

Polinización manual para cruzamientos



# CAPÍTULO 7. OBTENCIÓN DE MATERIAL DE REPRODUCCIÓN EN LA COMUNIDAD VALENCIANA

P. Pablo Ferrer-Gallego<sup>1,2</sup>, Inmaculada Ferrando-Pardo<sup>1,2</sup>, Francisco J. Albert Llana<sup>1,2</sup>, Víctor Martínez<sup>1,2</sup> y Emilio Laguna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Vida Silvestre, Centro para la Investigación y Experimentación Forestal de la Generalitat Valenciana (CIEF)  
<sup>2</sup>VAERSA. Generalitat Valenciana.

## 7.1. Introducción

La jara de Cartagena (*Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis*) representa un reto para el conservacionismo de la flora española, y hasta fechas recientes el principal hándicap para desarrollar un programa de conservación de esta planta en el territorio valenciano ha sido la obtención de material vegetal de reproducción puro, y no hibridado con otras especies del género. Además, esta falta de germoplasma para la producción de planta venía impuesta por la propia condición de quasi-autoincompatibilidad o autoesterilidad de la especie y la realidad de existir solo un ejemplar silvestre conocido en el medio natural (Laguna *et al.*, 1998, 2016; Güemes *et al.*, 2004; Aguilera *et al.*, 2010), localizado en el término municipal de Poble de Vallbona.

Así, cumplir con el objetivo de mejorar el estado de su conservación mediante el aumento del número de poblaciones y efectivos, fin último de todo plan de conservación y recuperación de una especie, pasa ineludiblemente por la propagación, multiplicación y producción de planta para trabajos de traslocación. No obstante, realizar estas acciones choca en esta especie con dos realidades que dificultan en extremo su ejecución: un alto grado de hibridación con *Cistus albidus*, detectado en la población murciana (Jiménez *et al.*, 2007; Pawluczyk *et al.*, 2012); y lo anteriormente mencionado, la existencia en el territorio valenciano de un sólo ejemplar nativo (Figura 7.1), considerado genéticamente puro, pero afectado por la autoincompatibilidad fecundativa propia de las especies del género *Cistus* (Boscaiu, 1999, 2000; Boscaiu y Güemes, 2001).



Figura 7.1. Aspecto del ejemplar silvestre valenciano en 2017.

Uno de los primeros trabajos para la multiplicación de su germoplasma fue la multiplicación *in vitro* del ejemplar nativo valenciano. Así, a principios de la década de los años 90 del pasado siglo, el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrícolas (IVIA) multiplicó mediante esta técnica el genotipo valenciano y obtuvo una importante colección de planta clonada (Arregui *et al.*, 1993). Estos clones se mantienen todavía en una colección de planta viva en las instalaciones del Centro para la Investigación y Experimentación Forestal (CIEF). No obstante, como se expondrá más adelante, en el apartado *Problemas de la multiplicación in vitro y análisis del material obtenido*, este proceso de multiplicación generó una serie de mutaciones en los clones que, aunque no parezcan expresarse en diferencias morfológicas, conllevaron a tomar la decisión de no utilizar estas plantas para los trabajos de implantación de ejemplares en campo. Durante los últimos años, el Servicio de Vida Silvestre de la Generalitat Valenciana, lleva a cabo un programa de recuperación para este taxon en el CIEF profundizando en la capacidad de multiplicación vegetativa del ejemplar silvestre valenciano, y en el conocimiento de su biología reproductiva y expresión sexual en la producción de semillas, principalmente diseñado para obtener material vegetal a partir de semillas.

El presente apartado de este libro recoge las experiencias realizadas y los resultados alcanzados en la obtención de material vegetal de reproducción de *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* libre de introgresión e hibridación con otras especies del género, tanto de origen sexual (a partir de la obtención de semillas) como vegetativo (a partir de su multiplicación mediante esquejes), en ambos casos partiendo del único ejemplar valenciano.

## 7.2. Obtención de material vegetal de reproducción

Se han aplicado diversas metodologías para la obtención de material de reproducción, realizándose las experiencias en las instalaciones del CIEF, sitas en Quart de Poblet (Valencia), o puntualmente sobre el ejemplar existente en La Pobla de Vallbona. Este centro de rescate genético vegetal y la localidad donde vive la especie se encuentran a apenas 15 km y poseen condiciones ambientales muy similares.

*Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* posee reproducción sexual por alogamia (fecundación cruzada) y se considera que tiene un alto grado de autoincompatibilidad para la producción de semillas a partir de un sólo ejemplar, aunque se ha constatado que se producen en pequeña cantidad en el ejemplar de La Pobla de Vallbona. Este fenómeno puede ocurrir igualmente sin polinización artificial en ejemplares cultivados, con una tasa de hasta el 5% de las flores/individuo (Boscaiu y Güemes, 2001) siendo la capacidad germinativa de las semillas obtenidas por autofecundación elevada (Navarro-Cano, 2002; Navarro-Cano *et al.*, 2009; Boscaiu, 1997, 1999; Boscaiu y Güemes, 2001). El estudio cariológico mostró que la planta posee dotación cromosómica diploide  $2n=18$  (Boscaiu *et al.*, 1997).

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

#### *Primeros ensayos de multiplicación del ejemplar silvestre valenciano*

El primer intento de cultivo de la especie tras el descubrimiento de la planta en 1986, se realizó entre 1987 y 1989 por la empresa de producción de planta autóctona Viveros Todolí S.L. teniendo éxito en el enraizamiento inicial, pero no en el mantenimiento posterior de los esquejes enraizados.

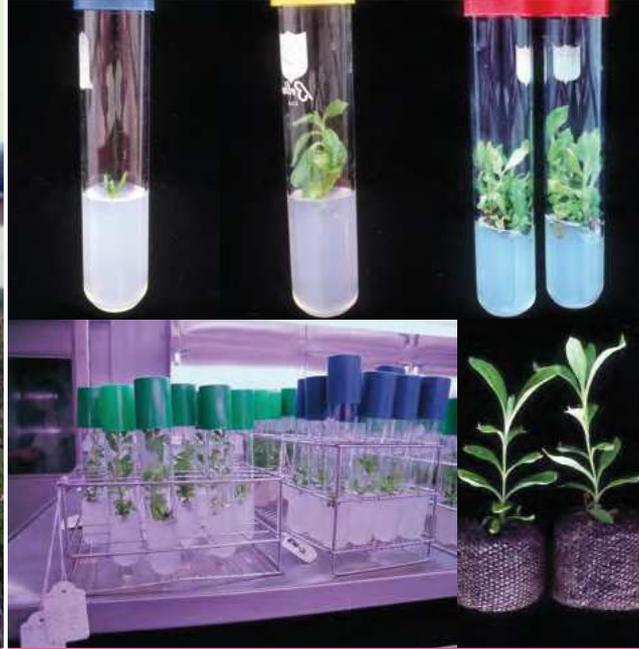
El 24 de abril de 1990 se recolectaron meristemos de la planta de La Pobla de Vallbona, por parte de la Unidad de Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro del IVIA (Figura 7.2), obteniéndose ese mismo año el protocolo exitoso de propagación, y en 1991 la primera floración de plantas en umbráculo. La multiplicación *in vitro* se realizó según el protocolo publicado por Arregui *et al.* (1993). Mediante este protocolo se ha multiplicado igualmente material murciano (Ros *et al.*, 2003). Toda la producción de planta valenciana se realizó hasta época reciente vía cultivo *in vitro* (Figura 7.3). Los ejemplares que se obtuvieron fueron en general homogéneos desde el punto de vista fenético, sin diferencias en sus caracteres morfológicos y fenológicos, aunque se detectaron ocasionalmente plantas algo diferentes, para las que se desconoce si las variaciones morfológicas corresponden a mutaciones somaclonales o a efectos ulteriores (ataques de insectos, sustratos de cultivo, factores ambientales, etc.). Sin embargo, los clones que se produjeron mediante esta técnica de multiplicación han seguido manteniendo la característica de autoesterilidad del

## Capítulo 7

ejemplar silvestre valenciano donante. Tanto en el ejemplar nativo como en los obtenidos *in vitro*, tras la caída de los pétalos y el cierre de los sépalos para iniciar la formación del fruto, se producía una abscisión temprana masiva de los pedúnculos florales, y sólo excepcionalmente se llegaba a observar un escaso número –usualmente de 1 a 4 flores por mata– que produjera frutos aparentes, aunque a menudo vacíos o con sólo 1-2 semillas inviables.



