

Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión)

J. M.^a Iriondo Alegría

Dpto. Biología Vegetal, E.U.I.T. Agrícola, Universidad Politécnica de Madrid.
Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid.
iriondo@ccupm.upm.es

RESUMEN

Las técnicas de conservación *ex situ* son componentes fundamentales de un programa de conservación global que contemplan esencialmente las operaciones de almacenamiento y propagación de germoplasma. El almacenamiento se lleva a cabo mediante el mantenimiento de colecciones de plantas en jardines botánicos y el establecimiento de bancos de germoplasma. Dentro de los bancos de germoplasma, los bancos de semillas convencionales constituyen la opción más sencilla y eficaz para el almacenamiento de especies con semillas ortodoxas. Estas semillas pueden igualmente almacenarse mediante técnicas de criopreservación. El almacenamiento de las semillas recalcitrantes resulta mucho más problemático debido a su sensibilidad a la desecación. Los bancos de cultivo *in vitro* constituyen una alternativa a los bancos de semillas en los casos en los que el almacenamiento de las semillas presenta dificultades. Los bancos de ADN, los bancos de polen y los bancos de yemas son otras posibilidades de almacenamiento todavía poco utilizadas.

La multiplicación por semilla constituye el método más frecuente de propagación. Sin embargo, el estado de dormición presente en muchas semillas de especies silvestres reduce significativamente su eficacia. Cuando no resulta posible la propagación por semilla o interesa propagar un determinado genotipo, se recurre a las técnicas convencionales de propagación vegetativa o a la micropropagación. Las técnicas de micropropagación resultan atractivas debido a las altas tasas de multiplicación que se consiguen y al reducido material de partida requerido. No obstante, presenta dificultades a la hora de reproducir la diversidad genética almacenada y mantener su integridad genética.

PALABRAS CLAVE: Almacenamiento
Propagación
Bancos de germoplasma
Cultivo *in vitro*
Criopreservación
Semillas ortodoxas y recalcitrantes

Recibido: 10-11-00
Aceptado para su publicación: 19-1-01

INTRODUCCIÓN

La conservación de la biodiversidad es un tema que ha venido ganando relevancia de forma progresiva en nuestra sociedad. La conservación de la flora silvestre constituye una pieza clave dentro de este enmarque. No sólo se trata de la obligación ética de preservar este legado que se nos ha dado para las generaciones venideras o del puro interés científico que puede aportar. La sociedad es cada vez más consciente de la importancia de la flora silvestre como fuente de alimentos, aceites y lubricantes, gomas, resinas, ceras, colorantes, fibra, energía, sustancias aromáticas y principios medicinales, por su valor ornamental y por su valor ecológico como indicador y elemento restaurador de situaciones ambientales degradadas (McNeely *et al.*, 1990; Prance, 1997).

Sin embargo, a pesar del creciente interés suscitado por la diversidad de la flora silvestre, la actividad humana está ocasionando un progresivo deterioro de la misma. Según datos del World Conservation Monitoring Centre (Walter y Gillett, 1998), el 12,5 % del total aproximado de 250.000 especies vegetales conocidas en nuestro planeta se encuentra en peligro de extinción. En consecuencia, gran cantidad de especies vegetales están desapareciendo antes de ser identificadas o de que sus propiedades sean mínimamente evaluadas. Hasta el momento sólo el 10 % de las especies vegetales han sido evaluadas por su potencial agronómico o medicinal, por lo que existen un gran número de cultivos y principios medicinales por descubrir (Prance, 1997). En España, la situación es similar a la existente en otros países. Según datos del Ministerio de Medio Ambiente (1999), el 12 % de 9.799 taxones de plantas vasculares presentes en España se encuentra en peligro de extinción. Ante estos datos, se impone la necesidad de tomar medidas conducentes a la conservación de la biodiversidad vegetal.

La conservación toma especial relevancia en nuestros días dado el acelerado proceso de degradación ambiental en el que vivimos. Sin embargo, la preocupación por la conservación de los recursos vegetales es tan antigua como la propia civilización humana. En el Neolítico, con el comienzo de la agricultura y el asentamiento de las poblaciones, el crecimiento y la presión de la población llevó al reconocimiento de la necesidad de conservar los recursos biológicos con objeto de asegurar un abastecimiento sostenible de alimento para la comunidad (Chang, 1985; Maxted *et al.*, 1997).

En cualquier caso, la percepción de la erosión genética como un problema a escala planetaria no tuvo lugar hasta bien entrado el siglo XX. Las señales de alarma comenzaron a tomarse en serio a mediados de los años sesenta, al descubrirse que el alto ritmo de desplazamiento de variedades primitivas cultivadas por la introducción de nuevos cultivares estaba llevando a un rápido estrechamiento de la base genética de las especies cultivadas (Dodds, 1991; Maxted *et al.*, 1997). La toma de conciencia de esta situación determinó la puesta en marcha de medidas para la conservación de los recursos fitogenéticos.

Hoy en día, la conservación de recursos genéticos es aceptada de forma generalizada como una responsabilidad social, dentro del contexto mucho más amplio de preservación de la biodiversidad. En este escenario, a la pérdida de recursos genéticos ocurrida por la sustitución de variedades tradicionales por cultivares modernos, hay que añadir la ocasionada en especies vegetales silvestres a consecuencia del deterioro de los ecosistemas naturales por la creciente actividad humana. La preocupación por la pérdida de la biodiversidad vegetal y la necesidad de tomar medidas para frenarla quedó especialmente patente en la firma del Convenio sobre Diversidad Biológica con ocasión de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y Desarrollo celebrada en Río de Janeiro (UNCED, 1992).

MODALIDADES DE CONSERVACIÓN

La conservación de la biodiversidad puede, en teoría, aplicarse a tres niveles de organización: génica, organísmica y ecológica. Con los avances de la ingeniería genética en el aislamiento, secuenciación y transferencia de genes, se acerca el momento en el que se establezcan grandes bancos de genes para su conservación. Sin embargo, por el momento, en la mayoría de los casos, los genes no se conservan individualmente, sino formando parte de organismos, poblaciones o ecosistemas. Al igual que los genes de un organismo se asocian entre ellos a través de múltiples interacciones, los individuos de una especie o de diferentes especies interactúan dentro de un ecosistema. Por ello, cuando se acomete la conservación con el máximo nivel de información –el ecosistema–, no sólo se conservan cada uno de sus componentes, sino también todas sus relaciones recíprocas. Consecuentemente, se considera que la forma más lógica y el método más económico de conservar una entidad biológica es dentro del ecosistema del que forma parte (Gómez-Campo, 1985; Prance, 1997).

