandes diferencias entre tratamientos, mostrándose como las más efectivas una temperatura constante de ensayo a 25°C seguida de 20°C, ambos ensayos bajo un fotoperíodo de 12/12h. luz/oscuridad. **Palabras clave:** *Boerhavia repens*, germinación, Teulada, Alicante, Red GENMEDA

SUMARY: This paper shows different activities about active *ex situ* conservation which have been developed with *Boerhavia repens* L. subsp. *repens* (Nyctaginaceae), a high conservation value species whose single European population is located in Teulada, Alicante (Spain). Thus it furnishes data about production and elaboration of *ex situ* live plant collection methods, germination tests and all accesions set and kept up in several germoplasm banks of Mediterranean Seed Bank Network (GENMEDA). Specifically, germinative behaviour of this taxa under different test conditions reveals high differences between treatments, being 25°C followed by 20°C, both with a photoperiod of 12 hours light/dark, the most effective. **Key words:** *Boerhavia repens*, germination, Teulada, Alicante province, GENMEDA network.

INTRODUCCIÓN

Dentro del estudio de la biología de la conservación de especies vegetales, las técnicas de conservación *ex situ* permiten el mantenimiento y preservación de taxones fuera del hábitat natural donde viven (GIVEN, 1994). En el desarrollo de este tipo de actividades, el trabajo con material genético de reproducción en forma de in-

dividuos, frutos, semillas, propágulos, esquejes, tejidos, polen, etc., mediante diferentes técnicas y prácticas juega un papel esencial al garantizar la supervivencia de las especies a medio y largo plazo (HERNÁNDEZ BERMEJO & al., 1990). En particular, el estudio de la germinación de las especies se ha revelado como una de las facetas fundamentales para asegurar su conservación (BAÑARES, 1994; BAÑA-

RES & al., 2001).

Las estrategias de conservación *ex situ* que pueden ser aplicadas para la protección de la biodiversidad son de muy diversos tipos. Entre todas ellas, el trabajo con semillas como unidad de conservación de los recursos genéticos vegetales, junto con el desarrollo de colecciones vivas de plantas silvestres en condiciones controladas, con técnicas de cultivo particularizadas, representan dos ejemplos ampliamente utilizados por parte de las administraciones, Jardines Botánicos y otras instituciones dedicadas al estudio de la conservación vegetal (cf. THOMPSON, 1970; GÓMEZ-CAMPO, 1979; SUNDERLAND & al., 2002). La combinación de estos trabajos contribuye sin duda al incremento de las opciones futuras de mantenimiento de las especies de mayor interés en sus condiciones naturales (cf. FALK, 1990).

En este sentido, siguiendo este esquema de trabajo, actualmente en el Centro para la Investigación y Experimentación Forestal (CIEF) de la Generalitat Valenciana, el Servicio de Conservación de la Biodiversidad de la Consellería de Medio Ambiente, Agua, Urbanismo y Vivienda junto con el Banco de Semillas Forestales de la Generalitat Valenciana, trabajan en una de sus líneas de investigación y experimentación, con materiales de conservación vegetal bajo modelos integrados de un gran número de especies de alto interés conservacionista, fundamentalmente sobre flora amenazada, rara y/o endémica de la Comunidad Valenciana. Sobre este elenco de especies se desarrollan planes de conservación desde una perspectiva global, elaborando estrategias exhaustivas y particularizadas para cada taxón, que abarcan desde la aplicación de técnicas de conservación *ex situ*, hasta el diseño y elaboración de acciones de trabajo *in situ* (búsqueda y rastreo de poblaciones, constatación de localidades, censos poblacionales, trabajos de restitución, etc.).

Durante los últimos años, el incremento de la información sobre la flora singular valenciana (MATEO & CRESPO, 2003; SERRA & al., 2000) y su estado de conservación a nivel comunitario (LAGUNA & al., 1998) ha permitido la aplicación efectiva de criterios de prioridad para la selección de taxones que deben ser incluidos en diferentes planes y estrategias de conservación. Entre los criterios de selección utilizados y más aceptados a nivel mundial (BGCS, 1989; WYSE-JACKSON & SUTHERLAND, 2000) se reconoce como de mayor preferencia a las especies catalogadas como amenazadas, con atención particular para aquellas que además cumplen la condición de endémicas, o por corresponder a plantas relícticas con un elevadísimo grado de aislamiento respecto de sus poblaciones más cercanas (p.ej., poblaciones únicas para Europa o para el Mediterráneo Occidental). A éstas le siguen las especies con cierto grado de rareza, de interés científico especial, las que desarrollan funciones específicas en los ecosistemas (p.ej. facilitadoras), especies clave, estructurales, de importancia económica o las denominadas especies bandera, estratégicas por representar valores especiales para el desarrollo de una conciencia conservacionista. Atendiendo al primer criterio de selección, una de las especies objeto de estudio por parte de este equipo de trabajo es *Boerhavia repens* L., nictaginácea con representación en la flora valenciana tan sólo a través de una única población situada en el cuadrante nororiental de la provincia de Alicante.

Esta interesante especie se distribuye de manera natural preferentemente por la zona Paleotemplada del continente africano y asiático (desde Marruecos y el Sahara, hasta Egipto y Palestina) llegando a alcanzar de forma muy puntual territorio europeo (Sicilia y SE de España). Para la flora peninsular ibérica, fue dada a conocer por primera vez tras su localización en

el término alicantino de Teulada (SOLER, 1995) y hasta el momento ésta es la única población que se conoce a nivel nacional y con alta probabilidad también a nivel europeo, según determinadas interpretaciones taxonómicas (cf. GREUTER & al., 1989), que darían valor a la independencia taxonómica de las poblaciones sicilianas, como *B. repens* subsp. *viscosa* (Choisy) Maire. Este último taxón es objeto de cierta controversia, ya que algunos autores lo sinonimizan a la especie pantropical *B. coccinea* Mill. var. *coccinea* (LEBRUN & STORK, 1991-1997), que parece ser considerada como autóctona tanto de África Tropical como de Centroamérica (v. SPELLENBERG, 2001); asimismo, el material siciliano ha sido interpretado tradicionalmente como alóctono, a diferencia del alicantino (v. SOLER, 1995). El descubrimiento de la única población española es posterior a la revisión de las Nyctagináceas en *Flora Iberica* (G. LÓPEZ, 1990), tampoco ha sido incluida hasta ahora en las *Claves de Flora Iberica* (ÁLVAREZ FERNÁNDEZ, 2001).