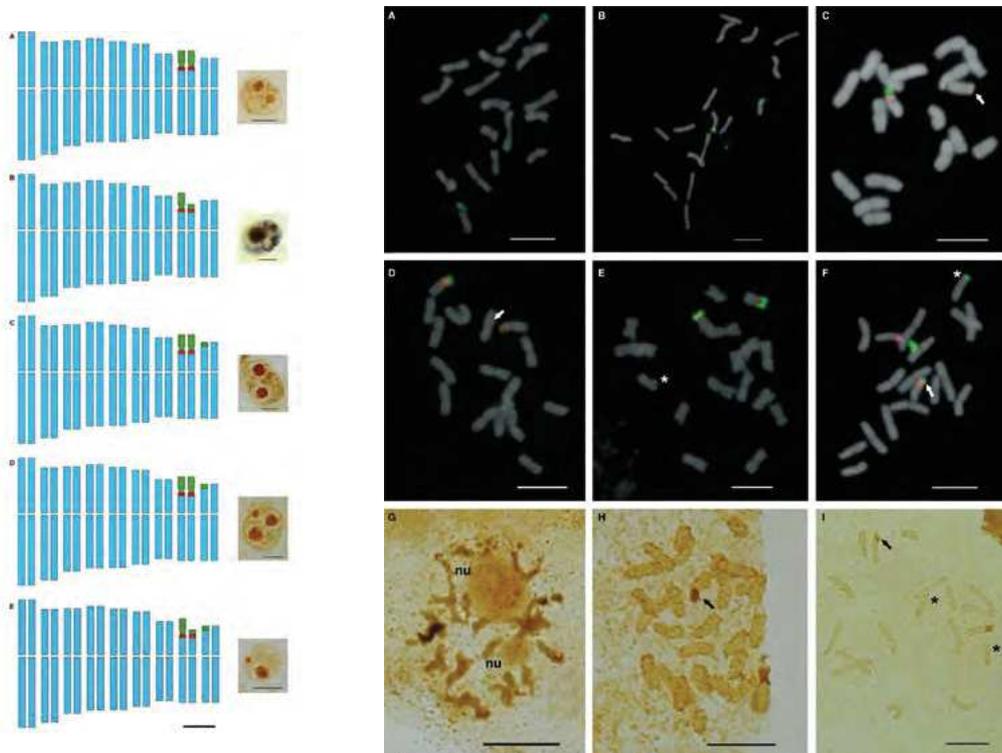
**Figura 7.2.** Recolección de meristemos de la planta de La Pobla de Vallbona por parte de la Unidad de Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrícolas (IVIA) en abril de 1990, acompañados del Dr. Manuel B. Crespo, descubridor de la planta valenciana.



**Figura 7.3.** Diferentes fases de la multiplicación *in vitro* de la jara de Cartagena. Fotografías cedidas por el IVIA.

### *Problemas de la multiplicación in vitro y análisis del material obtenido*

Un estudio realizado en colaboración con el equipo de Biología Molecular del Jardín Botánico de la Universitat de València –en adelante JBUV–, planteó comprobar si el material de *C. heterophyllus* producido *in vitro* podía exhibir mutaciones del ADN ribosomal nuclear. Los primeros resultados encontrados en los análisis cromosómicos y moleculares de los clones indicaron que se habían producido mutaciones (Rosato *et al.*, 2016), siguiendo además un esquema muy parecido al observado en los clones de *Limonium perplexum* que habían sido producidos mediante esta misma técnica (véase Ibáñez, 2013). Estas mutaciones o variaciones somaclonales, fueron transmitidas a la descendencia mediante los cruzamientos realizados con plantas mutantes y también a la descendencia resultante de cruzamientos con plantas no mutadas (Figura 7.4).



**Figura 7.4.** Mutaciones somáticas encontradas en los ejemplares clonados *in vitro* de *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis*. Gráficas y fotografías cedidas por el Laboratorio de Biología Molecular del JBUV.

Por lo tanto, el empleo de ejemplares mutantes en acciones de traslocación puede generar cambios en las estructuras genéticas de las poblaciones y las especies. Así, ante esta situación se considera desaconsejable la utilización de estos clones para ser utilizados en la multiplicación y producción de planta *ex situ* para ser introducidas en campo (Rosato *et al.*, 2016).

#### **Obtención de material de reproducción por vía vegetativa (esquejado)**

Otra de las vías de multiplicación vegetativa más importantes para la obtención de planta en muchas especies vegetales es el esquejado o estaquillado<sup>1</sup>. A finales de 2012 se recolectó material vegetativo del ejemplar de La Pobla de Vallbona para ensayar el cultivo mediante esta técnica obteniéndose resultados positivos. En el caso concreto de la aplicación de este método de multiplicación de la jara de Cartagena, se han utilizado vástagos tiernos o semileñosos, de al menos de 5 cm de longitud y con varios nudos, realizán-

1. Los esquejes son fragmentos de planta que se obtienen principalmente a partir de los tallos con sus respectivas yemas, hojas o raíces. La mayoría de los esquejes se toman del tallo y se clasifican en internodales —si proceden de las uniones de las hojas o nudos,— o nodales —si se toman a partir de la parte inferior de un nudo—. Los esquejes también pueden diferenciarse según el grado de desarrollo del tallo en: 1) tiernos: se obtienen a partir de los nuevos brotes que desarrolla la planta, normalmente en primavera. Poseen el potencial de enraizamiento más elevado, aunque el promedio de supervivencia es más bajo, porque pueden perder agua y secarse más rápidamente. Se recomienda mantenerlos en un ambiente muy húmedo y aireado; 2) semimaduros: los tallos son más robustos y presentan yemas desarrolladas. Se obtienen cuando se ralentiza el crecimiento de la planta, normalmente desde mediados del verano hasta el otoño-invierno, 3) leñosos: se toman de tallos lignificados de al menos un año de edad. Este tipo de esqueje tarda más tiempo en enraizar, pero al ser robustos tienen la ventaja de que su pérdida de agua es inferior. A menudo se prefiere utilizar un tipo mixto, el esqueje semileñoso, donde la parte basal está ya lignificada, pero en su extremo corresponde ya a un esqueje tierno o semimaduro.

## Capítulo 7

dose su cultivo a finales del otoño o principio de primavera. Se aplicó una mezcla comercial de hormonas de enraizamiento y fungicida (INABARPLANT I), compuesta por ácido 3 Indolbutírico (AIB) 0,1% (p/p) + ácido 1-Naftilacético (ANA) 0,1% (p/p) + Ziram 4% (p/p), lo que significativamente favorece la rizogénesis, que se logra pasadas 4-6 semanas. Los esquejes se mantuvieron en invernadero (10-20°C) y en condiciones de semisombra durante las primeras semanas, siempre con riego moderado. Posteriormente fueron viverizadas en umbráculos de adaptación, también en condiciones de semisombra (40-60% de luz solar).

El porcentaje de enraizamiento de las pruebas de esquejado es del 30-40% cuando se utilizan hormonas de enraizamiento, siendo ligeramente inferior (10-15%) cuando no se aplica la hormona. Los esquejes realizados en otoño (noviembre-diciembre) muestran siempre un mayor porcentaje de enraizamiento a los realizados en primavera.

Mediante esta técnica de clonación de planta se han obtenido ejemplares adultos reproductores al cabo de un año desde el esquejado (Figura 7.5). El método de cultivo empleado viene descrito más adelante en el apartado "Propagación y cultivo de planta con destino a introducciones en el medio natural".



**Figura 7.5.** Aspecto de las plantas obtenidas mediante esquejado a partir del ejemplar silvestre después de un año de cultivo (arriba) y en la actualidad 2017 (transcurridos 4 años).

No obstante, al igual que ocurriera en la multiplicación *in vitro*, los clones que se produjeron a partir de esquejes también han mantenido la característica de autoesterilidad. Por esta razón, ha sido necesario desarrollar un programa paralelo en el que se persiguiera la obtención de material de origen sexual, en el que hubiera existido recombinación cromosómica, con el objetivo de ser empleados en un plan de cruza-mientos asistidos con ejemplares obtenidos mediante esquejado, y conocer así la posibilidad de obtener planta capaz de generar semillas, como se expone en el siguiente apartado.

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

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

Aunque se había venido visitando regularmente el ejemplar de La Pobla de Vallbona desde el año 1990, no se localizaron frutos cuajados o con semillas viables hasta 2012. Una de las explicaciones podría ser que a partir de 2009 se realizaron riegos de apoyo al ejemplar silvestre durante diferentes épocas críticas del año y podría ser una de las hipótesis por la que en 2012 se logró obtener algunos frutos cuajados con semillas viables. También se pudieron recolectar en 2013, 2015 y 2017 (Tabla 7.1). En 2012 se recolectó únicamente un fruto que contenía 3 semillas, siendo tan solo una de ellas viable, aunque el ejemplar cultivado mostró caracteres teratológicos y total esterilidad. Los caracteres teratológicos han sido observados posteriormente en otros ejemplares, incluso con condiciones fenológicas, es decir, manifestándose únicamente en plantas no teratológicas en el momento de la floración. Los ejemplares que muestran estos caracteres raros son identificados como pertenecientes a un *Iusus naturae*, y descritos como *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* lus. *obstinatus* (Ferrer-Gallego *et al.*, 2015a).

La segunda recolección de semillas se realizó en el año 2013, y fue absolutamente excepcional, obteniéndose 142 semillas, de las cuales una parte se utilizó para la producción de planta y el resto del material se conserva en el banco de germoplasma del CIEF. Una prueba de germinación con 30 semillas permitió obtener 15 plantas, que alcanzaron la madurez sexual al segundo año de cultivo (el método de cultivo empleado viene descrito en el apartado sobre propagación y cultivo de planta con destino a introducciones en el medio natural). Todas las semillas germinaron, pero sólo la mitad consiguió pasar la fase de plántula.

En el año 2014, el ejemplar silvestre valenciano no produjo ningún fruto. En 2015 se recolectó un único fruto que contenía 8 semillas, 5 de las cuales eran aparentemente viables; en 2016 el ejemplar no produjo tampoco ningún fruto con semillas, y finalmente en 2017 produjo 4 frutos con 11 semillas, de las cuales 9 eran aparentemente viables.