Idealmente, por tanto, la conservación de los ecosistemas, y refiriéndonos al nivel de organismos, la conservación de especies amenazadas en sus hábitats naturales, o conservación *in situ*, constituye la manera más apropiada de enfocar la problemática de conservación (UNCED, 1992).

Conservación *in situ*

La conservación *in situ* de especies amenazadas implica una adecuada protección y gestión de sus ecosistemas. Existe un gran número de figuras de protección de espacios naturales en donde la actividad humana queda condicionada o restringida en mayor o menor medida. No obstante, frecuentemente la simple restricción de la actividad humana en el entorno no resulta suficiente para asegurar la supervivencia de las especies a conservar. La gestión activa de un ecosistema para conservar una determinada especie puede requerir medidas de intervención, como la preservación del medio físico en el que se desarrolla la especie amenazada, la potenciación de interacciones con otros organismos que lleven implícito un beneficio para la especie amenazada, y el establecimiento de programas de reforzamiento de poblaciones existentes, reintroducción en localidades donde la población ya se haya extinguido o, incluso, la introducción de nuevas poblaciones (Falk, 1989).

Para poder acometer de forma apropiada este tipo de acciones resulta necesario recabar previamente una gran cantidad de información sobre la especie a proteger y su ecosistema. Por ello, el proceso de conservación *in situ* se inicia con el estudio y seguimiento en el tiempo de las poblaciones, recabando datos demográficos, genéticos y autoecológicos (Schemske *et al.*, 1994; Gillman, 1997). La utilización de técnicas de análisis de viabilidad de poblaciones constituye otra herramienta de gran valor por su capacidad diagnóstica y su poder de evaluación al considerar diferentes alternativas de gestión (Menges, 1986; Iriondo, 1996).

A menudo, las actividades de conservación *in situ* se encuentran con problemas de aplicación derivados de la necesidad de establecer marcos legales de protección de las áreas y hábitats pertinentes, de conflictos de interés con otras actividades humanas, y de falta de una asignación continuada y a largo plazo de recursos económicos a las instituciones encargadas de las tareas de conservación. A esto cabe añadir, en numerosas ocasio-

nes, la falta de una información básica sobre la biología de las especies a conservar. Este tipo de limitaciones conlleva la necesidad de desarrollar métodos de conservación *ex situ*, o conservación fuera del hábitat natural, que sirvan para complementar las acciones tomadas en los hábitats naturales (Reid y Miller, 1989).

Conservación *ex situ*

Mientras está universalmente aceptado que el mecanismo más efectivo y eficiente para la conservación es la protección de los hábitats, también está reconocido que las técnicas de conservación *ex situ* constituyen componentes críticos en un programa de conservación global (Conway, 1988; Ashton, 1987).

Los programas de conservación *ex situ* complementan la conservación *in situ* almacenando a largo plazo germoplasma representativo de las poblaciones, permitiendo un mejor conocimiento de las características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del material almacenado, y proporcionando propágulos para su utilización en programas educativos, programas de mejora genética de especies cultivadas y en planes de reforzamiento, reintroducción o introducción (McNeely *et al.*, 1990).

Los métodos de conservación *ex situ* implican la recolección de muestras representativas de la variabilidad genética de una especie y su mantenimiento fuera de las condiciones naturales en las que la especie ha evolucionado. Las ventajas que proporcionan estos métodos son control directo sobre el material, fácil accesibilidad y disponibilidad (Reid y Miller, 1989).

Una vez realizada la recolección del material a conservar, la conservación *ex situ* de especies amenazadas consta de dos elementos esenciales: el almacenamiento o preservación del germoplasma y el desarrollo de métodos que posibiliten su propagación. No obstante, también deben tenerse presentes otros elementos relevantes tales como la documentación y la caracterización del germoplasma almacenado (Hummer, 1999). Conviene tener presente que la reducida disponibilidad del material vegetal disponible es un factor que siempre acompaña a las actividades de conservación de especies raras o amenazadas, de manera que la capacidad de ensayar protocolos y llevar a cabo experimentos con replicación se encuentra a menudo muy limitada (Pence, 1999). Para solventar este problema, a veces se trabaja simultáneamente con especies emparentadas no amenazadas donde la disponibilidad de material no está limitada (McComb, 1985).

ALMACENAMIENTO DE GERMOPLASMA

El almacenamiento de germoplasma de especies amenazadas tiene lugar en forma de colecciones de plantas y en los bancos de germoplasma (Laliberté, 1997).

Colecciones de plantas

Las colecciones de plantas constituyen el método tradicional de conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Bajo esta denominación se pueden considerar tanto los jardines

botánicos como las colecciones de plantas en campo. No obstante, el almacenamiento de germoplasma de especies amenazadas en forma de colecciones de plantas tan sólo tiene lugar bajo el cuidado de los jardines botánicos.

Los jardines botánicos pueden considerarse las primeras instituciones implicadas en la conservación *ex situ* de recursos vegetales. El establecimiento de colecciones de diferentes tipos de plantas se remonta a la antigüedad, estando en muchos casos vinculado a prácticas religiosas. Sin embargo, el gran desarrollo de los jardines botánicos tal como los conocemos en la actualidad llegó de la mano de las grandes potencias coloniales, que establecieron numerosos jardines en sus posesiones de ultramar y en sus propios países como método de introducción de plantas y cultivos exóticos (Smith, 1986).

En la actualidad hay cerca de 1.500 jardines botánicos por todo el mundo, de los cuales más de 500 desarrollan actividades de conservación. Los jardines botánicos cultivan alrededor de 80.000 especies, de las cuales un 10 % se encuentra en peligro de extinción (Miller *et al.*, 1995). Ello pone de manifiesto la importante contribución de la red de jardines botánicos a la conservación de especies amenazadas.

La conservación en jardines botánicos presenta una serie de problemas derivados de su irregular distribución por el mundo y del escaso soporte financiero que reciben para su mantenimiento. Así, por ejemplo, existen 532 jardines botánicos en Europa y solamente 82 en África y 66 en América del Sur. En los países tropicales, donde reside el mayor número de especies, es donde menos jardines botánicos hay. Por ello, en el conjunto de los jardines botánicos, la flora de los países tropicales y subtropicales se encuentra peor representada que la de los países de climas templados (Maxted *et al.*, 1997). A ello hay que unir el hecho de que la variabilidad intraespecífica mantenida suele ser baja, frecuentemente cada accesión está sólo representada por uno o unos pocos ejemplares. Por ello, se reconoce la necesidad de maximizar, en la medida de lo posible, la diversidad genética de las accesiones de los jardines botánicos (Heywood, 1990; Maxted *et al.*, 1997).

