

INFORME TÉCNICO 09/2016

Amplificación del material vegetal de reproducción de *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* (En peligro de extinción) mediante cruces asistidos entre plantas obtenidas por reproducción sexual y multiplicación del ejemplar silvestre valenciano

Saliendo “del cuello de botella”



Servici de Vida Silvestre
Direcció General de Medi Natural i d'Avaluació Ambiental
Juliol 2016

AMPLIFICACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL DE REPRODUCCIÓN DE *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* (EN PELIGRO DE EXTINCIÓN) MEDIANTE CRUCES ASISTIDOS ENTRE PLANTAS OBTENIDAS POR REPRODUCCIÓN SEXUAL Y MULTIPLICACIÓN DEL EJEMPLAR SILVESTRE VALENCIANO

Saliendo “del cuello de botella”

INTRODUCCIÓN

La jara de Cartagena (*Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis*) representa un reto para la conservación de la flora valenciana y española. Es una planta catalogada como En peligro de extinción en la Comunitat Valenciana (Decreto 70/2009; Orden 6/2013) y en el Estado (Real Decreto 139/2011). Recientemente se ha aprobado el Plan de Recuperación de esta planta en el territorio valenciano (Orden 1/2015). Dentro de las acciones y objetivos marcados por el citado plan, en concreto dentro del Artículo 3, se estableció como primer paso necesario la obtención de material vegetal de reproducción para los trabajos de conservación *in situ* que permita alcanzar los valores poblacionales que justifican el cambio de la especie de la categoría En peligro de extinción a la categoría de Vulnerable, mediante la creación de, al menos, 6 poblaciones con un número mínimo de 250 adultos reproductores.

Desde su hallazgo en la localidad de La Pobla de Vallbona (Valencia) en 1986, hasta el presente, únicamente se conoce un único ejemplar situado en las proximidades de una zona urbanizada. Debido a las características biológicas de la especie, prácticamente estéril por el alto grado de autoincompatibilidad, en ese único ejemplar silvestre valenciano no se conocía la producción de semillas fértiles. Por otro lado, la única población murciana conocida en la actualidad, muestra un alto grado de hibridación con *Cistus albidus*, por lo que siempre ha resultado complejo la obtención de material vegetal de reproducción, algo que ha condicionando la estrategia de conservación y en consecuencia dificulta el incremento de efectivos poblacionales y el establecimiento de poblaciones autopépetuas.

La conservación de esta planta en la Comunitat Valenciana ha pasado por varias fases, desde la producción *in vitro* de material vegetal durante la década de los 90 por el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), plantaciones de seguridad en el medio natural y con fines didácticos en rocallas con material clonado *in vitro*, rastreo exhaustivo de áreas potenciales, estudios genéticos de variabilidad y relaciones filogeográficas, estudios citogenéticos y de biología reproductiva, y más recientemente, experiencias de reproducción sexual mediante polinizaciones cruzadas entre diferentes procedencias, cuya metodología y resultados fueron ya expuestos en informes previos¹.

¹ Obtención de material vegetal de reproducción de *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis*. Servicio de Vida Silvestre. Noviembre 2015.

Trabajos recientes de conservación con *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* y ensayos de producción de semilla *ex situ*. Junio 2012.



Sin embargo, el factor limitante que siempre acompaña a los trabajos de conservación con esta planta es la producción y obtención de material vegetal a partir de la reproducción sexual, ya que la producción *in vitro*, si bien ha sido exitosa y ha permitido comenzar con los trabajos de refuerzo e introducción de ejemplares en el medio, no permite la obtención de variabilidad genética al proceder todos ellos de un único ejemplar donante. Asimismo, por otro lado, estudios recientes han demostrado que el material producido *in vitro* exhibe mutaciones del ADN ribosomal nuclear, que afectaría a las regiones relacionadas con la reproducción sexual², lo que aconseja descartar por el momento esta vía de producción de plantas y la introducción de los ejemplares clonados.