En la localidad alicantina, *B. repens* convive con otras especies de carácter marcadamente xerotermófilo presentes en ambientes muy áridos y con distribución norteafricana, como por ejemplo *Commicarpus africanus* (Lour.) Day, preferentemente dentro de comunidades saxícolas del sintaxón *Teucrium buxifolii* Rivas Goday 1956 [*Asplenietea trichomanis* (Br.-Bl. in Meier & Br.-Bl. 1934) Oberdorfer 1977]; *B. repens* y *C. africanus* son precisamente los únicos dos representantes europeos autóctonos de la familia *Nyctaginaceae*. El comportamiento auto y sinecológico de estas dos plantas en este emplazamiento, instaladas en las repisas de un roquedo calcáreo muy expuesto y soleado, parece reproducir las pautas seguidas en otros territorios geográficamente próximos, tal y como ha sido indicado por SOLER (1995), argumento que cues-

tiona la hipótesis que clasifica a estas taxones como componentes alóctonos para la flora ibérica, defendido en un principio por varios autores (cf. ESTEVE, 1959; BOLÒS & al., 2005).

Desde el punto de vista de su estado de conservación a nivel nacional, fue incluida dentro de la Lista Roja de Flora Vascular Española, catalogada en un primer momento como En Peligro Crítico (CR) según los criterios UICN (1994) B1 +2c, debido fundamentalmente a la reducida área de distribución de ocupa la única población existente en territorio nacional (VV.AA., 2000). Posteriormente, y con la elaboración del Atlas de Flora Amenazada de España (BAÑARES & al., 2003), la reevaluación de esta especie (CRESPO, 2003) matizó los criterios dentro de la misma categoría de amenaza CR (B1ab(iii) + 2ab(iii); D), utilizando los criterios renovados de UICN (2001). El número de ejemplares de la población ibérica es extremadamente reducido, estimado inicialmente entorno a 30 (SOLER, 1995) y ampliado tras un rastreo más exhaustivo hasta 51 (CRESPO, 2003), aunque de nuestras observaciones de campo se desprende que el número de ejemplares adulto que regularmente se reproducen, o que por su tamaño y situación tienen más asegurada su supervivencia a largo plazo, sería muy inferior.

Conforme a los datos de CRESPO (2003) y SERRA (2005), la evaluación de los factores que ocasionan mayor riesgo son los debidos al efecto del ramoneo por parte del ganado y la actividad minera de las cercanas canteras de piedra, estos dos casos de antropización suponen una gran amenaza para el hábitat y la supervivencia del escaso número de individuos que componen la población.

A la vista de estos datos, ha sido necesario el diseño de un plan de conservación que integrara diferentes medidas urgentes para el mantenimiento de este ex-

clusivo material genético, tanto de manera *in situ*, como *ex situ*. En el presente artículo se comentan algunos aspectos relacionados con las actividades llevadas a cabo por el equipo de Biodiversidad de la Consellería de Medio Ambiente y el CIEF en materia de conservación *ex situ*. Entre estas acciones destacan los estudios sobre el comportamiento germinativo y la metodología de producción para la creación tanto de una colección viva en vivero como de planta para posteriores trabajos en campo. Se ha tratado al mismo tiempo diversos aspectos relacionados con la conservación de las semillas a medio y largo plazo y la supervivencia de las plantas en los primeros estadios de producción.

MATERIAL Y MÉTODOS

En la recolección de las semillas se ha seguido los protocolos adoptados en el ámbito del proyecto GENMEDOC, desarrollado entre 2004 y 2006 (www.genmedoc.org), según lo establecido por BACCHETTA & *al.*, (2006), recolectando siempre durante el período comprendido entre la maduración y la diseminación de las diásporas. En un primer momento, los frutos recolectados de la población natural fueron transportados y conservados en bolsas de papel transpirable hasta su limpieza dentro de la cámara de deshidratación, donde también permanecieron una vez limpios junto con gel de sílice, hasta alcanzar el contenido interno de humedad adecuada para su conservación a medio y largo plazo a bajas temperaturas (ROBERTS, 1973; ELLIS & *al.*, 1989; ELLIS & ROBERTS, 1980; GÓMEZ-CAMPO, 1985a, 1987, 2006; HONG & *al.*, 1996; PROBERT, 2003). Las semillas recolectadas se han ido destinando a los test de germinación y a su almacenamiento como banco de germoplasma, en tanto las plántulas obtenidas han servido para generar una colección de planta viva; dado que las actividades concretas segui-

das en este último caso se han ido modificando progresivamente a medida que se avanzaba en la investigación, se ha preferido detallar esta parte de la metodología en el apartado de 'Colección viva para cultivo *ex situ*' del apartado de 'Resultados' de este artículo.

Para la realización de los diferentes test de germinación se cogieron aleatoriamente aquenios de las accesiones de partida a estudiar, creadas a partir de los frutos obtenidos de las plantas cultivadas *ex situ*, se desinfectaron en un primer momento las muestras por inmersión con hipoclorito de sodio -NaClO- (dilución al 1%) durante 1 hora, previniendo así la posible infección por hongos y evitar errores inducidos en la viabilidad y germinabilidad final. Seguidamente los frutos fueron lavados con abundante agua desionizada, siendo éste así el único pretratamiento que recibieron antes de su siembra. Las siembras se realizaron en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar (REAL SBio-II-A/B3), empleando placas de Petri de 5,5 cm de diámetro, con dos láminas circulares de papel de filtro Albet, humedecidas inicialmente con 2,5 ml de agua destilada y selladas con parafilm. Por cada lote se prepararon 4 placas-réplica con 25 aquenios por placa (cf. PÉREZ-GARCÍA & DURAN, 1989). Las placas se introdujeron en cámaras incubadoras (MLR-350 de SANYO) programadas con diferentes condiciones de cultivo; temperaturas alternantes de 10/20°C, 15/20°C y constantes de 25°C y 20°C, todas bajo fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El seguimiento de la germinación se realizó a intervalos de dos días durante los 30 que duraron los ensayos (I.S.T.A., 1985). Con el fin de evitar el posible estrés hídrico por desecación, las placas se humedecían hasta el punto de saturación cuando se apreciaba que el papel de filtro se secaba. Como criterio de germinación se consideró que una semilla había germinado cuando su radícula era

superior a los 2 mm de longitud (cf. I.S.T.A., 1985; PÉREZ-GARCÍA & DURÁN, 1989; SUSZKA & *al.*, 1994), en ese momento se retiraban de la placa para su posterior cultivo.