Bancos de germoplasma

La conservación *ex situ* de germoplasma de especies raras y amenazadas está basada esencialmente en la utilización de los bancos de germoplasma. Los bancos de germoplasma son centros orientados al almacenamiento mediante propágulos de una parte representativa de la variabilidad genética correspondiente a una determinada especie. Dentro de esta categoría podemos distinguir los bancos de semillas, los bancos de cultivo *in vitro*, los bancos de polen y los bancos de genes o bancos de ADN.

Bancos de semillas

El almacenamiento de semillas ha interesado a la humanidad desde el inicio de la Agricultura hace 10.000 años. Los antiguos agricultores almacenaban semillas para su utilización en la siembra del siguiente año o como reserva de alimento. Sin embargo, no es hasta mediados del presente siglo cuando se inicia de forma sistemática el almacenamiento de semillas con fines científicos o de conservación. El almacenamiento del material a conservar en forma de semillas constituye uno de los procedimientos de conservación *ex situ* más válidos y extendidos en la actualidad. Se ha podido comprobar que el almace-

miento de semillas a largo plazo constituye una operación relativamente simple y económica en términos de tecnología, infraestructuras, personal y gastos de mantenimiento (Maxted *et al.*, 1997). De esta manera, resulta posible mantener un gran número de semillas de diferentes especies vegetales durante largos períodos de tiempo y con un mínimo riesgo de daños genéticos. Las semillas presentan una serie de características que hacen que su almacenamiento sea el método más eficaz y económico para la conservación *ex situ* de especies vegetales. Por un lado, las semillas son unidades adaptadas a la dispersión en el tiempo y, por tanto, capaces en la mayoría de los casos de permanecer viables, de forma natural, durante largos períodos de tiempo (Chin, 1994). En segundo lugar, el pequeño tamaño de las semillas, unido a la posibilidad de que cada una de ellas posea una constitución genética diferente, asegura la conservación de una gran diversidad genética en un espacio reducido (Iriondo y Pérez, 1999).

La conservación de semillas posee mayores requerimientos técnicos que las colecciones de plantas. Sin embargo, estas últimas resultan caras en términos de mano de obra y espacio, y sólo permiten el mantenimiento de un número reducido de individuos por especie. Además, las colecciones de plantas resultan vulnerables frente a desastres naturales como incendios, tornados, plagas y enfermedades (Damania, 1996).

La conservación de semillas ofrece como mínimo un servicio de seguridad y apoyo a otras técnicas de conservación, mientras que, en el otro extremo, puede constituir la única opción disponible cuando los últimos ejemplares de una especie están a punto de desaparecer (Reid y Miller, 1989). Por ello, entre todos los métodos de conservación, los bancos de semillas son los más utilizados al ser simultáneamente prácticos y económicos.

En general, se utiliza el término «colección base» para las colecciones almacenadas a largo plazo, mientras que el término «colección activa» es aplicado a colecciones almacenadas a medio plazo y se utiliza el término «colecciones de trabajo» para referirse a colecciones de mejoradores almacenadas con objetivos a corto plazo. Por motivos de seguridad, a menudo se guardan duplicados de las colecciones base en otros bancos de semillas.

Aunque el almacenamiento en bancos de germoplasma está universalmente aceptado como parte integral de los programas de conservación de plantas silvestres, las muestras de semillas de plantas silvestres almacenadas en bancos de germoplasma suponen menos del 2 % del total de germoplasma almacenado, destinado esencialmente a plantas cultivadas (Astley, 1991).

Semillas ortodoxas y semillas recalcitrantes

Las semillas se clasifican como ortodoxas o tolerantes a la desecación cuando son capaces de mantener su viabilidad tras ser desecadas a menos de 5-10 % de contenido en humedad. Por el contrario, las semillas recalcitrantes o sensibles a la desecación pierden viabilidad cuando se desecan por debajo de un límite crítico, habitualmente entre 12-30 % de contenido en humedad (Chin y Roberts, 1980). Existe una tercera categoría en la que las semillas tienen características de almacenamiento intermedias entre las ortodoxas y las recalcitrantes. Las semillas intermedias pueden ser desecadas a contenidos de humedad similares a los de las semillas ortodoxas. Sin embargo, las semillas, una vez desecadas, se dañan al someterlas a bajas temperaturas y su viabilidad desciende rápidamente durante el almacenamiento (Ellis *et al.*, 1990a). Por ello, la determinación del comportamiento de las semillas de una especie constituye un tema trascendental de cara a su conservación a

largo plazo. Las semillas de especies con semillas ortodoxas pueden ser conservadas en bancos de semillas convencionales bajo condiciones de baja temperatura y humedad. Por el contrario, las especies con semillas intermedias o recalcitrantes no pueden mantenerse de esta manera (Marzalina y Krishnapillay, 1999).

Afortunadamente, la mayoría de las especies silvestres de las zonas templadas del planeta forman semillas ortodoxas. Las semillas recalcitrantes se encuentran en especies acuáticas, especies con semillas de gran tamaño, especies procedentes de zonas tropicales y algunas especies arbóreas de clima templado como *Quercus*, *Acer* y *Aesculus* (Chin y Roberts, 1980).

Principios de conservación de semillas

El principio básico para la conservación de semillas es la limitación de los cambios químicos que son originados por el metabolismo o los procesos de envejecimiento. Se sabe desde hace tiempo que unas condiciones de baja temperatura y bajo contenido en humedad prolongan la longevidad de las semillas. De acuerdo a las reglas de Harrington (Justice y Bass, 1978), existe una relación exponencial entre la longevidad de las semillas, la temperatura y el contenido de humedad de almacenamiento, de manera que la longevidad de una semilla se duplica por cada reducción de 5 °C en la temperatura y por cada reducción de un 1 % en el contenido de humedad. De acuerdo con este modelo, las semillas conservadas a muy bajas temperaturas y con muy bajos contenidos de humedad deberían mantenerse viables durante milenios. Sin embargo, Vertucci y Roos (1990) y Ellis *et al.* (1990b) han mostrado que existen límites a los efectos beneficiosos de la desecación sobre la longevidad y que estos límites dependen de la composición química de la semilla. También se ha comprobado que, en contra de lo establecido por las reglas de Harrington, los efectos de la temperatura y el contenido de humedad no son independientes (Vertucci y Roos, 1993). De todas formas, el uso apropiado de estos dos factores proporciona una vía aceptable para la conservación a largo plazo de muestras de semillas en bancos de germoplasma.