Ante este nuevo escenario todos los esfuerzos se han focalizado en la obtención de material no clonado. En el citado informe (2015) se mostraban los resultados preliminares alcanzados, comunicando la obtención en el año 2014 de las dos líneas o procedencias de plantas, sólo de origen valenciano y no procedente de técnicas de propagación *in vitro*. Estas plantas proceden de experiencias de esquejado del ejemplar silvestre y de la germinación de unas pocas semillas recolectadas también del ejemplar de la Pobla de Vallbona en el año 2013, que constituirían la colección *ex situ* o huerto productor para la realización de los cruces y polinizaciones asistidas que podrían permitir obtener gran cantidad de semillas para iniciar los trabajos de producción de planta.

Ha sido durante este año 2016, cuando la totalidad de estas plantas mantenidas *ex situ* en el CIEF han alcanzado su madurez sexual, lo que ha permitido realizar una serie de polinizaciones cruzadas con el fin de aumentar el rendimiento en cuanto a producción de semillas y calidad de las mismas.

En el presente informe se aportan los datos resultantes de esta nueva generación de cruces entre plantas de origen valenciano. El resultado de los anteriores cruzamientos entre material valenciano, murciano y africano (de la subespecie nominal) ya fueron comunicados en el informe de 2015 anteriormente mencionado.



² Marcela Rosato, P. P. Ferrer-Gallego, C.A. Tota, E. Laguna & J. A. Rossello (2016). Nuclear rDNA instability in in vitro-generated plants is amplified after sexual reproduction with conspecific wild individuals. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181(1): 127-137.

MATERIAL Y MÉTODOS

La realización de las polinizaciones cruzadas se ha realizado entre 6 plantas procedentes de la multiplicación vegetativa (esquejes) del ejemplar silvestre valenciano y 14 plantas procedentes de la germinación de unas pocas semillas recolectadas en el año 2013, también del ejemplar nativo. Además, se han realizado polinizaciones entre estas plantas y la planta silvestre de la Poble de Vallbona.

Los tipos de cruzamiento que han dado mayor rendimiento (mejor relación cantidad/calidad de semillas), son los realizados entre plantas procedentes de la germinación de semillas como receptoras de polen y las procedentes de multiplicación vegetativa por esqueje como donantes de polen (Figura 1). La selección de estos cruces ha sido resultado de los experimentales realizados desde el año 2012.



Figura 1. Cruzamientos realizados para la obtención de material vegetal de reproducción sexual entre líneas de plantas madre cultivadas en el CIEF.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han realizado 1.655 cruces durante los meses de floración (abril y mayo, ver Figura 2 y Tabla 1). Las plantas de esqueje han florecido en mayor proporción que las plantas procedentes de semilla, produciendo un total de 887 flores frente a 768 flores, lo que hace una ratio de 147,8 flores/planta producidas por las plantas de esqueje, y 54,8 flores/planta para las plantas procedentes de semilla (Tabla 1). Sin embargo sólo han cuajado un 8,9 % (79 frutos) de las flores procedentes de esqueje frente a 61,3 % (471 frutos) de las flores procedentes de semilla (Figura 2). En total de las 1.655 polinizaciones han madurado 643, dando lugar a 550 frutos maduros y bien conformados.