Para evaluar el proceso de la germinación se han calculado varios parámetros altamente informativos y de gran utilidad para el estudio del comportamiento germinativo (cf. ISTA, 1985; BROWN & MAYER, 1988; RANAL & GARCÍA DE SANTANA, 2006). Entre estos destacan la capacidad germinativa **C.G.**, o germinabilidad, medida como el porcentaje final de semillas que alcanzan la etapa de germinación respecto al total de la muestra ensayada; el porcentaje máximo de germinación diaria (**G. máx.**), el día en que se ha alcanzado este porcentaje y la velocidad de germinación, calculada mediante el número de días en el que se alcanza el 50% de la germinación total -**T₅₀**- (BEWLEY & BLACK, 1994; COPELAND & Mc.DONAL, 1995), este último parámetro se obtiene mediante interpolación lineal de los valores de germinación más cercanos a la germinación media, según la fórmula: $T_{50} = t_i + [((N+1)/2 - n_i) \times (t_j - t_i) / (n_j - n_i)]$ donde **N** es el número final de semillas germinadas y, **n_i** y **n_j** los números de semillas germinadas para los tiempos **t_i** y **t_j**, siendo $n_i < (N+1)/2 < n_j$ (COOLBEAR & *al.*, 1980; THANOS & DOUSSI, 1995). La representación de los valores acumulados de germinación frecuentemente presentan una forma sigmoidea en la que el valor del parámetro **T₅₀** se sitúa próximo al punto de inflexión de la curva, momento de gran importancia en el desarrollo del experimento (GEORGHIOU & *al.*, 1987). También se ha calculado el índice de vigor **Iv** expresado bajo la fórmula general $Iv = (a/1 + b/2 + c/3 + \dots + z/n) \times 100/s$ donde **a**, **b**, **c**,... **z**, es el número de semillas germinadas en el día **1**, **2**, **3**,..., **n**; **n** el número total de días que dura el experimento y **s**

el número total de semillas sembradas (JAIN & SAHA, 1971). Los valores de este parámetro que también cuantifica la velocidad de germinación pueden oscilar entre 0 - 100, habiéndose acotado los siguientes valores: **Iv** < 5, para velocidades de germinación lenta; $5 \leq Iv \leq 11.11$ mediana; $11.11 \leq Iv \leq 33.33$ ligera y **Iv** ≥ 33.33 rápida (BRADBEER, 1988). Para la caracterización morfoanatómica de las semillas se ha seguido el protocolo adoptado en el trabajo sobre *Prácticas de Germinación en los Bancos de Semillas de la Red Genmedoc* (ANÓNIMO, 2004-2006), fundamentado en los trabajos de MARTIN (1946), MARTIN & BERKLEY (2000), STEARN (1992), WERKER (1997) y BASKIN & BASKIN (2007) y desarrollado dentro del proyecto transnacional GENMEDOC por la red de Bancos de Semillas del Mediterráneo (GENMEDA). Los valores cuantitativos se midieron con un pie de rey digital DIN 866 con un error máximo de ± 0,02 mm.

La evaluación de los parámetros de germinación se realizó mediante el software libre R 2.6.0. RC. El análisis estadístico aplicó a los datos el test de normalidad de Shapiro-Wilk y el de homogeneidad de varianzas de Levene (v. SOKAL & ROHLF, 1995). Posteriormente se realizó un análisis de la varianza de un factor (ANOVA de una vía) y una comparación múltiple entre los distintos niveles de tratamiento utilizados, en este caso para las cuatro condiciones de temperaturas diferentes, mediante el test "pos hoc" de Tukey. Los niveles de significación estadística se establecieron con un intervalo de confianza del 95 % ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Colección viva por cultivo *ex situ*

Los trabajos de creación de una co-

lección viva de planta por cultivo *ex situ* comenzaron durante el mes de mayo de 2005 con la recolección de los frutos. Conforme a nuestras observaciones, los frutos son aquenios recubiertos por un antocarpio extremadamente glanduloso, que se adhiere con facilidad a otras superficies (pelo de animales, piel humana, tejidos, etc.) asegurando la dispersión exozoócora; además, si son mojados, los antocarpos se recubren de una gruesa capa mucilaginosa, que los hace aún más fáciles de transportar; este comportamiento se da igualmente en algunas especies norteamericanas (v. DOUGLAS, 2007). En este tiempo se recolectaron 42 aquenios de tres individuos de la población original de Teulada. Después de un proceso de limpieza manual extrayendo el antocarpio, tan sólo 14 frutos (33%) del total recolectados resultaron no estar abortados o con semillas defectuosas o malformadas. Tras este primer cribado del material, se realizó un estudio previo para evaluar el estado de viabilidad de las semillas bajo condiciones preliminares de ensayo a

15/20 °C 12/12, desinfectando previamente el material con lejía durante 1h e imbibiéndolo en agua desionizada 24h. Tras un período de 30 días en placa, no se observó germinación alguna y las semillas fueron retiradas y sembradas en un semillero bajo condiciones ambientales de invernadero, sobre un sustrato de turba y coco (2:1).

Pasados 30 días bajo estas condiciones de siembra, se obtuvo germinación y emergencia de los cotiledones en un total de 7 plántulas, el 50% de las semillas sembradas inicialmente. Después de 30 días de crecimiento, habiendo alcanzado un tamaño entre 3 y 5 cm de altura aproximadamente, las plántulas obtenidas fueron repicadas a un contenedor de 650 cc (75 x 77 x 180 mm) con un sustrato de turba negra y arcilla (2:1), y posteriormente fueron trasladadas al exterior, a temperatura y humedad ambiente. El crecimiento de las plantas fue rápido, alcanzando una altura de 20 cm de media en un período de 60 días desde su siembra (Figura 2).