En todos los casos se realizó un test de viabilidad “de *visu*” a las semillas, previo a un test de germinación o alternativo a un test de viabilidad destructivos, como el de tetrazolio o el de corte. El análisis consiste en el estudio de cada una de las semillas, o bien de una muestra representativa del lote seleccionada al azar, en caso de gran cantidad de material, identificando semillas viables, bien formadas y que no presentan signos de predación, deformación, que estén vacías o inmaduras. Los resultados se expresan en porcentaje respecto del total.

Tabla 7.1. Fertilidad del ejemplar silvestre valenciano desde 2012 hasta 2017.

Años	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Número de frutos recolectados	1	5	0	1	0	4
Número de semillas	3	142	-	8	-	11
Viabilidad (%)	33,3	64,8	-	62,5	-	81,8

## Capítulo 7

### Análisis del banco de semillas edáfico

En abril de 2012 se recolectaron muestras de suelo a una distancia no superior a 50 cm del ejemplar valenciano y una profundidad de 1 a 5 cm. Las muestras fueron tratadas en el laboratorio según protocolos estandarizados y posteriormente sembradas en bandejas-semilleros, realizando un seguimiento semanal de todas las plántulas que iban emergiendo durante 3 años consecutivos. Estos ensayos no dieron resultados positivos, sólo se observó un hipotético ejemplar de *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* que germinó en el año 2014, pero no superó la fase de plántula. Estos datos son concordantes con la producción casi nula de semillas observada con antelación a 2012.

### Cruzamientos realizados con *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* entre plantas procedentes de esquejes y de germinación de semillas obtenidas del ejemplar silvestre

En 2015 se consiguió obtener simultáneamente ejemplares adultos reproductores procedentes de esquejado y de la germinación de semillas del ejemplar silvestre (Ferrer-Gallego *et al.* 2015b). Con este pool de plantas se diseñó una experiencia de cruces mediante polinización manual cruzada a fin de obtener un protocolo que maximice la obtención de semillas viables y el mayor rendimiento. Se realizaron 4 tipologías de cruces utilizando como donantes y receptores de polen tanto el material procedente de la germinación de las semillas (Cs) como el producido por esqueje (Ce) (Figura 7.6 y Tabla 7.2).



Figura 7.6. Cruzamientos realizados mediante polinización manual utilizando como donantes y receptores de polen material procedente de la germinación de las semillas y producido por esqueje.

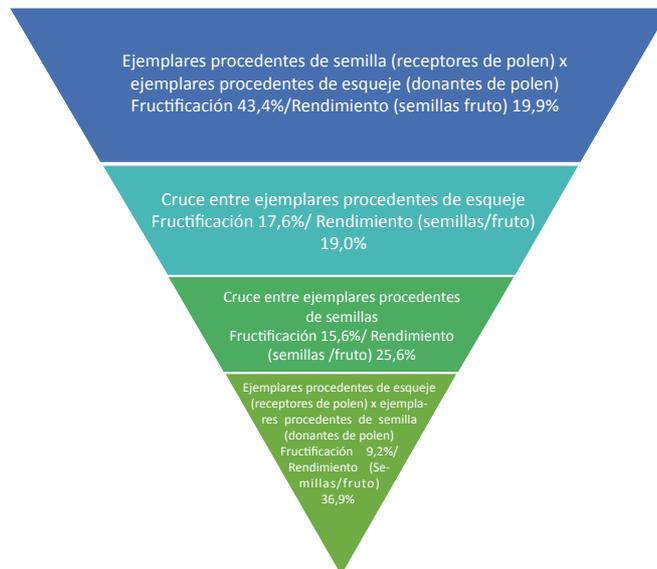
Obtención de material de reproducción en la Comunidad Valenciana

En total se realizaron 233 cruces durante los meses de floración (abril y mayo) y se obtuvieron en total 43 frutos con 1.087 semillas. El cruce que alcanzó mayor rendimiento en términos de tasa de fructificación en relación con las polinizaciones realizadas y la obtención de semillas viables fue el tipo 2 ( $Cs_{\text{♀}} \times Ce_{\text{♂}}$ ), el que considera como receptores de polen las plantas procedentes de la germinación de las semillas y como donantes las plantas procedentes de esquejado, obteniéndose un porcentaje de éxito de los cruzamientos del 43,4%. El cruce inverso, tipo 3 ( $Ce_{\text{♀}} \times Cs_{\text{♂}}$ ), muestra un bajo éxito en el cuajado de los frutos (9,2%), aunque luego se producen más semillas por fruto que en el cruce tipo 2. El orden de mayor a menor tasa de fructificación (número de frutos /flor polinizada), así como el rendimiento observado (nº de semillas/fruto) entre los diferentes cruces entre ejemplares valencianos se muestra en la figura 7.7.

**Tabla 7.2.** Tipos de cruzamientos realizados en 2015 entre las diferentes progenies del material vegetal de reproducción valenciano de *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis*. Maduración, cantidad y calidad del germoplasma producido y rendimiento obtenido según los diferentes tipos de cruces. (Cs: Plantas procedentes de la germinación de semillas del ejemplar silvestre; Ce: Plantas procedentes de multiplicación vegetativa por esqueje del ejemplar silvestre).

Tipo cruzamiento	1	2	3	4
Cruzamiento	$Cs_{\text{♀}} \times Cs_{\text{♂}}$	$Cs_{\text{♀}} \times Ce_{\text{♂}}$	$Ce_{\text{♀}} \times Cs_{\text{♂}}$	$Ce_{\text{♀}} \times Ce_{\text{♂}}$
Número flores fecundadas	32	53	131	17
Frutos recolectados	5	23	12	3
*Tasa de fructificación (frutos/flores polinizadas) (%)	15,6	43,4	9,2	17,6
Número de semillas	128	459	443	57
Rendimiento (semillas/frutos) (%)	25,6	19,9	36,9	19,0
Viabilidad (%)	78	84	81	22

\*Tasa de fructificación: número de frutos (recolectados y con presencia de semillas aparentemente viables) en relación al número de flores polinizadas.



**Figura 7.7.** Tasa de fructificación (polinizaciones realizadas y número de frutos recolectados) y rendimiento (número de semillas/fruto) observado entre los diferentes tipos de cruzamientos realizados en 2015.

## Capítulo 7

Conforme a los datos observados y para asegurar que en los cruces se contemple el material genético del ejemplar silvestre valenciano en los años sucesivos se ha hecho especial hincapié en los cruces 2 y 3. No obstante el cruce entre el material procedente de semilla consigo mismo revela importantes valores de éxito y conviene tenerlo en consideración. Por el contrario, los cruces entre material procedente de esqueje entre sí, muestran rendimientos bajos, aunque la tasa de fructificación observada es mayor que en los cruces  $Cs_{\text{♀}} \times Cs_{\text{♂}}$  y  $Ce_{\text{♀}} \times Cs_{\text{♂}}$ . Este hecho corroboraría la hipótesis de que la planta silvestre no es estrictamente autoincompatible y existe cierta fertilidad, algo ya constatado por Boscaiu (1999, 2000; Boscaiu y Güemes, 2001).

Por otra parte, se ha observado que las semillas recolectadas en 2015 procedentes de los cruzamientos entre plantas de esqueje (cruce tipo 4) tienen dimensiones y peso ligeramente mayores que las procedentes de cruces en los que interviene material de semilla (tipos 1, 2 y 3) (Figura 7.8 y Tabla 7.3). Estas ligeras diferencias podrían deberse a que las plantas de esqueje tienen menos frutos que madurar –ver tabla 7.2, última columna–, lo que permite canalizar más recursos a las pocas producidas, con el consiguiente incremento de dimensiones; no obstante, es necesario profundizar en estos resultados y realizar más experiencias para poder demostrar esta hipótesis. En concreto, en lo que respecta a la anchura de las semillas, la de las procedentes de cruces entre material de esqueje es significativamente mayor que el resto del material obtenido, muy próximas en cuanto al valor hallado y sin diferencias significativas entre ellas. Los valores observados en este parámetro para el material valenciano producto de este conjunto de cruzamientos son en todos los casos menores que los indicados por Navarro-Cano *et al.* (2017) tanto para el material de Cartagena como para el de Marruecos (Bokkoya) en *C. heterophyllus* y el híbrido con *C. albidus* (*C. × clausonii*). Asimismo, aunque con diferencias no tan marcadas, la longitud de las semillas es ligeramente mayor en el cruzamiento entre material procedente de esqueje, siendo superior a 1 mm en este cruce y por debajo de este valor para el resto de los cruces (Tabla 7.3 y Figura 7.9).



**Figura 7.8.** Diferencias entre los frutos y semillas recolectadas en 2015 procedentes de los cruzamientos entre plantas de esqueje y procedentes entre cruces en los que interviene material de semilla. Las plantas de esqueje produjeron menos frutos y semillas pero de mayor tamaño que las originadas de semilla.