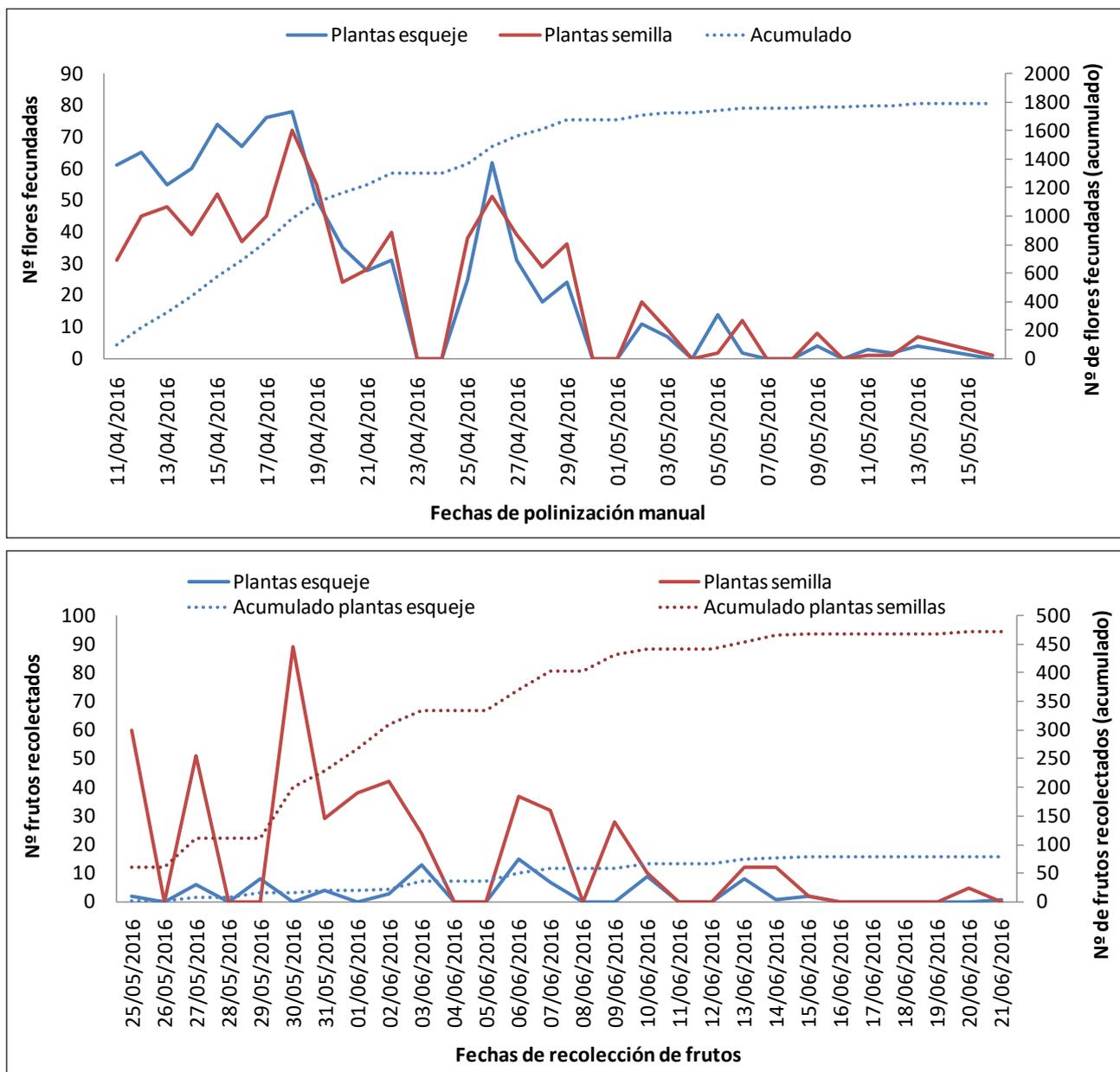


Figura 2. Cruzamientos realizados para la obtención de material vegetal de reproducción sexual entre líneas de plantas madre cultivadas en el CIEF (arriba) y recolección de frutos (abajo).

Los cruces asistidos en los que se ha utilizado el ejemplar silvestre valenciano de La Pobla como receptor de polen y como donante ejemplares cultivados en el CIEF procedentes de semillas han sido en todos los casos infructuosos. Se polinizaron un total de 13 flores en tres momentos diferentes, pero la producción de frutos ha sido nula. Aparentemente esto se debe a que la mayoría de las flores que ha producido este año el ejemplar silvestre mostraban el estigma (y también los estambres) con malformaciones (aspecto de necrosamiento o seco) (Figura 3).



Figura 3. Momento de la polinización de flores del ejemplar silvestre de la Pobla con polen de ejemplares producidos de semilla en el CIEF (izq.) e imagen donde se aprecia la atrofia en los estambres de una flor del mismo ejemplar (dcha.).

Por otra parte, en la Tabla 2 se muestran los resultados de la caracterización de las recolecciones realizadas. En suma se han recolectado 20.673 semillas, el 95,4 % (19.729) proceden de los ejemplares de semilla y el 4,6 % (944) de los ejemplares procedentes de esqueje (Figura 4), lo que asegura un aumento de la variabilidad genética para esta especie. El aumento de variabilidad genética se produce por el entrecruzamiento entre las cromáticas, 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 mutaciones nuevas lo que provocaría nuevos genotipos distintos a los originales y que pueden aparecer en la descendencia.