Figura 1. Plantulas de *Boerhavia repens* con 15 días de edad. Barra; 5 mm.

Después de esta etapa, el crecimiento vegetativo fue acompañado con la producción de flores y frutos durante el mes de noviembre, pero posteriormente las flores comenzaron a ennegrecerse y a secarse, al tiempo que se detuvo el crecimiento, no alcanzando la fructificación. A mediados del mes de diciembre las hojas y ramas también comenzaron un proceso de desecación, hasta que todas las partes

aéreas de la planta murieron, momento en el cual se decidió trasladar la planta de nuevo al invernadero. La base del tallo se mantuvo firme, y a principios de febrero del siguiente año las 7 plantas cultivadas rebrotaron, pero el color de las hojas presentaba un tono más amarillento que durante la primera temporada, mostrando también un crecimiento más lento que en el otoño anterior, llegando a alcanzar un

tamaño de 50–60 cm aproximadamente. En este momento fueron trasplantadas a un contenedor de mayor volumen, 5.500 cc. (17x30 Ø int.x h). Durante el mes de abril comenzaron a desarrollar flores y frutos hasta bien entrado el siguiente invierno.



Figura 2. Planta obtenida en cultivo *ex situ* a partir de semillas recolectadas de la población natural de Teulada (Alicante).

Accesiones y duplicado de germoplasma

A partir de las plantas madre mantenidas en la colección viva, se ha recolectado

durante los primeros años de cultivo gran cantidad de semillas para su conservación a medio y largo plazo. Las semillas, una vez limpias y separadas de impurezas, fueron debidamente desecadas en una cámara de deshidratación y con la ayuda de gel de sílice con indicador violeta de metilo y libre de cobalto, alcanzando contenidos de humedad interna entorno al 3%. Posteriormente, para la colección activa o conservación a corto plazo las muestras fueron envasadas en frascos de vidrio ámbar de boca roscada de 30 ml. con tapa de plástico a rosca PILFER, para la colección de base se envasaron en frascos herméticamente cerrados con capacidad de 10 ml. y con apertización con junta de goma (cf. GÓMEZ-CAMPO, 2002). Para el caso de la colección activa en el que las semillas son utilizadas para producción y trabajos experimentales, las accesiones se conservan en cámara fría a 4°C, mientras que para la colección base permanecen a -18°C (cf. I.B.P.G.R., 1985; F.A.O./I.P.G. R.I., Genebank Standards, 1994), ambos lotes están incluidos en la colección ‘AMENAZADA’ en el Banco de Semillas Forestales del CIEF (Tabla 1).

Tabla 1. Relación de las accesiones de *B. repens* conservadas en la colección de base y a corto plazo en la colección AMENAZADA.

Accesión	Fecha	Peso (g)	Aguenios	T (°C)
A23DB1	VI-07	0,125	50	-18
A23BB1	XI-06	3,381	1500	4
A23B	XI-06	2,069	2000	4
A23B2	XI-06	5	2200	4
A23B3	XI-06	2,5	1100	4
A23C	VII-06	11,038	4905	4
A23E	IX-07	1,126	500	4

*Peso de 100 frutos = 0,225 g

Para la conservación a largo plazo o colección base, el lote está constituido por las accesiones A23BB1, y A23DB1, la primera con semillas procedentes de planta madre cultivada *ex situ* y la segunda

con semillas de la población natural. El lote conservado en la colección activa contiene las accesiones A23B y A23E, ambas con germoplasma procedente de planta madre. Para incrementar la eficacia y la garantía de la conservación de este germoplasma, se ha desarrollado un programa de duplicado de muestras con varias instituciones dedicadas a la conservación *ex situ* de material vegetal de flora silvestre. Así, se han incorporado muestras en las colecciones del Banco de Germoplasma del Institut Scientifique de Rabat (ISR), el Banco de Germoplasma del Jardín Botánico de la Universidad de Valencia (BGJBUV) y el Banco de Germoplasma de la Dirección General del Medio Natural de la Región de Murcia (BGDGMNM), dentro del marco de trabajo desarrollado por la red GENMEDA. En estos centros se han incluido las accesiones A23C (ISR); A23B2 (BGJBUV) y A23B3 (BGDGMNM), todas con semillas procedentes de las plantas madre (Tabla 1). La representación del germoplasma de esta población como accesiones-réplica en colecciones presentes en otros centros es una estrategia de duplicación que asegura una preservación *ex situ* del germoplasma más efectiva, al tiempo que permite el intercambio de metodologías y experiencias con otros bancos de semillas que trabajan con flora silvestre singular (www.genmedoc.org).

Caracterización y test de germinación

Para realizar los ensayos de germinación se han utilizado las semillas recolectadas de la primera producción de las plantas madre que se mantienen en vivero. Con este material ha sido posible realizar una primera caracterización morfoanatómica de las semillas de *B. repens*. Los resultados obtenidos muestran un tamaño medio de $(2,72)\text{-}2,22 \pm 0,76\text{-}(2,01) \times (0,89)\text{-}0,76 \pm 0,11\text{-}(0,47)$ mm

($n=30$), de tipo endospermada o albuminosa, con perispermo cristalino granular, de contorno elíptico (3:1), sección circular (1:1)* y color crema, sin estructuras macromorfológicas exteriores, con dos bandas ornamentales de color marrón-rojizo y un embrión en disposición periférica, alargado, curvado y grande.

En los test de germinación, se han obtenido tres curvas sigmoideas para la representación de los valores acumulados de germinación diaria en condiciones de 25°C, 20°C y 15/20°C y un resultado nulo para la condición de germinación ensayada a 10/20°C. El intervalo de tiempo entre la primera y la última semilla germinada es 16 días bajo condiciones de 25°C y 22 días a 20°C y 15/20°C, alcanzándose el punto máximo promedio de germinación en el segundo día para el primer caso, con un porcentaje medio de germinación máxima diaria (G. máx. diaria) del 52% y en el cuarto día para el segundo y tercer caso, con G. máx. diaria de 17% y 4% respectivamente. El último día de germinación se sitúa en el décimo octavo a 25°C, en el vigésimo cuarto a 20°C y en el vigésimo sexto a 15/20°C (Figura. 3).