Conservación de semillas ortodoxas en bancos de semillas convencionales

Los métodos para la manipulación de las semillas, el envasado, los ensayos de germinación y el envío de muestras de semillas han sido evaluados en profundidad y se encuentran estandarizados para el caso de especies cultivadas (Ellis *et al.*, 1985, FAO e IPGRI, 1994) y, en principio, son igualmente aplicables a las especies silvestres.

Una vez que las semillas llegan al banco, éstas se desecan hasta un contenido de humedad de 3-7 % (FAO e IPGRI, 1994). A continuación se limpian, se cuentan y se ensaya su viabilidad antes de colocarlas en recipientes. Los recipientes utilizados para el almacenamiento suelen ser tarros de vidrio, tubos de ensayo, latas metálicas herméticas y bolsas de aluminio laminado (Chin, 1994; Iriondo y Pérez, 1999).

Los métodos de conservación convencionales normalmente incluyen el almacenamiento a temperaturas comprendidas entre 5 °C y -20 °C. En la conservación a largo plazo las semillas se almacenan normalmente a -18 °C, mientras que en la conservación a medio plazo se utiliza una temperatura de 0 a 10 °C (Ellis *et al.*, 1985).

Independientemente de las condiciones de almacenamiento utilizadas, la viabilidad de las muestras debe ser controlada periódicamente. Si el porcentaje de germinación es inferior al 85 % del valor inicial en muestras almacenadas en colecciones a largo plazo y al 65 % del valor inicial en colecciones activas, se recomienda su regeneración ya sea mediante nuevas recolecciones o por multiplicación a partir de las semillas viables (FAO e IPGRI, 1994). La regeneración mediante recolección en muchos casos no es posible al haber desaparecido las poblaciones naturales y la multiplicación inevitablemente conlleva alteraciones en la composición genética de las muestras, originando, frecuentemente, una disminución de la variabilidad genética y, en cualquier caso, pérdida de genotipos. Por ello, resulta prioritario garantizar unas condiciones adecuadas de almacenamiento para retrasar en lo posible la regeneración.

A cada muestra de semillas le corresponde información sobre el lugar de recolección, viabilidad inicial y métodos para la ruptura de la dormición. Igualmente importante resulta el número de identificación del banco, el nombre de la especie y su localización en las cámaras de almacenamiento. De forma adicional, la muestra de semillas puede ser caracterizada y evaluada bajo criterios genéticos, fenotípicos y agronómicos. Toda esta información sobre las colecciones, de gran importancia para el futuro uso de las muestras almacenadas, se organiza e incluye en una base de datos.

Conviene hacer una distinción entre el diseño y los procedimientos utilizados en un banco de semillas de especies cultivadas y los llevados a cabo en un banco de semillas de especies silvestres. Los bancos de semillas de especies cultivadas manejan miles de accesiones de especies cuyas semillas son habitualmente de considerable tamaño. En consecuencia, estos bancos de semillas necesitan mucho más espacio y cierto número de facilidades adicionales para cumplir sus objetivos. Por el contrario, los bancos de semillas de especies silvestres normalmente poseen menos accesiones y las semillas almacenadas son más pequeñas. El desecado puede realizarse mediante desecantes químicos, un método poco práctico para bancos de semillas de especies cultivadas. El gel de sílice se vende con un indicador de cobalto que posee un color azul. Cuando absorbe humedad se torna rosa y permite detectar la presencia de cualquier agujero o grieta en el envase. Las ampollas de vidrio cerradas a la llama utilizadas en muchos bancos de semillas de especies silvestres son probablemente los envases más adecuados para el almacenamiento de semillas, pero son demasiado caros y requieren demasiada mano de obra para los bancos de semillas de especies cultivadas (Gómez-Campo, 1987).

La conservación de semillas de especies silvestres ha experimentado un gran desarrollo en España a lo largo de las últimas décadas. El Banco de Germoplasma del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad Politécnica de Madrid ha sido pionero en estas actividades y en la actualidad cuenta con cerca de 9.500 accesiones de semillas. Otras instituciones que cuentan con bancos de semillas de especies silvestres son el Jardín Botánico de Córdoba, el Jardín Botánico de Madrid, el Jardín Canario, el Jardín Botánico de Valencia, el Jardín Botánico de Sóller (Mallorca) y el Jardín Botánico «Marimurtra» de Blanes (Girona) (Ministerio de Medio Ambiente, 1999). El resto de los países de la región mediterránea posee una cobertura de bancos de semillas de especies silvestres mucho más escasa. Desde la Organización para la Investigación Fitotaxonomica del Área Mediterránea (OPTIMA) se están llevando a cabo diversas iniciativas encaminadas a trasladar el ejemplo de España al resto de países del Mediterráneo (Iriondo y De Hond, 1996).

Crioconservación de semillas ortodoxas

A la conservación de material vivo a muy bajas temperaturas se le conoce con el nombre de crioconservación (Pritchard, 1995). En la crioconservación se persiguen temperaturas inferiores a $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ para alcanzar unas condiciones de ausencia de agua en estado líquido, baja energía cinética molecular y una difusión extremadamente lenta, y así lograr que las reacciones químicas se encuentren prácticamente paralizadas (Pritchard, 1995). Bajo estas condiciones, se postulan longevidades extremadamente largas y sólo limitadas por la acumulación de lesiones genéticas producto de la radiación de fondo. Las técnicas de crioconservación utilizan normalmente nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) debido a su coste relativamente bajo (Benson, 1999).

Los protocolos para el almacenamiento en nitrógeno líquido de semillas ortodoxas fueron establecidos por Stanwood y Baas (1981). Se ha podido comprobar que las semillas ortodoxas de un gran número de especies son capaces de sobrevivir a la crioconservación en nitrógeno líquido (i.e. Iriondo *et al.*, 1992). En algunas especies se han observado roturas de las semillas y agrietamiento de las cubiertas seminales (Stanwood, 1985). Sin embargo, un control cuidadoso de la velocidad de enfriamiento, el contenido de humedad de la semilla y la velocidad de descongelación pueden ser cruciales para obviar estos daños. Las semillas pequeñas son las que se adaptan mejor a esta técnica, mientras que las especies con semillas grandes y con alto contenido en lípidos son las más problemáticas.

Las semillas se almacenan normalmente en recipientes específicamente diseñados para tal efecto en la fase de vapor del interior de tanques que contienen nitrógeno líquido, aproximadamente a $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$. El nivel de nitrógeno líquido se vigila periódicamente para mantener las semillas almacenadas a la temperatura de $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Iriondo y Pérez, 1999).