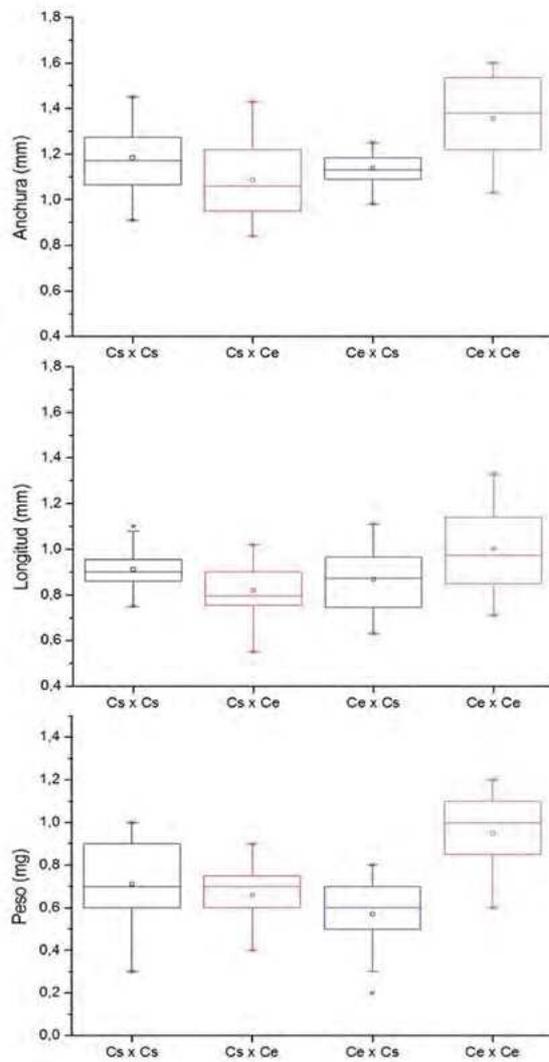


Figura 7.9. Dimensiones y pesos de las semillas resultado de los diferentes cruzamientos realizados en 2015 con material de *C. heterophyllum* subsp. *carthaginensis*. Tamaño de la muestra para cada cruce = 30 semillas.

Respecto al peso de las semillas, un parámetro con cierto valor diagnóstico entre *C. × clausonii* y sus dos parentales (Navarro-Cano *et al.*, 2017), los valores obtenidos con los cruzamientos realizados con material valenciano, al igual que para los parámetros del tamaño de las semillas, son significativamente mayores en el cruzamiento tipo 4 (cruce entre material procedente de esqueje) y el resto de cruzamientos en los que intervienen plantas producidas de la germinación de semillas, en los que no se observan diferencias entre los cruces tipo 1, 2 y 3. No obstante, el peso medio obtenido de una semilla mediante el cruce tipo 4 es muy próximo al publicado por *C. × clausonii* por Navarro-Cano *et al.* (2017) tanto para el material de Cartagena como para el marroquí y al considerado para *C. heterophyllum* murciano.

Los datos obtenidos en las dimensiones de las semillas del material valenciano y su comparación con lo publicado para el material de Cartagena (*C. heterophyllum* y *C. × clausonii*) y Marruecos (*C. × clausonii*), permiten conocer la gran proximidad que existe entre ellos. No obstante, dado que existen ciertas diferencias en los tamaños y pesos entre las especies progenitoras y *C. × clausonii* según la procedencia del material (Marruecos o península ibérica), se considera que las observadas entre el material valenciano y el resto de las poblaciones estudiadas por Navarro-Cano *et al.* (2017) (Cartagena y Bokkoya) podrían deberse

## Capítulo 7

a un componente geográfico y ecológico, o tal vez de cultivo. Así, es preciso realizar nuevos estudios con otras poblaciones y nuevas progenies para testar el valor diagnóstico de estos parámetros y conocer su variabilidad.

**Tabla 7.3.** Dimensiones y pesos de las semillas procedentes de los diferentes cruzamientos realizados en 2015 entre las progenies. Tamaño de la muestra para cada cruce = 30 semillas.

Tipo cruzamiento	1	2	3	4
Cruzamiento	Cs♀×Cs♂	Cs♀×Ce♂	Ce♀×Cs♂	Ce♀×Ce♂
Anchura (mm)	1,185 ± 0,152	1,086 ± 0,170	1,140 ± 0,070	1,357 ± 0,180
Longitud (mm)	0,912 ± 0,086	0,821 ± 0,109	0,868 ± 0,139	1,003 ± 0,189
Peso (mg)	0,710 ± 0,199	0,660 ± 0,127	0,570 ± 0,152	0,950 ± 0,176

En 2016 se realizaron 1.655 cruces, referenciados como tipo 2 y 3 en la tabla 2, que dieron lugar a 550 frutos maduros y 20.673 semillas, el 95,4% (19.729) de las cuales proceden de los ejemplares obtenidos de semilla y el 4,6% (944) de los procedentes de esqueje, lo que presumiblemente asegura un aumento de la variabilidad genética para esta especie (Tabla 7.4). Este incremento puede ser explicado por el entrecruzamiento entre las cromátidas, donde los alelos se recombinan produciendo nuevas combinaciones genéticas aunque con los mismos genes, pues no ha habido intercambio génico al tratarse de un solo ejemplar, a no ser que se hayan producido de modo natural nuevas mutaciones.

En 2017 se repitieron los cruzamientos entre las dos progenies de plantas de origen valenciano puro (Tabla 7.4). El número de plantas de cada progenie varió respecto años anteriores, aunque se mantuvo prácticamente la misma relación 2:1 (el doble de plantas en el pool procedente de semillas respecto al pool de plantas producidas por esqueje), habiendo sido el número de ejemplares de 15:5 en 2015; 14:6 en 2016, y de 20:13 en 2017.

Las plantas obtenidas de esqueje florecieron en mayor proporción que las de semilla en 2016, produciendo un total de 887 flores frente a 768, aunque no ocurrió así en 2017, produciendo casi el doble de flores las plantas de semillas que las de esqueje, 1.140 frente a 652 (Tabla 7.4).

Un dato de interés es el relativo a la tasa de fructificación de las plantas. Estos valores se mantienen muy próximos en 2017 con respecto a 2015 y 2016. En 2016 sólo cuajaron un 8,9% (79 frutos) de las flores en las plantas procedentes de esqueje frente a 61,3% (471 frutos) en las de semilla (Tabla 7.4), datos que corroboran los resultados obtenidos en el año 2015 para los mismos cruces (Tabla 7.2), con un 43,4% de tasa de fructificación (nº frutos/flores) utilizando ejemplares procedentes de esqueje como donantes de polen y de semilla como receptores y un 9,2% en el cruce inverso, datos en concordancia con lo observado en 2017, con 69,4% y 13,8% de fructificación, respectivamente (Tabla 7.4).

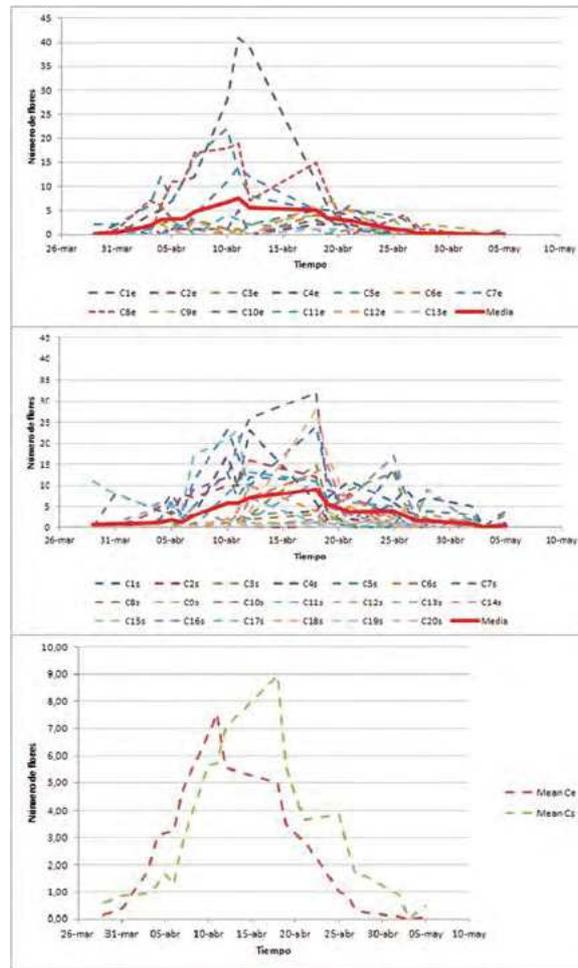
Por último, cabe indicar que ha existido un ligero aumento en el número de flores y producción de frutos por ejemplar para la progenie de plantas procedentes de semillas en 2017, mientras que para las plantas procedentes de esqueje se ha observado una disminución. Así, en 2016 se contaron 54,8 flores/planta frente a 57 en 2017; y 33,6 frutos/planta en 2016 frente a 39,5 en 2017 para la progenie de semillas. Para las plantas de esqueje, fueron 147,8 flores/planta en 2016 frente a 50,2 en 2017; y 13,2 frutos/planta en 2016 frente a 6,9 en 2017 (Tabla 7.4). Estos valores para las plantas de semilla podrían ser explicados por la mayor edad de los ejemplares y el mayor tamaño proporcional de los contenedores de cultivo empleados, con mayor cantidad de sustrato que en años anteriores. Por lo que respecta a las plantas de esqueje, la disminución observada en nº de flores y producción de frutos/planta podría deberse a un cierto envejecimiento del material vegetal.

En la colección de planta mantenida en el CIEF existen buenos donantes de material vegetal de reproducción, como por ejemplo las plantas procedentes de semillas denominadas C4s, C5s, C6s, C7s, C10s, C11s, C12s y C13s, las cuales han producido una gran cantidad de frutos (Tabla 7.4, Figuras 7.11 y 7.12).

**Tabla 7.4.** Tipos de cruzamientos realizados en 2016 y 2017 entre las diferentes progenies del material vegetal de reproducción valenciano de *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis*. Maduración, cantidad y calidad del germoplasma producido y rendimiento obtenido según los diferentes tipos de cruces.