El análisis estadístico muestra que existen diferencias significativas entre los diferentes niveles de temperatura aplicados a las semillas de *B. repens* en los ensayos de germinación ($F_{0,05 (3,12)} = 13,332$; $p < 0,001$). El porcentaje promedio de la capacidad germinativa para el ensayo a 15/20°C fue del 8%, con un 92% de inviabilidad. La aplicación de las condiciones de temperatura constante de 25°C elevó de manera significativa la germinabilidad a un 73%, quedando rebajada a un 27% la inviabilidad, en condiciones de 20°C este porcentaje obtuvo el valor de 41% (Figura 4; Tabla 2). El resultado del análisis ANOVA aplicado a la velocidad de germinación (T_{50}) mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($F_{0,05 (3,12)} = 3,775$; $p < 0,05$),

resultando menor a 25°C ($T_{50}= 1,62$) que a 20°C ($T_{50}= 9,11$) y a 20/15°C ($T_{50}= 11,26$). El índice de vigor resultó dar una velocidad de germinación rápida ($Iv = 61,47$) a 25°C, ligera ($Iv=24,79$) a 20°C y lenta ($Iv= 2,85$) a 15/20°C, apareciendo igualmente diferencias significativas entre los diferentes tratamientos aplicados ($F_{0,05(3, 12)} = 5,373$; $p < 0.05$) (Tabla 2).

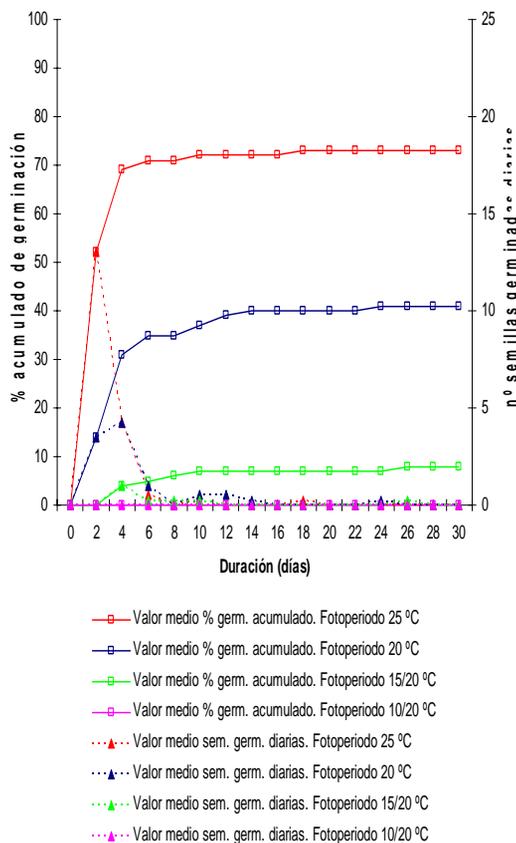


Figura 3. Curvas de germinación de *B. repens* a diferentes condiciones de ensayo (1: 25°C; 2: 20°C; 3: 15/20; 4: 10/20°C).

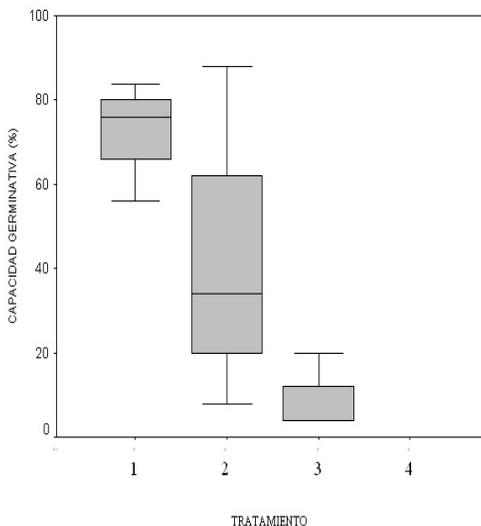


Tabla 2. Comparación múltiple mediante el test de Tukey entre los diferentes tratamientos en varios de los parámetros estudiados. (1: 25°C; 2: 20°C; 3: 15/20°C; 4: 10/20°C; C.G: Capacidad germinativa).

Comparación tratamientos	p-valor (Sig.)		
	C.G.	T_{50}	Iv
1-2	0,115	0,537	0,925
1-3	0,001*	0,081	0,044*
1-4	0,001*	0,990	0,034*
2-3	0,101	0,572	0,125
2-4	0,035*	0,378	0,099
3-4	0,924	0,049*	0,999

*La diferencia entre las medias es significativa al nivel de 0,05.

DISCUSIÓN

El bajo número de efectivos poblacionales y las eminentes amenazas que sufre la población aquí analizada de *Boerhavia repens* han motivado la prioridad de actuación con esta especie a través de un programa de conservación integrada. Este modelo incluye actuaciones *in situ*, como la creación de una población de seguridad

y técnicas *ex situ*, como la ya citada creación de una colección viva o la recolección de semillas para la creación de accesiones y su ingreso en bancos de germoplasma.

La creación de una colección viva, entre otras cosas, permite el seguimiento y estudio del comportamiento y desarrollo de las plantas, al tiempo que abastece de semilla para la producción de planta y creación de accesiones, aunque lo óptimo sea, siempre y cuando sea posible, la recolección de semillas del medio natural a partir de poblaciones silvestres. Estas colecciones *ex situ* son de gran interés en trabajos de conservación integrada con plantas silvestres amenazadas, particularmente cuando se trata de especies con graves problemas de reclutamiento poblacional y de supervivencia de las plántulas en campo durante los primeros estadios de vida, como es el caso de *B. repens* (CRESPO, 2003). La obtención de protocolos adecuados de producción resulta una herramienta de gran utilidad al proporcionar una fuente de material de propagación disponible para ser utilizada en trabajos *in situ*, reduciendo así la presión sobre las poblaciones naturales.