Las semillas ortodoxas no suelen requerir un enfriamiento gradual. Sin embargo, cuando el contenido de humedad de las semillas es alto puede resultar necesario una desecación previa de las mismas, ya que el contenido de humedad de las semillas es uno de los factores más importantes para controlar la respuesta de la semilla a la exposición a nitrógeno líquido (Vertucci, 1989; Vertucci y Roos, 1993). Nuestros estudios han mostrado que las semillas de numerosas especies silvestres y cultivadas que tras la recolección presentan contenidos de humedad entre 4 y 12 % pueden ser almacenadas directamente en nitrógeno líquido, sin necesidad de desecación previa ni de un enfriamiento gradual (Iriondo *et al.*, 1992). La descongelación de las semillas crioconservadas se lleva a cabo colocándolas directamente a temperatura ambiente al sacarlas de los tanques de crioconservación.

En estas circunstancias se evita la necesidad de llevar a cabo controles de viabilidad, responsables de una disminución significativa del número de semillas almacenadas, y se soslayan los riesgos de cambio genético asociados a los procesos de multiplicación. Otras ventajas de las técnicas de crioconservación son la ausencia de controles de temperatura y humedad durante el almacenamiento, la inexistencia de daños por parásitos y patógenos y, en teoría, una viabilidad indefinida. Por ello, los bancos de crioconservación de semillas ortodoxas constituyen una alternativa interesante a los bancos de semillas convencionales, principalmente para muestras de las que no se dispone gran cantidad de semilla y de las que no es factible realizar nuevas recolecciones (Stanwood, 1985).

Estas técnicas han sido utilizadas con éxito en varias especies raras o amenazadas de España, como *Coronopus navasii* (Cav.) DC., *Vella pseudocytisus* L., *Cistus osbeckiiifolius* Webb ex Christ. y *Helianthemum polygonoides*, Peinado *et al.* (González-Benito *et*

al., 1998). De igual manera, diversas especies amenazadas están siendo conservadas mediante criopreservación de semillas por parte de instituciones de Estados Unidos y Australia (Falk, 1987; Touchell y Dixon, 1994).

Además de semillas ortodoxas, las esporas de pteridofitos y briofitos también pueden ser criopreservadas. Así, por ejemplo, se han logrado conservar con éxito esporas del helecho arborescente amenazado *Cyathea spinulosa* (Agrawal *et al.*, 1993) y del helecho *Asplenium billotii* (Iriondo, no publicado).

Las técnicas de criopreservación pueden igualmente resultar especialmente útiles en el almacenamiento de semillas recalcitrantes y la conservación de otros propágulos como ápices de tallos, yemas o meristemos para los que no existen en la actualidad otras alternativas para la conservación a largo plazo (Benson, 1999; Marzalina y Krishnapillay, 1999).

Conservación de semillas recalcitrantes

Las semillas recalcitrantes tienen longevidades cortas que oscilan entre unas pocas semanas y varios meses (Chin y Roberts, 1980). Los tres factores que contribuyen a la corta longevidad de las semillas almacenadas son: sensibilidad a la desecación, daños por frío y problemas de contaminación microbiana y germinación durante el almacenamiento asociados a su alto contenido en humedad.

Se sabe que la velocidad de desecación, el estado de desarrollo, la temperatura y la concentración de O₂ son factores que afectan al contenido crítico de humedad de las semillas recalcitrantes (Berjak *et al.*, 1993). Esto indica que la expresión de la sensibilidad a la desecación es un carácter multifactorial en el que las condiciones ambientales y el metabolismo juegan un papel fundamental. Las semillas recalcitrantes se caracterizan a menudo por su incapacidad para limitar su metabolismo o por disponer de un sistema de eliminación de radicales libres incompleto y, en consecuencia, por quedar expuestas durante largos períodos a los radicales libres.

Para mantener la viabilidad, las semillas recalcitrantes se conservan a una temperatura tan baja como sea posible bajo condiciones que mantengan un contenido de humedad de las semillas ligeramente superior al límite crítico y aseguren un aporte de oxígeno para la respiración (Marzalina y Krishnapillay, 1999). Dado que la longevidad de las semillas bajo estas condiciones es tan sólo del orden de semanas o meses, estas especies se conservan habitualmente en colecciones de campo.

En la actualidad se están desarrollando métodos para que los tejidos puedan ser expuestos a temperaturas inferiores a 0 °C sin que se forme hielo letal. Estos métodos requieren optimizar el contenido de humedad de la semilla y enfriar los tejidos hasta una temperatura apropiada y a una velocidad adecuada de manera que tanto los daños por desecación como por congelación sean evitados (Chin, 1988).

Uno de estos métodos está orientado a semillas recalcitrantes que son extremadamente sensibles a la desecación y no pueden sobrevivir a contenidos de humedad inferiores al 60 % (por ejemplo, cítricos). Estas semillas se almacenan en un estado de vitrificación en el que no se forman cristales de hielo a pesar de encontrarse a temperaturas inferiores a 0 °C (Fahy *et al.*, 1984). Estos cristales de hielo se evitan mediante el tratamiento de las semillas con sustancias crioprotectoras y la utilización de velocidades de enfriamiento extremadamente rápidas (hasta 2.000 °C/min). Las sustancias crioprotectoras previenen la

desnaturalización de los constituyentes de la célula durante la fase de desecación y estabilizan el estado de vitrificación (Benson, 1999). Se ha observado que muchos sistemas vegetales recopilan este tipo de sustancias durante determinados estados de desarrollo. Así, durante la maduración de la semilla, las semillas ortodoxas acumulan cantidades masivas de azúcares y proteínas que se consideran protectoras frente a varios tipos de estrés (Vertucci y Roos, 1990). Las sustancias protectoras de síntesis habitualmente utilizadas son el dimetil sulfóxido (DMSO) y el etilenglicol. Una vez que se optimiza el contenido de humedad en la semilla, los tejidos se enfrían rápidamente con nitrógeno líquido. La descongelación de las muestras criopreservadas también es crítica y normalmente se lleva a cabo de forma rápida para evitar la formación de hielo.

Una segunda aproximación a la conservación de semillas recalcitrantes consiste en separar los ejes embrionarios de los cotiledones, desecarlos y almacenarlos en nitrógeno líquido. La recuperación de la planta tras el almacenamiento es mediante técnicas de cultivo *in vitro*. Así, por ejemplo, se han realizado ensayos en este sentido con *Quercus faginea* y *Corylus avellana*, habiéndose obtenido tasas de recuperación del 60 y 80 %, respectivamente (González-Benito y Pérez 1992, 1994b).