Cruzamiento	Año	Número plantas	Número flores fecundadas	Flores/planta	Número frutos	Tasa de fructificación (frutos/flores polinizadas) (%)	Frutos/planta	Número semillas	Rendimiento (semillas/frutos) (%)	Viabilidad (%)
Cs♀xCe♂	2016	14	768	54,8	471	61,3	33,6	19.729	37,6	92
Ce♀xCs♂	2016	6	887	147,8	79	8,9	13,2	944	11,9	94
Cs♀xCe♂	2017	20	1140	57	791	69,4	39,5	-	-	-
Ce♀xCs♂	2017	13	652	50,2	90	13,8	6,9	-	-	-

El comportamiento fenológico observado en 2017 referente a la floración de las plantas se corresponde con lo observado en 2015 y 2016, siendo las plantas procedentes de esquejes más precoces en la antesis (Figura 7.10). Asimismo, en conjunto, la floración en 2017 fue algo más temprana que en años anteriores, aspecto generalizado para toda la flora local por la presencia de temperaturas primaverales ya desde finales del invierno. No obstante, se observó una disminución en la formación de flores emitidas por el pool de plantas procedentes de esqueje, que en parte puede ser explicada por la diferente edad de cultivo de las plantas. Las más antiguas, con 5 años de cultivo mantenidos en los mismos contenedores de producción, sufren aparentemente mayor agotamiento, existiendo un cierto desgaste del sustrato que puede hacer mermar el vigor de los ejemplares, aunque se realicen abonados periódicos. Las más jóvenes, con 1-2 años de cultivo, todavía no tienen el tamaño suficiente para poder producir una mayor proporción de flores. Con respecto al número de frutos, aunque ha aumentado en números absolutos, también han disminuido en proporción al número de plantas mantenidas para cada progenie.



**Figura 7.10.** Floración (y también momento en el que se realizan los cruzamientos) en 2017 en el pool de plantas madre cultivadas en el CIEF. Arriba: plantas procedentes de esquejes; en medio: plantas procedentes de semillas; abajo: media para las dos progenies.

En lo referente al tamaño de los frutos analizados con el material recolectado en 2017, medido como diámetro máximo de la cápsula en milímetros, para el pool de plantas procedentes de semillas el fruto es mayor (6,8 mm) que en el de las procedentes de esquejes (5 mm) (Figura 7.11). Este parámetro está directamente relacionado con la cantidad de semillas por fruto, y en segunda instancia también con el tamaño medio de la semilla, aunque este último valor se ha observado poco variable al menos con el material obtenido en condiciones de cultivo *ex situ*.

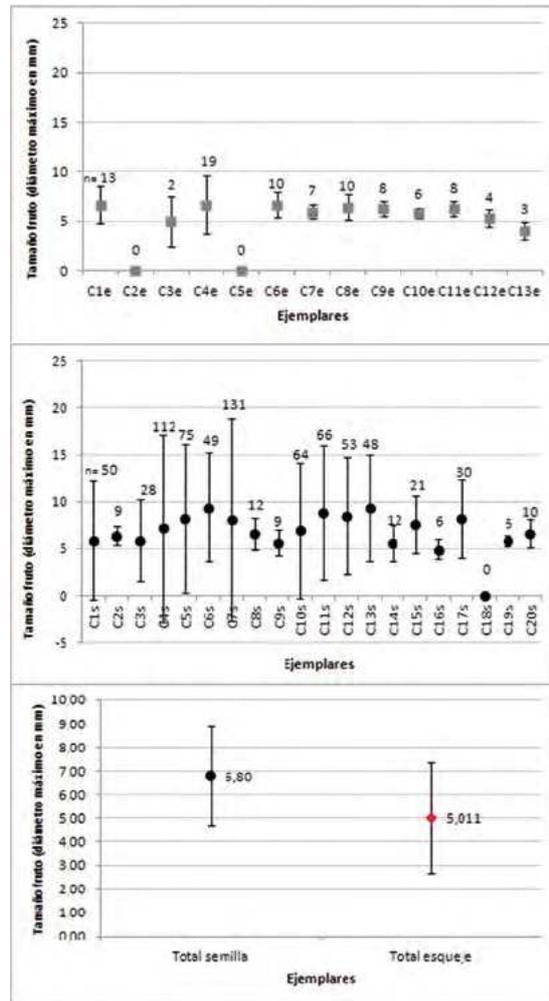
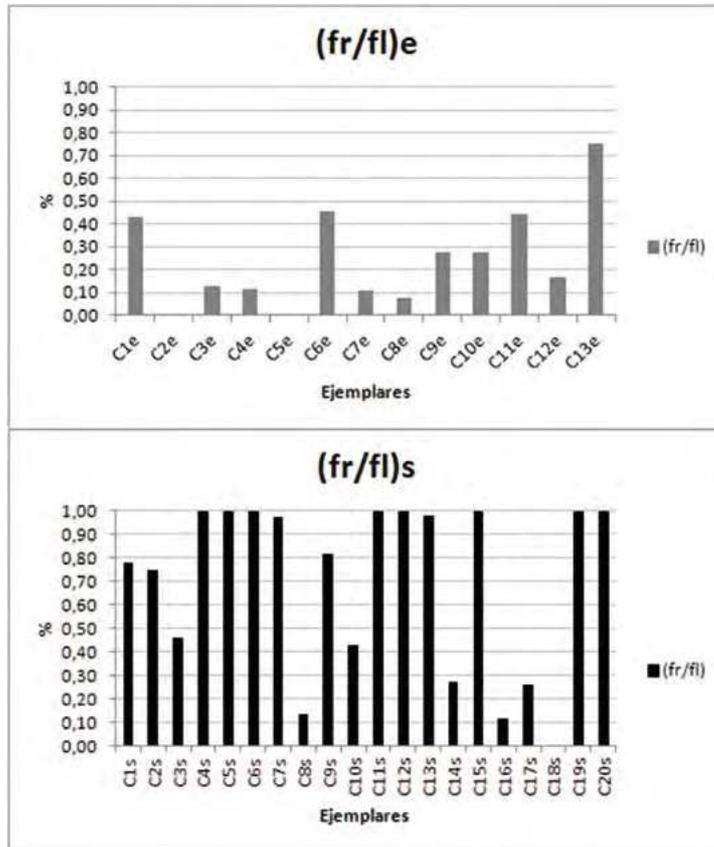


Figura 7.11. Tamaño de los frutos para el conjunto de las plantas que forman parte de las dos progenies. Arriba: pool de plantas de esqueje; en medio: de semillas; abajo: valores medios para las dos progenies.

Concluimos este apartado haciendo especial hincapié en la importancia de la recolección de semillas que se pudo lograr en un momento determinado en el ejemplar silvestre valenciano, lo que abrió sin duda nuevas perspectivas y generó esperanza en la conservación de esta planta, permitiendo la multiplicación de ejemplares mediante cruces asistidos, algo que, aunque costoso y laborioso, está mostrando resultados muy esperanzadores para la recuperación de este emblemático vegetal en el territorio valenciano.

Con los resultados obtenidos, es posible redirigir el diseño de la colección de planta viva que se posee en condiciones *ex situ*, ya que aparentemente no sería necesario mantener un número muy elevado de ejemplares de origen asexual cuya función sería la de hacer de donantes de polen.



**Figura 7.12.** Tasa de fructificación (número frutos/ número flores polinizadas) para los ejemplares que forman parte de las progenies. Arriba: pool de plantas de esqueje (e); abajo: de semillas.

**Experiencia de polinización asistida in situ de la planta de La Pobla de Vallbona**

En 2016 se realizaron experiencias de cruzamiento entre el material *ex situ* mantenido en el CIEF y la planta de La Pobla de Vallbona (Figura 7.13). Para ello se polinizaron de manera manual flores del ejemplar silvestre con polen procedente de sus descendientes de semilla de los ejemplares mantenidos en el vivero del CIEF. La distancia entre el vivero y la parcela de La Pobla de Vallbona donde vive el único ejemplar nativo es de 15,16 km. Los cruces asistidos en los que se ha utilizado el ejemplar silvestre valenciano como receptor de polen, haciendo de donantes ejemplares cultivados en el CIEF procedentes de semillas han sido en todos los casos infructuosos hasta el momento. El cruce con plantas procedentes de multiplicación por esqueje no se realizó debido a que son genéticamente idénticas, siendo previsible que se manifieste con más facilidad la quasi-autoincompatibilidad observada en el propio ejemplar silvestre. Consideramos importante seguir intentando hacer estos cruces en años climatológicamente más favorables; en este sentido, una de las causas que pudo provocar la nula formación de frutos en 2016 podría ser que la mayoría de las flores que produjo el ejemplar silvestre mostraban el estigma y también los estambres con malformaciones, con aspecto de necrosamiento o resecaión prematura (Figura 7.13).