En la fase de conservación y almacenamiento del germoplasma, los datos aportados por los últimos estudios (GÓMEZ-CAMPO, 2002; GÓMEZ-CAMPO, 2006; PÉREZ-GARCÍA, 2007) revelan la importancia de la ultradesecación de las semillas hasta valores por debajo del 3% junto con la hermeticidad de los recipientes como los dos parámetros más importantes para conservar la germinabilidad a largo plazo. Esta información ha sido de gran utilidad para establecer sublotos conservados a largo plazo a 4 °C (A23BB1) a partir de lotes almacenados a -18°C en la colección de base, esto ha supuesto aumentar la combinación de modelos para la conservación del germoplasma de esta especie dentro de la colección AMENAZADA.

El estudio del comportamiento germinativo con *B. repens* ha permitido establecer y perfeccionar el protocolo de germinación óptimo que permita disponer de planta en futuros trabajos. Al mismo tiempo, este tipo de datos (GÓMEZ-CAMPO, 1985b; HERRANZ & *al.*, 2002) constituye una fuente valiosa de información para en el seguimiento de la viabilidad de las semillas contenidas en las diferentes accesiones incluidas en la colección AMENAZADA. En el análisis de los datos de germinación, la alta variabilidad obtenida entre réplicas de un mismo ensayo evidencia cierto grado de heterogeneidad en las muestras estudiadas; esto puede ser en parte explicado por el bajo tamaño muestral utilizado, tanto de semillas empleadas como de réplicas ensayadas. En este sentido, según los criterios de I.S.T.A. (1985) para una alta fiabilidad y representatividad de los datos se recomienda el estudio de 400 semillas, es decir, cuatro réplicas de 100 semillas cada una. Este número resulta en determinadas circunstancias demasiado elevado, sobre todo cuando se trabaja con especies endémicas, raras o amenazadas, en el que en muchas ocasiones hay serias limitaciones en la recolección y obtención de semilla. Por este motivo, los ensayo con *B. repens* han sido realizados con 25 semillas/placa, tal y como se ha venido realizando en los últimos años en estudios precedentes con flora endémica (i.e. AYERBE & CERESUELA, 1982; PÉREZ-GARCÍA & DURAN, 1989; MASELLI, & *al.*, 1999). Los parámetros de germinación evaluados indican que las semillas ensayadas a temperaturas elevadas y constantes germinan rápidamente, alcanzando su máxima capacidad germinativa tras la primera semana o semana y media de ensayo presentando un periodo de latencia inferior a cuatro días. Por el contrario, los ensayos estudiados a temperaturas alternantes han dado como resultado un segundo tipo de curva, produciéndose la germinación de

forma lenta y escalonada. Bajo estas condiciones se ha alcanzado un bajo número de semillas germinadas y una tasa de germinación muy lenta. Este bajo porcentaje en la germinabilidad puede ser debido a que las condiciones de ensayo aplicadas no son las adecuadas para conseguir una plena germinación, pero también es necesario considerar que un período de 30 días de incubación puede ser insuficiente para alcanzar el máximo porcentaje de germinación.

La germinación de las Nyctagináceas, y en particular del grupo morfológico al que pertenece *Boerhavia*, parece ser muy variable, apareciendo tanto casos de especies con bajas tasas germinativas (v. HALVORSON & GUERTIN, 2003, para *B. coccinea*) como de plantas que germinan con relativa facilidad (v. NICHOLS, 2005, para todas las especies de *Boerhavia* y *Commicarpus* en Sudáfrica). En consecuencia, el comportamiento de *B. repens* subsp. *repens* no puede deducirse fácilmente de los datos de otros congéneres, aconsejando que se profundice en su estudio pormenorizado.

A partir de todos estos datos, la gran rareza y el alto grado de amenaza de *B. repens* aconsejaron desde un primer momento una adecuada inversión para asegurar su preservación en el tiempo (CRESCO, 2003). Al igual que ocurre con otras muchas especies en el territorio valenciano, para esta especie existe un vacío legal para su conservación, no habiéndose registrado hasta la fecha en ninguna figura de protección (DEVESA & ORTEGA, 2004) ni tampoco figurando su población dentro de ninguna área natural protegida (cf. LAGUNA & al., 2004). Frente a esta falta de acciones de conservación pasiva, ha sido necesario el trabajo desde la perspectiva activa y el diseño de una estrategia de actuación integral, aún siendo conscientes de la importancia relativa que tienen este tipo de trabajos en los que se

trata la conservación de localidades disjuntas o marginales de especies con grandes áreas de distribución, frente a aquellos otros dedicados a taxones seleccionados en respuesta a la primacía del factor endemidad (cf. HARTLEY & KUNIN, 2003; KELLER & BOLLMANN, 2004).

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ FERNÁNDEZ, I. (compil.) (2001) *Claves de Flora Iberica. Vol 1*. Real Jardín Botánico-CSIC. Madrid.
- ANÓNIMO (2004-2006) *Prácticas de germinación en los bancos de semillas de la red GENMEDOC*. Proyecto Interreg III B Medocc. www.genmedoc.org/articulo.aspx?i=253&j=17&lang=
- AYERBE, L. & J.L. CERESUELA (1982) Germinación de especies endémicas españolas. *Anales I.N.I.A. Serie forestal* 6: 17-41.
- BACCHETTA, G., G. FENU, E. MATTANA, B. PIOTTO & M. VIREVAIRE. (2006) *Manuale per la raccolta, studio, conservazione e gestione ex-situ del germoplasma*. 248 pp. APAT, Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici. Roma. www.ccb-sardegna.it/download/publicazioni/manuali/Manuale_germoplasma.pdf
- BAÑARES, A. (2001) Recuperación de la flora amenazada de los parques nacionales canarios: Metodología para su planificación y ejecución. *Ecología* 8: 227-244.
- BAÑANES, A., M. MARRERO, E. CARQUÉ & P. SOSA (2001) Biología de la conservación de la flora amenazada de los parques nacionales canarios. In C. Gómez-Campo (ed.): *Conservación de especies vegetales amenazadas en la región mediterránea occidental. Una perspectiva de fin de siglo*: 35-62. Fundación Ramón Areces. Madrid..
- BAÑARES, A., G. BLANCA, J. GÜEMES, J. C. MORENO & S. ORTIZ (eds.) (2003) *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España*. 1072 pp. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Madrid.
- BASKIN, C.C. & J.M. BASKIN (2007) A revision of Martin's seed classification system, with particular reference to his dwarf-seed type. *Seed Science Research* 17: 11-20.