Se ha observado que las semillas procedentes de plantas de esqueje son de mayor tamaño que las procedentes de semilla, y el peso medio de 100 semillas es también superior, no afectando estos resultados a la viabilidad las semillas, y siendo en ambos casos superior al 90 % (Tabla 2 y Figura 5). Este hecho podría ser debido a que las plantas de esqueje tienen menos frutos que madurar, lo que aumenta las semillas en cuanto a tamaño.

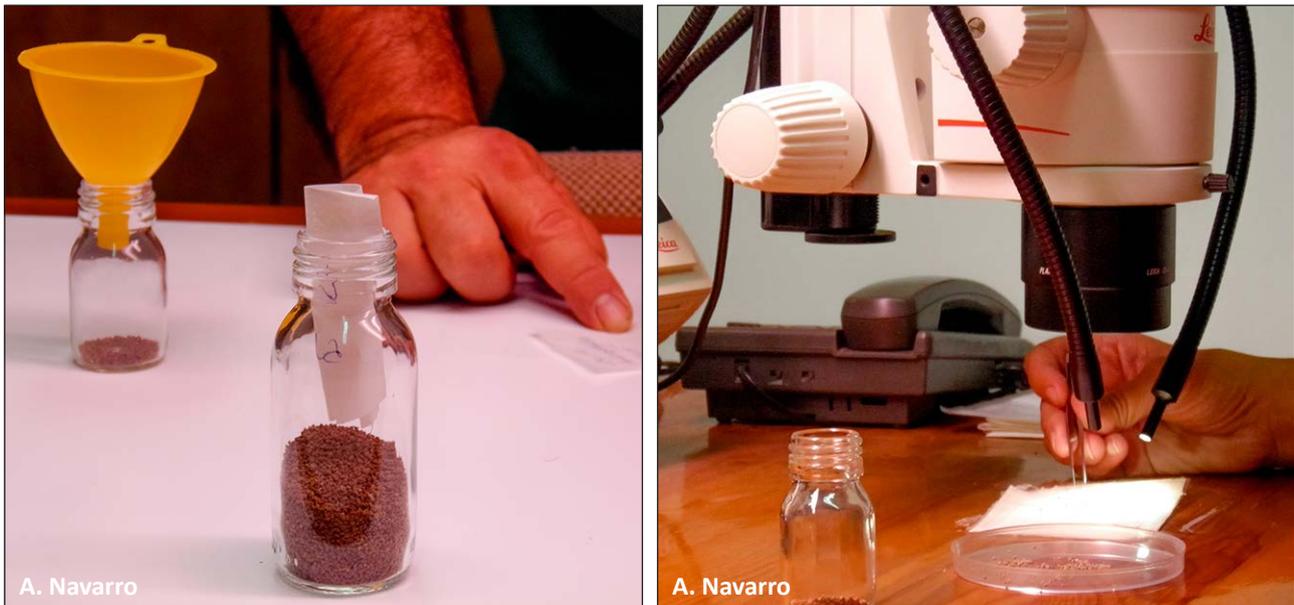


Figura 4. Lotes de semillas de *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* procedentes sólo de material valenciano.



Figura 5. Semillas de *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* procedentes de plantas originadas a partir de semilla (izquierda), de esquejado (centro) y ambas juntas (derecha, obsérvese la diferencia de tamaño según el origen, siendo las más pequeñas las de semilla). Fotografías: I. Ferrando.

La producción media de semillas es 11,9 semillas/fruto en el caso de plantas esquejadas frente a 37,6 semillas/fruto para las plantas de semilla, un dato que corrobora los resultados obtenidos en el año 2015 para el mismo cruce habiéndose obtenido una producción media de 36,9 semillas/fruto (ejemplares procedentes de esqueje como donantes de polen y ejemplares procedentes de la germinación de semilla como receptores de polen).

Tabla 1. Resultados de los cruzamientos de *Cistus heterophyllus* subsp. *carthagenensis* entre plantas procedentes de multiplicación vegetativa (esquejes) y sexual (germinación de semillas).

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

Tabla 2. Resultados de la caracterización de los lotes recolectados. Maduración, cantidad y calidad del germoplasma producido y rendimiento.