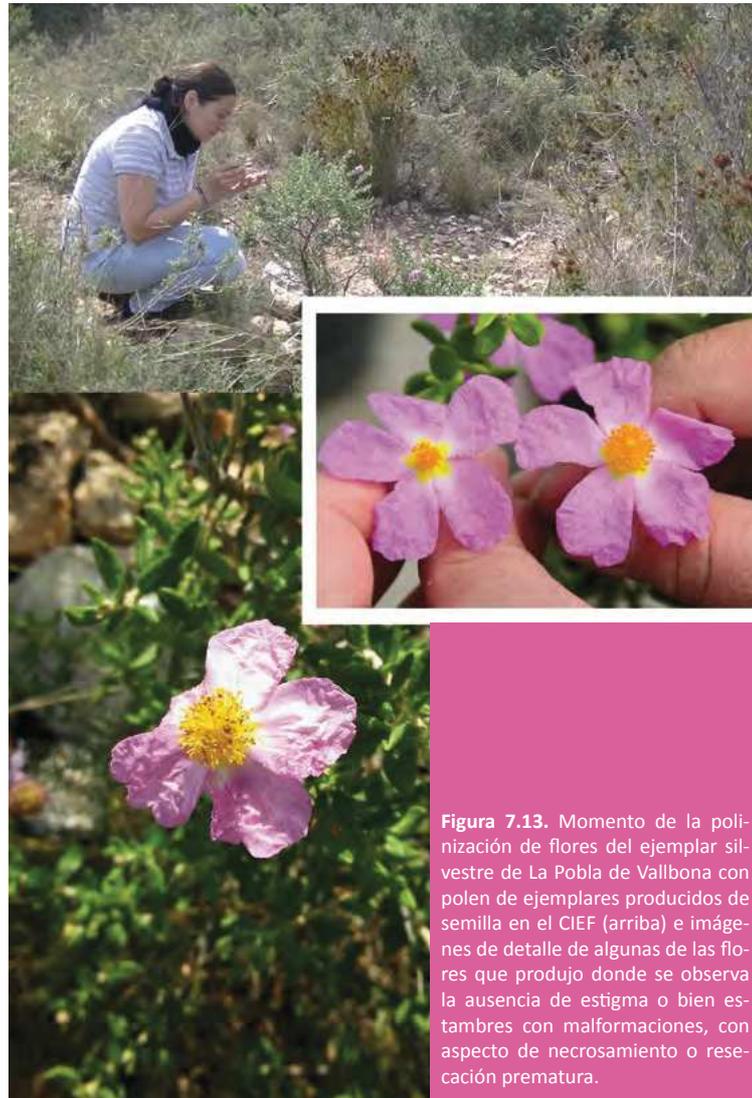


Figura 7.13. Momento de la polinización de flores del ejemplar silvestre de La Pobra de Vallbona con polen de ejemplares producidos de semilla en el CIEF (arriba) e imágenes de detalle de algunas de las flores que produjo donde se observa la ausencia de estigma o bien estambres con malformaciones, con aspecto de necrosamiento o resecaión prematura.

#### **Cruzamientos entre ejemplares de *C. heterophyllus* de origen valenciano y murciano**

Los cruzamientos se han realizado mediante polinizaciones entre el material valenciano (plantas procedentes de esquejes del ejemplar de la Pobra de Vallbona, o bien originadas tras la germinación de semillas recolectadas de tal espécimen) y murciano. En 2013 se incorporaron a la colección de planta mantenida en el CIEF nuevos individuos de origen murciano, incluyendo tanto ejemplares obtenidos de semilla recolectada post-incendio en la población de Llano del Beal y cedidas por la administración ambiental de la Región de Murcia –en consecuencia introgrida con *C. albidus*– como seleccionada tras varias generaciones sin trazas de hibridación a partir de semillas recolectadas entre 1993 y 1995 –antes del incendio de 1996– en esa misma población (véase Jiménez *et al.*, 2007; Pawluczyk *et al.*, 2012).

Se realizaron en total 129 cruces entre plantas valencianas y murcianas, correspondientes a los cruces de los tipos 5, 6, 7 y 8 de la tabla 5; y 6 cruces entre ejemplares murcianos, indicados como tipo 9 (Tabla 7.5). De los cruces realizados entre material valenciano y murciano se obtuvieron 128 frutos y 4.225 semillas en total, siendo el porcentaje de éxito medio de todos cruzamientos del 99,2%.

**Tabla 7.5.** Resultados obtenidos de los cruzamientos realizados en 2015 entre plantas de *C. heterophyllus* subsp. *carthagenensis* a partir de material valenciano (producido de esqueje y germinación de semillas) y murciano. Cs: Plantas valencianas procedentes de la germinación de semillas; Ce: Plantas valencianas procedentes de multiplicación vegetativa por esqueje del ejemplar valenciano; M: Planta de procedencia murciana obtenida a partir de la germinación de semillas.

Tipo cruzamiento	5	6	7	8	9
Cruzamiento	Ce♀ × M♂	M♀ × Ce♂	Cs♀ × M♂	M♀ × Cs♂	M♀ × M♂
Número cruzamientos	10	85	17	17	6
Frutos recolectados	10	85	16	17	1
Tasa de fructificación (frutos/ flores polinizadas) (%)	100,0	100,0	94,1	100,0	16,7
Número de semillas	1.020	2.183	326	696	4
Rendimiento (semillas/frutos)	102,0	25,7	20,4	40,9	4
Viabilidad (%)	89	91	92	94	95

**Cruzamientos entre *C. heterophyllus* subsp. *carthagenensis* con otros táxones**

En 2011 el CIEF inició una línea de cultivo a partir de planta obtenida mediante cruzamientos orientada a conocer a medio plazo la trazabilidad concreta de genes mediante distintas técnicas de detección cromosómica y de variabilidad genética, desarrollada por la Unidad de Investigación de Diversidad Genética y Evolución del JBUV. Los trabajos han incluido la germinación y puesta en cultivo de material norteafricano de la subsp. *heterophyllus* de origen marroquí, desarrollándose cruzamientos controlados desde 2012, y obteniéndose plantas de la combinación *carthagenensis* × *heterophyllus* (= nothosubsp. *marzoi*) (Ferrer-Gallego *et al.*, 2013a), cuyos resultados se expresan en la tabla 7.6. Debe resaltarse el alto rendimiento observado, muy superior al que posteriormente se obtuvo con el autocruzamiento de la subsp. *carthagenensis*, ya detallado en apartados anteriores –ver tabla 7.4.

Además del anterior entre subespecies de *C. heterophyllus*, se realizaron cruzamientos mediante polinización manual asistida entre plantas valencianas de *C. heterophyllus* subsp. *carthagenensis*, *C. creticus* y *C. albidus*. Estos cruzamientos, cuyos resultados se expresan igualmente en la tabla 7.6, permitieron extraer conclusiones sobre el vigor de las plantas, los efectos de la hibridación en previsión de cuando ésta acontezca igualmente en campo, y la posible transmisión de caracteres morfológicos en las correspondientes líneas de nuevos reproductores, entre otra información relevante.

**Tabla 7.6.** Resultados de los cruzamientos de *C. heterophyllus* subsp. *carthagenensis* con otras especies para conocer la fertilidad del material valenciano. El material de *C. heterophyllus* subsp. *heterophyllus* procede de la localidad marroquí de Alhucemas.

Cruzamiento	Número frutos	Número semillas	Rendimiento (nº semillas/fruto)	Viabilidad semillas (%)
<i>C. h. carthagenensis</i> × <i>C. h. heterophyllus</i>	608	45.059	74	90
<i>C. h. carthagenensis</i> × <i>C. creticus</i>	10	758	76	96
<i>C. h. carthagenensis</i> × <i>C. albidus</i>	15	1.183	76	98

*C. × clausonii* nothosubsp. *navarroi* [= *C. heterophyllus* subsp. *carthagenensis* × *C. albidus*]

*C. × escartianus* nothosubsp. *crespoi* [= *C. heterophyllus* subsp. *carthagenensis* × *C. creticus*]

*C. heterophyllus* nothosubsp. *marzoi* [= *C. heterophyllus* subsp. *carthagenensis* × *C. heterophyllus* subsp. *heterophyllus*]

### 7.3. Material conservado en bancos de germoplasma

Se conservan 27 accesiones de *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis*, de la subespecie tipo y algunos de los híbridos generados en cultivo, en el Banco de Germoplasma del CIEF. También están depositados duplicados en el Banco de Germoplasma del JBUV.

Se conservan dos recolecciones de semillas correspondientes de la población natural de La Pobla de Vallbona, recolectadas en 2013 y 2015 y el resto procede de los cruzamientos realizados con las diferentes progenies y táxones o nototáxones. También se conservan 3 lotes de semillas procedentes de las poblaciones creadas en Serra a partir ejemplares producidos *in vitro* y resultado del cruzamiento con *C. albidus*, muy abundante en la zona (véase Navarro-Cano *et al.*, 2009).

El método empleado en la conservación de las semillas sigue las pautas indicadas en el trabajo de Ferrer-Gallego *et al.* (2013b). Así, las condiciones de conservación de las muestras son las usualmente utilizadas en bancos de germoplasma; semillas deshidratadas al 5-8% de humedad interna, herméticamente cerradas y mantenidas en condiciones de 4°C en la colección activa, y a -20°C en la colección de base (Figura 7.14).



Figura 7.14. Método empleado en la conservación de las semillas de *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* utilizado en el banco de germoplasma del CIEF.