- BEWLEY, J.D. & M. BLACK (1994) *Seeds: physiology of development and germination*. 2ª Ed. Plenum Press. New York.
- BGCS (1989) *The Botanic Gardens Conservation Strategy*. IUCN Botanic Gardens Conservation Secretariat and WWF. Gland.
- BOLÓS, O., J. VIGO, R M. MASALLES & J. M. NINOT (2005) *Flora manual dels Països Catalans*. 3ª Edició. Ed. Pòrtic. Barcelona.
- BRADBEER, J.W. (1988) *Seed dormancy and germination*. Blackie. New York.
- BROWN, R.F. & D.G. MAYER (1988) Representing cumulative germination. 1. A critical analysis of single-value germination indices. *Annals of Botany* 61(2): 117-125.
- COOLBEAR, P., D. GRIERSON & W. HEY-DECKER (1980) Osmotic pre-sowing treatments and nucleic acid accumulation in tomato seeds (*Lycopersicon lycopersicum*). *Seed Sci. Technol.* 8: 289-303.
- COPELAND, L. O. & M. B. Mc.DONALD (1995) *Principles of seed science and technology*. 3ª Ed. Chapman & Hall. New York.
- CRESPO, M.B. (2003) *Boerhavia repens* L. subsp. *repens*. In: A. Bañares & al. (eds.), *Atlas y libro rojo de la flora vascular amenazada de España*: 144-145. Organismo Autónomo Parques Nacionales. Ministerio del Medio Ambiente. Madrid.
- DEVESA, J.A. & A. ORTEGA (2004) *Especies vegetales protegidas en España: plantas vasculares. (Península Ibérica y Baleares)*. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid
- DOUGLAS, N.A. (2007) *Molecular phylogenetic studies in Nyctaginaceae: Patterns of diversification in arid North America*. Ph.D, Dissertation. Duke University. http://dukespace.lib.duke.edu/dspace/bitstream/10161/188/1/D_Douglas_Norman_a_052007.pdf
- ELLIS, R.H. & E.H. ROBERTS (1980) Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany* 45: 13-30.
- ELLIS, R.H., T.D. HONG & E.H. ROBERTS (1989) A comparison of the low moisture content limit to the logarithmic relation between seed moisture and longevity in twelve species. *Annals of Botany* 63: 601-611.
- ESTEVE, F. (1959) *Boerhaavia plumbaginea* Cav., en Alhama de Murcia: su localización y ecología. *Anales Inst. Bot. Cavanilles* 16: 485-504.
- FALK, D. (1990) Integrated strategies for conserving plant genetic diversity. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 77 (1): 38-47.
- F.A.O./I.P.G.R.I., Genebank Standards (1994) *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. International Plant Resources Institute. Rome.
- GEORGHIU, K., S.K. TSELAS & C.A. THANOS (1987) Phytochrome activator and osmoconditioning of tomato seeds. *Plant Physiology (Life Science Advances)* 6: 93-97.
- GENMEDOC (2004-2006) *Réseau de Centres de Conservation du Matériel Génétique de la Flore Méditerranéenne de l'Espace Medocc*. Proyecto Transnacional INTERREG IIIB MEDOCC. (www.genmedoc.org).
- GIVEN, D.R. (1994) *Principles and practices of Plant Conservation*. Chapman & Hall. Londres.
- GÓMEZ-CAMPO C. (1979) The role of seed banks in the conservation of Mediterranean flora. *Webbia* 34 (1): 101-107.
- GÓMEZ-CAMPO C. (1985a) *The Conservation of Mediterranean Plants: Principles and Problems*. In C. Gómez-Campo (ed.): *Plant Conservation in the Mediterranean Area*: 3-8. Col Geobotany nº 7. W. Junk Publ.. Dordrecht.
- GÓMEZ-CAMPO C. (1985b) *Seed bank as an emergency conservation strategy*. In GÓMEZ-CAMPO, C. (ed.) *Plant Conservation in the Mediterranean Area*: 237-247. Col Geobotany nº 7. W. Junk Publ. Dordrecht.
- GÓMEZ-CAMPO C. (1987) A strategy for seed banking in botanic gardens: some policy considerations. In D. Bramwell & al.: *Botanic Gardens and the World Conservation Strategy*: 151-160. Academic Press, Londres.
- GÓMEZ-CAMPO, C. (2002) Long term seed preservation: the risk of selecting inadequate containers is very high. *Monographs ETSIA, Univ. Politécnica de Madrid* 163: 1-10.
- GÓMEZ-CAMPO, C. (2006) Long term seed preservation: updates standards are urgent. *Monographs ETSIA, Univ. Politécnica de Madrid* 168: 1-4.
- GREUTER, W, H.M. BURDET & G. LONG (1989) *Med-Checklist*, vol 4. Genève, Berlin.
- HALVORSON, W.L. & P. GUERTIN (2003) *Boerhavia coccinea* P. Mill. U.S. Geological Survey-National Park Service. Accedido en II-2008 en: <http://sdfsnet.snr.arizona.edu/data/sdrs/ww/docs/boercocc.pdf>.
- HARTLEY, S. & W.E. KUNIN (2003) Scale dependency of rarity, extinction risk, and