Año	Número semillas	Rendimiento (semillas/fruto)	Viabilidad semillas (%)	Peso total (g)	Peso 100 semillas (g) X ± S.D.	Dimensiones X ± S.D.
<i>C. h. carthagenensis</i> ♀ (semilla) × <i>C. h. carthagenensis</i> ♂ (esqueje)	19.729	37,64	92	16,81	0,08 ± 0,00	0,96 ± 0,13 x 1,21 ± 0,14
<i>C. h. carthagenensis</i> ♀ (esqueje) × <i>C. h. carthagenensis</i> ♂ (semilla)	944	11,94	94	0,99	0,10 ± 0,01	1,05 ± 0,13 x 1,36 ± 0,14

Parte de las semillas producidas en las experiencias de 2015 se han utilizado para producir planta. Durante el primer trimestre de 2016 fueron germinadas, desarrollando plantas vigorosas que mostraban todos los caracteres morfológicos propios de la especie. En total hay una producción de 50 plantones que se prevé introducir en el medio natural para finales del otoño (Figura 6).



Figura 6. Plantones de *Cistus heterophyllus* subsp. *carthagenensis* producidos a partir de la germinación de semillas de procedencia valenciana.

CONCLUSIONES

- En 2016 se han realizado 1.655 cruces durante abril y mayo, obteniéndose la maduración de 550 frutos y 20.673 semillas a partir de las experiencias de polinizaciones asistidas entre plantas de procedencia valenciana. Se ha roto, en consecuencia, la imposibilidad de obtener semilla que existía hasta ahora, tras 30 años de intentos por conseguir material valenciano de reproducción sexual (ver Figura 6).
- En el caso de las plantas procedentes de esquejes del ejemplar valenciano se ha observado una baja capacidad de producción de frutos (8,9 % de fructificación), incluso con la inducción de cruza-mientos asistidos, lo que confirma la barrera de fertilidad —alto grado de autoincompatibilidad— observada en campo en dicho ejemplar en La Pobla de Vallbona.
- Las plantas de esqueje han florecido en mayor proporción que las plantas procedentes de semilla, produciendo un total de 887 flores (147,8 flores/planta) frente a 768 flores (54,8 flores/planta) producidas por las plantas procedentes de semilla. Sin embargo sólo han cuajado un 8,9 % (79 frutos) de las flores procedentes de esqueje frente a 61,3 % (471) de las flores procedentes de semilla.
- De las 20.673 semillas recolectadas, el 95,4 % (19.729) procede de los ejemplares de semilla y el 4,6 % (944) de los ejemplares procedentes de esqueje, lo que asegura un aumento de la variabilidad genética para esta especie. Para demostrar el aumento de variabilidad es necesario estudios con marcadores moleculares en las plantas procedentes de semilla, esquejes y sus progenies.
- Se observa que los ejemplares procedentes de semilla (diferente combinación genética que el ejemplar de la Pobla) tienen un comportamiento diferente en cuanto a la reproducción sexual, son más fértiles, que los ejemplares procedentes de esqueje (mismo genotipo y combinación genética que el ejemplar de la Pobla). Probablemente debido a que las nuevas combinaciones genéticas aumentan la fertilidad y al hecho de que los esquejes proceden de un ejemplar envejecido con baja fertilidad, lo que hace que se comporten como el parental del que proceden.
- La producción media de semillas es de 11,9 semillas/fruto en el caso de plantas esquejadas frente a 37,6 semillas/fruto para las plantas de semilla, un dato que corrobora los resultados obtenidos en el año 2015 para el mismo cruce habiéndose obtenido una producción media de 36,9 semillas/fruto
- El mayor rendimiento de producción de material de vegetal de reproducción para el *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* se obtiene por la vía sexual y por los cruces entre ejemplares procedentes de esqueje (donantes de polen) y ejemplares procedentes de la germinación de semilla (receptores de polen).
- En los próximos años se continuará con la producción de semillas a partir de la repetición del cruce entre material de procedencia valenciana, lo que nos asegurará disponer de suficiente material de reproducción para la producción de grandes cantidades de planta y así poder comenzar las experiencias de restitución en el medio natural para cumplir con lo establecido en el Plan de recuperación de esta especie.