Bancos de cultivo in vitro

Si bien la conservación *ex situ* en bancos de semillas constituye la alternativa más utilizada, en ciertas especies surgen problemas de propagación o conservación que impiden o dificultan el uso de dicha solución. Este sería el caso de: a) especies con semillas recalcitrantes (Roberts y King, 1982); b) especies que no producen semilla, con baja o nula fertilidad o con producción reducida de semillas o de polen (Pence, 1999); c) clones con elevado grado de heterocigosis que han sido seleccionados por sus características en una población natural y que deben ser mantenidos mediante propagación vegetativa. La conservación por semilla permite el almacenamiento de los genes del clon, pero puede resultar difícil recuperar la combinación heterocigótica para la que fueron seleccionados los clones (Withers, 1985); d) especies perennes con ciclos de vida muy largos que no producen semilla hasta cierta edad. Estas especies se suelen propagar vegetativamente para acortar la entrada en producción, aunque posean semillas viables y con capacidad de ser conservadas en un banco de germoplasma; e) especies con una población natural extremadamente reducida donde la mera recolección de semillas pueda afectar a la supervivencia de la población (Clemente, 1999). En estos casos, las técnicas de almacenamiento o conservación *in vitro* constituyen una alternativa válida a la conservación de semillas de especies raras o amenazadas.

Los protocolos de conservación *in vitro* se atienen, en todos los casos, a las siguientes etapas: a) obtención del explanto; b) establecimiento del cultivo; c) almacenamiento; d) recuperación de un cultivo viable; e) regeneración de plantas (Dodds, 1991).

En este protocolo el almacenamiento es normalmente la etapa que implica más costes, tanto en equipamiento como en personal. En el caso de que el cultivo se mantenga en condiciones normales (crecimiento continuo), los repicados deberán hacerse en intervalos que oscilarán de varios días a varios meses, dependiendo del tipo de cultivo y de las especies. Además, en estas circunstancias, los subcultivos están expuestos a un continuo riesgo de pérdidas por accidente o contaminación, a lo que hay que añadir el riesgo de alteraciones genéticas (variación somaclonal) (Phillips *et al.*, 1994; Lynch, 1999; Pence, 1999).

El período comprendido entre repicados puede extenderse induciendo un crecimiento limitado del cultivo mediante reducción de la temperatura y/o iluminación, estrés osmótico, reducción de la presión parcial de oxígeno, desecación del material vegetal, o alteración de los medios de cultivo, eliminando componentes nutritivos o incorporando retardantes de crecimiento. Entre estas alternativas, la utilización de bajas temperaturas y la manipulación de los componentes del medio de cultivo son las más aconsejables desde un punto de vista práctico, por su eficacia y simplicidad (Lynch, 1999).

Si bien las técnicas de almacenamiento *in vitro* se han aplicado de forma extensiva en la conservación de recursos fitogenéticos de plantas cultivadas (Dodds, 1991), existen muy pocos precedentes de aplicación en especies amenazadas (Arora y Bhojwani, 1989). En España se han utilizado las técnicas de almacenamiento *in vitro* mediante crecimiento limitado con *Centaurium rigualii*, *Coronopus navasii*, *Lavatera oblongifolia*, *Limonium calaminare*, *Limonium catalaunicum*, *Limonium dufourii*, *Limonium estevei* y *Limonium gibertii* (Iriondo y Pérez, 1991; Martín, 1993). Las mejores condiciones de almacenamiento se consiguieron a 5 °C en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sólo o suplementado con 4,44 µM benciladenina (BAP) + 0,54 µM ácido naftalenacético (NAA).

La conservación *in vitro* a largo plazo pasa por el almacenamiento del material cultivado bajo condiciones de criopreservación. Al igual que con la criopreservación de las semillas, a estas bajas temperaturas el metabolismo queda totalmente paralizado, con lo que se garantiza la conservación del material durante un período indefinido de tiempo. La criopreservación del material cultivado *in vitro* plantea mayores dificultades que la criopreservación de semillas, debido al mayor contenido en humedad presente en los tejidos. Para superar este problema se llevan a cabo tratamientos previos con sustancias crioprotectoras y se desarrollan protocolos específicos de congelación y descongelación (Pence, 1999).

La aplicación de estas técnicas al almacenamiento de especies amenazadas ha sido hasta el momento muy escasa. En España se ha experimentado con las técnicas de criopreservación de vitrificación y encapsulación-deshidratación en *Centaurium rigualii* y en *Antirrhinum microphyllum* (González-Benito y Pérez, 1994a; González Benito *et al.*, 1997; González-Benito *et al.*, 1998).

Bancos de ADN

Con el avance de las técnicas de ingeniería genética que posibilitan la transferencia de genes entre especies totalmente distintas, una nueva alternativa que comienza ahora a perfilarse es la instalación de bancos de ADN. Entre sus ventajas están la pequeña cantidad de material vegetal necesaria para su almacenamiento y la posibilidad de transferir genes a genotipos o especies relacionadas. Esta técnica puede ser utilizada con especies amenazadas o incluso extintas tomando muestras del material en vivo o a partir de especímenes de herbario (Wang *et al.*, 1993). En los bancos de ADN, el ADN extraído de individuos de una determinada población se almacena a bajas temperaturas (congeladores a -80 °C o tanques de nitrógeno líquido). En la actualidad, esta alternativa sólo presenta utilidad en el caso de especies o géneros cuyo genoma ha sido profundamente estudiado y donde se conocen las secuencias de numerosos o importantes genes. Sin embargo, es posible que en un futuro este tipo de bancos vaya extendiéndose a medida que se vayan implantando las técnicas de ingeniería genética en los procesos de mejora y obtención de nuevos cultivares.

Otros bancos de germoplasma

Los bancos de polen y los bancos de yemas vegetativas son otras dos opciones de conservación que en principio podrían ser aplicables a la conservación de especies raras o amenazadas. En ambos casos, el almacenamiento se realiza a bajas temperaturas, siendo aplicables las técnicas de criopreservación. Los bancos de polen tienen la ventaja de que requieren un mínimo espacio y resultan aplicables tanto a especies con semillas ortodoxas como a especies con semillas recalcitrantes. Sin embargo, sólo conservan la mitad del genoma, el polen tricelular resulta muy difícil de almacenar, necesita de una colección de campo que proporcione flores femeninas para llevar a cabo una propagación convencional y los propágulos no están directamente disponibles (Wang *et al.*, 1993). Los bancos de yemas vegetativas se utilizan en la actualidad en la conservación de clones de especies frutales y requieren la puesta a punto de la técnica de injerto sobre planta patrón. Esta técnica podría ser aplicable a determinados casos de especies arbustivas o arbóreas en peligro de extinción.