- conservation priority. *Conservation Biology* 17 (6): 1559-1570.
- HONG, T.D., S. LININGTON & R.H. ELLIS (1996) *Seed storage behaviour: A compendium*. Hnadbooks for Genebanks nº 4. IPG RI. Roma.
- HERNÁNDEZ BERMEJO, J.E., M. CLEMENTE & V. HEYWOOD (eds.) (1990) *Conservation techniques in Botanic Gardens*. Koeltz. Koenigstein
- HERRANZ, J.M., P. FERRANDIS, M.A. COPEPE & J.J. MARTÍNEZ-SÁNCHEZ (2002) Influencia de la temperatura de incubación sobre la germinación de 23 endemismos vegetales ibéricos o iberoafricanos. *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales* 17 (2): 229-245.
- I.B.P.G.R. (1985) *Handbook of seed technology for genebanks. Vol I. Principles and Methodology. Handbooks for genebanks: n. 2*. International Board for Plant Genetic Resources. Roma.
- I.S.T.A. (Internat. Seed Testing Assoc.) (1985) *Handbook on tetrazolium testing*. Zürich.
- JAIN, N.K. & J.R. SAHA (1971) Effect of storage length on seed germination in jute (*Corchorus* spp.). *Agron. J.* 63: 636-638.
- KELLER, V. & K. BOLLMANN (2004) From red list to species of conservation concern. *Conservation Biology* 18 (6): 1636-1644.
- LAGUNA, E. (coord.) (1998) *Flora endémica, rara o amenazada de la Comunidad Valenciana*. Generalitat Valenciana. Conselleria de Medio Ambiente. Valencia.
- LAGUNA, E., V.I. DELTORO, J. PÉREZ-BOTELLA, P. PÉREZ-ROVIRA, L. SERRA, A. OLIVARES & C. FABREGAT (2004) The role of small reserves in plant conservation in a region of high diversity in eastern Spain. *Biological Conservation* 119: 421-426.
- LEBRUN, J.P. & A.L. STORK (1991-1997). *Enumeration des plantes à fleurs d'Afrique Tropicale*. Conservatoire et Jardins Botaniques de la Ville de Genève. Ginebra.
- LÓPEZ GONZÁLEZ, G. (ed.) (1990) *Nyctaginaceae*. In CASTROVIEJO, S. (ed.): *Flora Iberica*, 2: 57-61. Real Jardín Botánico-CSIC. Madrid.
- MARTIN, A.C. (1946) The comparative internal morphology of seeds. *American Midland Naturalist* 36 (3): 513-660.
- MARTIN, A.C. & W.D. BARKLEY (2000) *Seed Identification Manual*. Cadwell. New Jersey. The Blackburn Press.
- MASELLI, S., F. PÉREZ-GARCÍA & I. AGUINAGALDE (1999) Evaluation of seed storage conditions and genetic diversity of four crucifers endemic to Spain. *Annals of Botany* 84: 207-212.
- MATEO, G. & M.B. CRESPO (2003) *Manual para la determinación de la flora valenciana*. Valencia.
- NICHOLS, M. (2005). *Growing rare plants: a practical handbook on propagating the threatened plants of southern Africa*. SABONET Reports nº 36. South African Botanical Diversity Network (SABONET). Pretoria. http://www.sabonet.org.za/reports/publications_report36.htm
- PÉREZ-GARCÍA, F. & J. M. DURAN (1989) Germinación de especies endémicas de las regiones Mediterránea occidental y Macaronésica. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* 4(1): 25-33.
- PÉREZ-GARCÍA, F., M.E. GONZÁLEZ-BENITO & C. GÓMEZ-CAMPO (2007) High viability recorded in ultra-dry seeds of 37 species of *Brassicaceae* after almost 40 years of storage. *Seed Science and Technology* 35 (1): 143-153.
- PROBERT, R.J. (2003) *Seed viability under Ambient Conditions, and the importance of drying*. In R.D. SMITH & al. (eds.) *Seed conservation: turning science into practice*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- RANAL, M.A. & D. GARCÍA de SANTANA (2006) How and why to measure the germination process?. *Revista Brasil. Bot.* 29 (1): 1-11.
- RIGUAL, A. (1972) *Flora y vegetación de la provincia de Alicante*. Instituto de Estudios Alicantinos. Diputación Provincial. Alicante.
- RIGUAL, A. (1973) Un *Anarrhinum* nuevo para la flora europea (*Anarrhinum fruticosum* Desf. subsp. *fruticosum*). *Anales Inst. Bot. Cavanilles* 30: 89-97
- ROBERTS, E.H. (1973) Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1: 499-514.

- SERRA, L., C. FABREGAT, J.J. HERRERO-BORGOÑÓN & S. LÓPEZ UDIAS (2000) *Distribución de la flora vascular endémica, rara o amenazada en la Comunidad Valenciana*. Generalitat Valenciana. Conselleria de Medio Ambiente. Valencia.
- SERRA, L. (2005) *Estudio crítico de la flora vascular de la provincia de Alicante: Aspectos nomenclaturales, biogeográficos y de conservación*. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante.
- SOKAL, R.R. & F.J. ROHLF (1995). *Biometry. The principles and practice of Statistics in Biological Research*. 3ª ed. Nueva York.
- SOLER, J.X. (1995) Primera cita de *Boerhavia repens* L. (*Nyctaginaceae*) para la flora ibérica. *Anales Jard. Bot. Madrid* 53(1): 123-125.
- SPELLENBERG, R. (2001). *Nyctaginaceae*. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes, fasc. 93. INECOL, Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México D.F. <http://www.ecologia.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/Flora%2093.pdf>
- STEARN, W.T. (1992) *Botanical Latin*. 4th Edition. David & Charles Publishers.
- SUNDERLAND, T.C., P. BLACKMORE, N. NDAM & J. NKEFOR (2002) *Conservation through cultivation: the work of the Limbe Botanic Garden, Cameroon*. In M. Maunder & al. (Eds.) *Plant Conservation in the Tropic. Perspectives and Practices*: 395-419. Royal Botanic Gardens, Kew.
- SUSZKA, B., C. MULLER & M. BONNET-MASIMBERT (1994) *Graines des feuillus forestiers. De la récolte au semis*. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Paris.
- THANOS C. A. & M.A. DOUSSI (1995) Ecophysiology of seed germination in endemic labiates of Crete. *Isr. J. Plant Sci.* 43: 227-237.
- THOMPSON, P.A. (1970) Seed banks as a means of improving the quality of seed lists. *Taxon* 19: 59-62.
- UICN (1994) *Categorías de las Listas Rojas de la UICN*. 22 pp. *Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN*. UICN. Gland y Cambridge.
- UICN (2001) *Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN: Versión 3.1*. Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN. Gland y Cambridge.
- VV.AA. (2000) Lista Roja de Flora Vascular Española (valoración según categorías UICN). *Conservación Vegetal* 6 (extra): 11-38.
- WERKER, E. (1997) *Seed Anatomy*. Encyclopedia of plant anatomy. Tome X, 3. Gebr. der Borntraeger, Berlín.
- WYSE-JACKSON, P.S. & L.A. SUTHERLAND (2000) *International Agenda for Botanic Gardens in Conservation*. Botanic Gardens Conservation International, U.K.

(Recibido el 14-II-2008)