## Capítulo 7

### 7.4. Propagación y cultivo de planta con destino a introducciones en el medio natural

Como ya se ha indicado en los apartados anteriores, la producción de planta puede realizarse mediante la germinación de semillas o la multiplicación asexual, por esquejes o bien por la clonación *in vitro*. El período óptimo para la siembra de las semillas es durante las últimas semanas del invierno (enero-febrero) y del esquejado a finales del otoño (noviembre-diciembre). La germinación de las semillas se realiza en condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo, pudiendo germinar a temperaturas constantes de 20°C o bien alternantes de 25/20°C; 12/12 horas luz/oscuridad) en placas de Petri y cámaras germinadoras, previo tratamiento de las semillas mediante escaldado (sumergiendo las semillas en agua en ebullición y dejándolas hasta su enfriamiento) (Figura 7.15). El protocolo de germinación ha sido publicado por varios autores (Boscaiu, 1997, 1999; Escribá *et al.*, 2007). Los mejores resultados en el porcentaje de germinación obtenido en el CIEF superan el 90%, en menos de 30 días (Figura 7.16). Las semillas que no germinaron fueron posteriormente analizadas y el 2,1% resultaron ser potencialmente viables, el 10,2 % vacías y el 4,7 % muertas. El  $T_{50}$  (tiempo en días necesarios para alcanzar el 50% del valor de la germinación total) se alcanza entre el tercer y cuarto día.



**Figura 7.15.** Semillas de *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* en placas de Petri para su germinación en condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo en cámaras germinadoras.

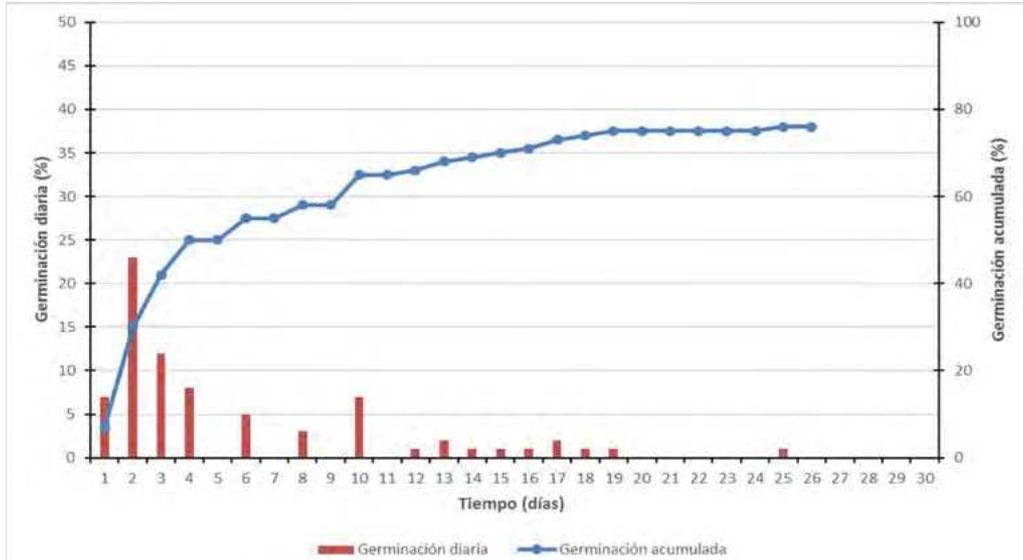


Figura 7.16. Curva de germinación de las semillas de *C. heterophyllum* subsp. *carthaginensis* recolectadas en 2016, y obtenidas mediante los cruces realizados en el CIEF para la obtención de material de reproducción.

Para la producción de planta, las semillas germinadas son repicadas en contenedores del tipo QP35T de 200 cc/alveolo (Figura 7.17). Por cada gramo de semilla sembrado se pueden obtener entre 600 y 800 plántulas.

Una información de gran utilidad es el cálculo del parámetro CPP (Capacidad Potencial de Producción) como ya fuera expuesto por Ferrando-Pardo *et al.* (2016). Este indicador permite tener una aproximación del número de planta potencial a obtener a partir de un lote de semillas, calculado mediante la siguiente fórmula:  $CPP (\%) = VS \times CG / 100$ . Donde VS es la viabilidad de las semillas (número de semillas germinadas junto con las semillas frescas) y CG es la capacidad de germinación (total de semillas germinadas entre el número total de testadas menos las vacías) (Gosling, 2003; Offord *et al.*, 2004; Crawford *et al.*, 2007). En el caso de *C. heterophyllum* subsp. *carthaginensis* este valor es 72,6% (Ferrando-Pardo *et al.*, 2016).



Figura 7.17. Producción de planta en contenedores del tipo QP35T de 200 cc/alveolo.

## Capítulo 7

Un medio de cultivo adecuado es de gran importancia para asegurar una buena calidad de la planta producida y su posterior adecuación al medio natural. Así, el sustrato usado habitualmente para la producción de plantas forestales y especies amenazadas valencianas suele estar compuesto por turba y una mezcla de componentes con distintos tamaños y características físico-químicas (Ferrer-Gallego *et al.*, 2013b). Los sustratos más utilizados en el cultivo *C. heterophyllus* en el CIEF llevan incorporados una proporción importante de turba rubia (aprox. pH = 3,5) con gran contenido en materia orgánica y varios componentes adicionales, fundamentalmente perlita —roca volcánica silícea, estéril, inerte y ligera, que incrementa la porosidad del sustrato, mejora la aireación y contribuye a un buen drenaje— y fibra de coco —compuesto de fibras multicelulares obtenido como subproducto industrial del cultivo de diversas especies de palmeras, y que tienen como principales componentes la celulosa y el leño—, para proporcionar una mayor capacidad de retención de agua, aumentar la aireación y la esponjosidad del sustrato. Igualmente suelen contener arena o arcilla, para mejorar la textura franca del sustrato y favorecer la formación de compuestos arcillo-húmicos, la humificación de la materia orgánica y reducir el exceso de aireado. En el cultivo de esta planta en el CIEF se utiliza tierra de procedencia local, es decir, cogida del entorno en el que se localiza el ejemplar silvestre valenciano. La proporción estándar y más frecuente de cada uno de los compuestos y componentes en el sustrato es 2:1:1:1 (turba: fibra de coco: perlita: arcilla).

Las plántulas son mantenidas en condiciones de invernadero entre uno y dos meses, y posteriormente, cuando han alcanzado una talla de 5-7 cm son trasladadas a umbráculo (Figura 7.17), donde se cultiva en mesas metálicas de rejilla para facilitar el autorrepicado radicular, y son regadas regularmente cada 2-3 días, pero sin llegar a condiciones de saturación del sustrato. En la medida de lo posible, se aconseja el empleo de agua de lluvia.

La supervivencia tras el repicado de las semillas germinadas suele ser superior al 80%. Una vez superada esta etapa, el porcentaje de supervivencia de las plántulas también suele ser alto, más del 90%. Finalmente, cuando las plantas han alcanzado 10-15 cm de altura y son destinadas a trabajos de restitución en el medio, son repicadas a contenedores del tipo QP 12T, de 430cc/alveolo o QP 6T de 1.100 cc; y si van destinadas a formar parte de la colección de planta viva, como donantes de material vegetal de reproducción, los ejemplares se pasan a macetas de mayor capacidad, como por ejemplo CT40 con un volumen de 35 litros.

La primera floración de ejemplares producidos a partir de semillas ocurre al segundo año desde la germinación, mientras que en las plantas de esqueje ocurre en el primer año. La abundancia en la floración depende del contenedor donde se cultive la planta, siendo mayor cuando se ha mantenido en contenedores de gran capacidad de sustrato, como el citado CT40.

Por otra parte, también se observan diferencias en cuanto a la formación del sistema radicular y el desarrollo de la parte aérea, siendo las plantas de esqueje las más desarrolladas en los primeros años para una misma edad de cultivo (Figura 7.18).



**Figura 7.18.** Diferencias en la formación del sistema radicular y el desarrollo de la parte aérea entre plantas de esqueje (imágenes lado izquierdo) y plantas procedentes de germinación de semillas (derecho) comparando ejemplares con la misma edad de cultivo.

La calidad de planta cambia en el tiempo, variando con el estado fenológico y, probablemente, con la edad. Así, la resistencia a situaciones de estrés de un ejemplar no es la misma durante el periodo de reposo vegetativo que al producirse la elongación de los tallos. En el caso de que las plantas producidas sean destinadas a ser introducidas en el medio natural, la regla deducida de los trabajos con otras especies arbustivas en el CIEF es que conviene someterlas un proceso de aclimatación y endurecimiento, que consiste en una disminución progresiva del riego, tanto en frecuencia como en cantidad de agua, y un aumento de las condiciones de luminosidad y radicación, lo que permite adquirir ciertas garantías de supervivencia a los ejemplares.

Para obtener una planta vigorosa y de calidad óptima para la plantación también es importante controlar el estado fitosanitario, es decir, obtener en lo posible la ausencia de agentes patógenos que pueden mermar su futuro desarrollo. Las plantas cultivadas en invernadero o umbráculo suelen ser mucho más sensibles a las heladas y al exceso de humedad, y en este último caso no es raro que aparezcan hongos que afectan principalmente a las hojas, aunque algunos pueden afectar también al tallo, brotes y ramillas

## Capítulo 7

jóvenes. Cuando el ataque es intenso puede provocar el debilitamiento y secado de muchas ramas atacadas, incluso provocar el colapso y la muerte del ejemplar afectado. También es común el ataque de áfidos y cochinilla, aunque no suelen ser factores que afecten negativamente a los ejemplares, pudiéndose controlar en este caso con las condiciones de cultivo, sobre todo disminuyendo la humedad y aumentando la iluminación.