PROPAGACIÓN

Una componente fundamental de la conservación *ex situ* de especies raras o amenazadas consiste en el desarrollo de métodos de propagación y cultivo que posibiliten la utilización del material almacenado en operaciones de conservación *in situ* como reforzamientos, reintroducciones o introducciones, en estudios científicos para un mejor conocimiento de la especie o en ámbitos de divulgación cultural y educativa como jardines botánicos o centros de interpretación de espacios naturales.

Propagación por semilla

Tanto en angiospermas como en gimnospermas el método más habitual de propagación es a partir de semillas. El período que comprende desde la germinación de la semilla hasta el establecimiento de las plántulas es el más vulnerable de todo el ciclo vital, ya que la semilla en germinación está expuesta a drásticas variaciones en contenido de humedad y temperatura y las plántulas son muy susceptibles a daños por plagas y enfermedades y a la competencia con otras plantas (Iriando y Pérez, 1999).

El período de germinación se caracteriza a través de dos parámetros: el porcentaje de semillas que germinan y la velocidad de germinación. Cuando estos parámetros se estudian bajo condiciones ambientales óptimas controladas resulta posible estimar la germinabilidad intrínseca y el vigor de una muestra de semillas. Estos factores dependen esencialmente de la existencia de dormición, la presencia de infecciones microbianas, el tamaño de la semilla, su edad y las condiciones de almacenamiento (Forbes y Watson, 1992). Mientras en las semillas de plantas cultivadas la germinabilidad de las semillas ha sido tan mejorada que no se tiene casi en consideración, la baja germinación de una muestra de semillas de especies silvestres puede constituir una grave limitación para una propagación efectiva (Iriando y Pérez, 1999).

La dormición o incapacidad del embrión para germinar debido a causas inherentes a la propia semilla suele ser a menudo uno de los factores que limita en mayor medida la germinación de semillas de especies silvestres (Bewley y Black, 1994).

Existen dos categorías básicas de dormición en función de la localización de los mecanismos que bloquean la germinación. A menudo, la semilla presenta dormición porque los tejidos que envuelven al embrión (cubiertas seminales, endospermo, pericarpo) impiden la germinación. Los mecanismos que impiden la germinación en la dormición impuesta por las cubiertas pueden ser interferencia con la absorción de agua o con el intercambio de gases, restricciones mecánicas, retención de inhibidores procedentes del embrión y suministro de inhibidores al embrión. Este tipo de dormición no se rompe en la naturaleza hasta que la cubierta resulta dañada por la actividad microbiana, por procesos de congelación o por el fuego (Bewley y Black, 1994). Por tanto, la manera de eliminar este tipo de dormición, al objeto de incrementar el porcentaje de germinación de las semillas, consiste en llevar a cabo una escarificación de las cubiertas. Dependiendo de la especie, la escarificación puede llevarse a cabo por métodos mecánicos (papel de lija), químicos (ácido sulfúrico) o sometiendo a las semillas a elevadas temperaturas, en agua caliente (calor húmedo) o en una estufa (calor seco) (Iriondo y Pérez, 1999).

Por el contrario, se dan casos en los que la naturaleza de la dormición reside en el propio embrión y en donde la eliminación de las cubiertas no permite la germinación del embrión. En algunas orquídeas los embriones no se encuentran totalmente formados en el momento de la dispersión de las semillas y necesitan tiempo para madurar. Más frecuentemente, la dormición del embrión es consecuencia de la presencia de inhibidores en el mismo. El balance entre reguladores de crecimiento endógenos, inhibidores y promotores de la germinación resulta afectado por las condiciones ambientales externas que pueden llegar a romper la dormición (Bewley y Black, 1994). Algunas semillas requieren ser imbibidas en agua a cierta temperatura durante algún tiempo. Esto se puede conseguir almacenando las semillas entre capas de arena u otro sustrato humedecido, procedimiento denominado estratificación. Otros factores que pueden romper este tipo de dormición son la alternancia de temperaturas, el lavado de inhibidores solubles al agua o la imbibición en soluciones de ácido giberélico (Iriondo y Pérez, 1999).

Existe una amplia literatura referida a estudios sobre la germinación de semillas de especies raras y amenazadas en la región mediterránea. Iriondo *et al.* (1994) proporcionan una recopilación de estudios llevados a cabo en este área.

Propagación vegetativa

Las técnicas de propagación vegetativa son muy importantes para la conservación de la integridad genética del material vegetal. Estas técnicas se han desarrollado a lo largo de varios siglos y la investigación en este campo es todavía muy activa (Matthews, 1999).

Su utilización en el campo de especies vegetales amenazadas reside fundamentalmente en los jardines botánicos, a la hora de multiplicar material vegetal para su exposición o con fines de estudio o intercambio. No obstante, estas técnicas también pueden ser utilizadas de cara a la obtención de material vegetal para actuaciones de reforzamiento, introducción o reintroducción cuando la reproducción por vía sexual no resulta factible o eficaz. En estos casos se debe tener la precaución de mantener controlada la identidad genética del material propagado y de tener en cuenta, no sólo la producción de un determinado

número de individuos, sino también la producción de un mínimo número de genotipos distintos.

Existe un amplio abanico de técnicas de propagación vegetativa y la elección de la más adecuada pasa por tener previamente un profundo conocimiento de la morfología de la especie y de la existencia de algún medio de propagación vegetativa natural en la misma (Hartmann *et al.*, 1997). Si bien la propagación por esquejes o estaquillas de tallo es la técnica más utilizada, no deben olvidarse otras posibilidades, como división de mata, división de rizomas, tubérculos y estolones, propagación por bulbos, pseudobulbos o bulbillos, propagación mediante esquejes de hoja, propagación a partir de raíces y propagación por injerto (Hartmann *et al.*, 1997).

Micropropagación

Las técnicas de cultivo *in vitro* han sido utilizadas de forma extensiva en la propagación y conservación de recursos fitogenéticos en agricultura (George y Sherrington, 1984; Dodds, 1991). De igual manera estas técnicas han sido adaptadas para su utilización en un amplio rango de especies silvestres con problemas de propagación por métodos convencionales y/o con poblaciones extremadamente reducidas (Fay, 1992).