En la actualidad, y siguiendo las reglas e indicaciones de los párrafos anteriores, el CIEF está desarrollando la primera producción masiva de ejemplares —en torno a 1.000— de jara de Cartagena para su plantación con destino a las zonas programadas en el Plan de Recuperación de esta especie en la Comunidad Valenciana, que podrá abordarse en varias fases sucesivas a partir de 2018. Con antelación a esta producción, se ha realizado una plantación previa con parte del material producido en años anteriores a partir de semillas obtenidas en el programa de producción de material vegetal de reproducción de la especie, en la que se plantaron 25 ejemplares en el término municipal de Serra, dentro del Parque Natural Serra Calderona (Figura 7.19).



Figura 7.19. Plantación de *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* en la localidad de Serra (Valencia).

## Agradecimientos

La producción de *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* se beneficia del soporte financiero del Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER).

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

## Referencias bibliográficas

- Aguilella, A., Fos, S., Laguna, E. (Eds.), 2010. Catálogo Valenciano de Especies de Flora Amenazadas. Colección Biodiversidad, 18. Conselleria de Medi Ambient, Aigua, Urbanisme i Habitatge, Generalitat Valenciana. Valencia.
- Arregui, J., Juarez, J., Laguna, E., Reyna, S., Navarro, L., 1993. Micropropagación de *Cistus heterophyllus*. Un ejemplo de la aplicación del cultivo de tejidos a la conservación de especies amenazadas. *Vida Silv.* 74, 24-29.
- BOE, 2011. Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas. BOE núm. 46, de 23 de febrero de 2011.
- BOE, 2015. Ley Orgánica 1/2015, de 30 de marzo, por la que se modifica la Ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre, del Código Penal. BOE núm. 77, de 31 de marzo de 2015.
- Boscaiu, M., 1997. Relaciones entre el sistema reproductor y la rareza de *Cistus heterophyllus* Desf. subsp. *carthaginiensis* (Pau) M. B. Crespo & Mateo. Informe inédito. Conselleria de Medi Ambient, Generalitat Valenciana. Valencia.
- Boscaiu, M., 1999. Regeneración y estudio de la variabilidad morfológica y genética de *Cistus heterophyllus* Desf. subsp. *carthaginiensis* (Pau) M.B. Crespo & Mateo. Informe inédito. Conselleria de Medi Ambient, Generalitat Valenciana. Valencia.
- Boscaiu, M., 2000. Regeneración y estudio de la variabilidad morfológica y genética de *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginiensis*. Informe para la Conselleria de Medio Ambiente de la Generalitat Valenciana. Universitat de València. Valencia.
- Boscaiu, M., Güemes, J., 2001. Breeding system and conservation strategy of the extremely endangered *Cistus carthaginiensis* Pau (Cistaceae) of Spain. *Isr. J. Plant Sci.* 49, 213-220.
- Crawford, A.D., Steadman, K.J., Plummer, J.A., Cochrane, A., Probert, R.J., 2007. Analysis of seed-bank data confirms suitability of international seed-storage standards for the Australian flora. *Aus. J. Bot.* 55, 18-29.
- Crespo, M.B., Mateo, G., 1988. Consideraciones acerca de la presencia de *Cistus heterophyllus* Desf. en la Península Ibérica. *Anales Jard. Bot. Madrid* 45(1), 165-171.
- DOCV, 2009. Decreto núm. 70/2009, de 22 de mayo, del Consell, por el que se crea y regula el Catálogo Valenciano de Especies de Flora Amenazadas y se regulan medidas adicionales de conservación. DOCV núm. 2061, de 26 de mayo de 2009.
- DOCV, 2013. Orden 6/2013, de 25 de marzo, de la Conselleria de Infraestructuras, Territorio y Medio Ambiente, por la que se modifican los listados valencianos de especies protegidas de flora y fauna. DOCV núm. 6996, de 4 de abril de 2013.
- Escribá, M.C., Arregui, J.M., Laguna, E., 2007. Germinación de *Cistus heterophyllus* Desf. subsp. *carthaginiensis* (Pau) M.B. Crespo & Mateo, taxon gravemente amenazado en la Comunidad Valenciana. *Lazaroa* 28, 101-107.
- Ferrando-Pardo, I., Ferrer-Gallego, P.P., Laguna, E., 2016. Assessing the conservation value of *ex situ* seed bank collections of endangered wild plants. *Isr. J. Plant Sci.* 63(4), 333-346.
- Ferrer-Gallego, P.P., Ferrando, I., Campestre-Mezquida, Laguna, E., 2013a. *Cistus heterophyllus* nothosubsp. *marzoi*, nsubsp. nov. (Cistaceae). *Bouteloua* 16, 27-33.
- Ferrer-Gallego, P.P., Ferrando, I., Gago, C., Laguna, E. (Eds.), 2013b. Manual para la conservación de germoplasma y el cultivo de la flora valenciana amenazada. Colección Manuales Técnicos Biodiversidad, 3. Conselleria d'Infraestructures, Territori i Medi Ambient. Generalitat Valenciana. Valencia.
- Ferrer-Gallego, P.P., Ferrando, I., Laguna, E., 2015a. *Lusus naturae plantae* in *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginiensis* lus. *obstinatus* (Cistaceae) *Bouteloua* 21, 116-122.
- Ferrer-Gallego, P.P., Ferrando, I., Albert, F., Martínez, V., Laguna, E., 2015b. "Obtención de material vegetal de reproducción de *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginiensis*, especie CR de la Lista Roja Española". VII Congreso de Biología de la Conservación de Plantas / Landareen Kontserbazio Biologiaren VII, Biltzarra. 30 septiembre-2 octubre 2015. Gobierno Vasco, Sociedad de Ciencias Aranzadi y SEBICOP, Vitoria-Gasteiz.

Gosling, P.G., 2003. Viability testing. In: Smith, R.D., Dickie, J.B., Linington, S.L., Pritchard, H.W., Probert, R.J., (Eds.), Seed conservation turning science into practice. Kew Royal Botanic Gardens.

Güemes, J., Jiménez, J.F., Sánchez-Gómez, P., 2004. *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis*. En: Bañares, A., Blanca, G., Güemes, J., Moreno, J.C., Ortiz, S. (Eds.), Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, pp. 192-193.

Ibáñez, M.R., 2013. Propagación *in vitro* y estudio con marcadores moleculares y cromosómicos de *Limonium perplexum* L. Sáez & Rosselló. Facultat de Ciències Biològiques. Universitat de València. Burjassot.

Jiménez, J.F., Sánchez-Gómez, P., Roselló, J.A., 2007. Evidencia de introgresión en *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* (Cistaceae) a partir de marcadores moleculares RAPD. An. Biol. 29, 95-103.

Laguna, E., Crespo, M.B., Mateo, G., López Udias, S., Fabregat, C., Serra, L., Herrero-Borgoñón, J.J., Carretero, J.L., Aguilera, A., Figuerola, R., 1998. Flora endémica, rara o amenazada de la Comunidad Valenciana. Consellería de Medio Ambiente. Valencia.

Laguna, E., Ferrer-Gallego, P.P., Ferrando, I., Navarro A., Oltra J.E., Escribá M.C., Albert, F.J., Mansanet C.J., Ballester, G., 2016. First phase of conservation translocations of the Cartagena's rock-rose (*Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis*) in the Valencian Community (Spain). In: Soorae, P.S. (Ed.), Global reintroduction perspectives 2016. Case-studies from around the globe: 267-270. IUCN Reintroduction Specialist Group and UEA Environmental Agency. Gland. & Abu-Dhabi.

Navarro-Cano, J.A., 2002. Taxonomía, propagación y conservación de *Cistus heterophyllus* Desf. (Cistaceae): una planta en peligro de extinción en España. Tesis de Licenciatura. Universidad de Murcia. Inédito.

Navarro-Cano, J.A., Sánchez-Balibrea, J., Barbera, G.G., Ferrández-Sempere, M., El Andalossj, M., 2009. Siguiendo la huella de la hibridación en poblaciones de *Cistus heterophyllus* del Rif marroquí. Conserv. Veg. 13, 9-10.

Navarro-Cano, J.A., Schwiembacher, E., Sánchez-Balibrea, J., Erschbamer, B., 2017. The role of seed traits as segregation factors of hybrids in wild populations of *Cistus* (Cistaceae). Plant Biosyst. 151(3), 530-538.

Pawluczyk, M., Weiss, J., Vicente-Colomer, M.J., Egea-Cortines, M., 2012. Two alleles of *rpoB* and *rpoC1* distinguish an endemic European population from *Cistus heterophyllus* and its putative hybrid (*C. x clausonii*) with *C. albidus*. Plant Syst. Evol. 298, 409-419.

Ros, A.F., Solano, P.J., Calderón, A.A., Ferrer, M.A., 2003. Establecimiento de un protocolo de micropropagación para *Cistus heterophyllus*, una especie en peligro de extinción. Actas V Reunión de la Sociedad Española de Cultivos *In Vitro* de Tejidos Vegetales. Pamplona.

Rosato, M., Ferrer-Gallego, P.P., Totta, C., Laguna E., Rosselló, J.A., 2016. Latent nuclear rDNA instability in *in vitro*-generated plants of *Cistus heterophyllus* is activated after sexual reproduction with conspecific wild individuals Bot. J. Linn. Soc. 181(1), 127-137.

SVS, 2015. Servicio de Vida Silvestre. Plan de recuperación de *Cistus heterophyllus*. Documento técnico. Servicio de Vida Silvestre - Consellería de Infraestructuras, Territorio y Medio Ambiente de la Generalitat Valenciana. Valencia. pp. 24.

Detalle de la flor de jara de Cartagena