En la mayoría de los casos, la micropropagación se lleva a cabo utilizando yemas o meristemas caulinares como material de partida (Lynch, 1999). Los meristemas tienen la ventaja de ser un material muy estable desde un punto de vista genético y de encontrarse normalmente libre de virus. No obstante, a menudo resulta difícil su utilización debido a que su manipulación es más compleja a consecuencia de su reducido tamaño (0,2-1,0 mm) y al largo período de tiempo requerido para el desarrollo de los tallos. Debido a ello es más frecuente la utilización de explantos caulinares constituidos por el meristemo apical y uno o más nudos, debido a que son más fáciles de manipular, se establecen rápidamente y a menudo proliferan bien. En esencia, el proceso conlleva cinco etapas (Clemente, 1999): 1) preparación de las plantas madre donadoras de los explantos, al objeto de que se encuentren en condiciones fisiológicas y sanitarias óptimas; 2) establecimiento del cultivo, introduciendo los explantos iniciales, previamente sometidos a asepsia, en el medio de cultivo; 3) multiplicación, a partir de las yemas axilares de los tallos en desarrollo o mediante la inducción de yemas adventicias; 4) elongación de los tallos y enraizamiento, y 5) aclimatación a condiciones *ex vitro*, mediante la exposición progresiva de las plantas a las condiciones de temperatura, luz y humedad existentes en el invernadero.

Cuando se trata de conservar la mayor diversidad genética posible de una población, las semillas constituyen normalmente el material de propagación preferido. Si la germinación de las semillas es baja cuando se utilizan métodos convencionales, las técnicas de cultivo *in vitro* pueden contribuir a mejorar los porcentajes de germinación (Fay *et al.*, 1999). Además, cuando la disponibilidad de semillas es escasa, situación común en muchas especies amenazadas, a la germinación *in vitro* le sucede una etapa de proliferación al objeto de producir un mayor número de plantas. De esta manera, se ha llevado a cabo con éxito la germinación *in vitro* de varias especies de orquídeas tropicales amenazadas, como *Dendrobium spectatissimum*, *Cymbidium rectum*, *Clowesia rosea* y *Epidendrum ilense* utilizando diversos medios de cultivo, a menudo con la adición de sustancias indefinidas o complejas, como pulpa de banana y extracto de patata (Fay *et al.*, 1999). En el

caso de algunas orquídeas terrestres de climas templados (i.e. *Orchis laxiflora* y *Liparis loeselii*) la germinación *in vitro* se ha conseguido gracias al desarrollo de protocolos de cultivo simbiótico con micorrizas (Fay *et al.*, 1999).

En la región mediterránea se han desarrollado métodos de micropropagación para un importante número de especies amenazadas. Iriondo *et al.* (1994) aportan información sobre la aplicación de técnicas de micropropagación en 63 especies mediterráneas. Más recientemente, González Benito *et al.* (1999) recogen referencias publicadas correspondientes a 36 especies españolas amenazadas.

Los beneficios potenciales del uso de sistemas de cultivo *in vitro* pueden ser enormes, entre los que se encuentran: (1) las altas tasas de multiplicación que se consiguen, (2) la de ser un cultivo aséptico que puede mantenerse libre de hongos, bacterias, virus e insectos parásitos, (3) el espacio reducido que ocupan, (4) la economía frente a colecciones de campo y (5) las múltiples aplicaciones en programas de mejora genética (Dodds, 1991).

Sin embargo, las técnicas de micropropagación no están exentas de problemas. En muchos casos, la micropropagación de una especie presenta enormes dificultades debidas a la contaminación del material de partida, la falta de respuesta del explanto inicial, la hiperhidratación de los tallos y la ausencia de enraizamiento (Lynch, 1999). Un problema adicional es la posible ocurrencia de variación somaclonal, entendiéndose ésta como la aparición de variación genética en el material vegetal a consecuencia del cultivo *in vitro* (Scowcroft, 1985). Este problema, existente en las diversas aplicaciones de las técnicas de micropropagación, cobra especial importancia en la conservación de especies amenazadas, en donde lo que se pretende es conservar la diversidad genética original procedente de una población natural (Fay *et al.*, 1999; Pence, 1999; Touchell y Dixon, 1999). El problema puede ser minimizado mediante una cuidadosa selección del material vegetal de partida y de los medios de cultivo, y la evaluación genética del material micropropagado (Iriondo y Pérez, 1996; Lynch, 1999).

La dificultad para propagar material genéticamente diverso y el riesgo de variación somaclonal hacen que las técnicas de cultivo *in vitro* solamente se deban utilizar en conservación en casos críticos en los que la propagación por semilla resulta inviable o muy poco efectiva.

CONSIDERACIONES FINALES

En la actualidad se considera que las técnicas de conservación *in situ* y *ex situ* constituyen aproximaciones complementarias para alcanzar un objetivo común (Falk, 1989; UNCED, 1992; Ramanatha Rao y Riley, 1994). De igual manera, los diversos métodos de almacenamiento y propagación disponibles no deben identificarse como alternativas excluyentes (Withers, 1993). Los planes de recuperación de especies amenazadas tienden hacia un enfoque integrado en la utilización de los métodos de conservación. Cada técnica de conservación posee ventajas e inconvenientes y por ello resulta interesante complementar unos y compensar otros mediante la integración de varios métodos (Maxted *et al.*, 1997).

Un elemento clave inherente a cualquier técnica de conservación es el adecuado manejo de la información. Para una adecuada gestión *in situ* se requiere obtención, organización y procesamiento de información relativa a la biología de la especie a conservar, la ubicación de las poblaciones y las características del medio físico y biótico (Schemske *et al.*,

1994). Paralelamente, en conservación *ex situ* los bancos de germoplasma y jardines botánicos requieren igualmente una adecuada recopilación y manejo de la información relativa a las colecciones, su identidad taxonómica y genética, su estado fisiológico y sanitario, su ubicación en el centro y los datos de origen del material vegetal. Por todo ello, el éxito y los beneficios de los programas de conservación dependen en gran medida de este factor, que, en ocasiones, no es suficientemente considerado.

SUMMARY

Germplasm conservation of rare and threatened plant species

Ex situ conservation techniques are basic elements in a global conservation program. They essentially consist of germplasm storage and propagation operations. Storage is performed through the maintenance of plant collections in botanical gardens and the establishment of germplasm banks. Among the different types of germplasm banks, seed banks are the simplest and most efficient alternative for the storage of species with orthodox seeds. These seeds can also be stored using cryopreservation techniques. The storage of recalcitrant seeds is more troublesome due to their sensitivity to desiccation and *in vitro* banks can be an alternative to seed banks when seed storage is not feasible. DNA stocks, pollen banks and bud banks are other possibilities for storage scarcely used yet.

Seed multiplication is the most frequent method of propagation. However, the dormancy displayed by many seeds of wild plant species often reduces the efficiency of this method significantly. When seed propagation is not feasible or there is an interest in the propagation of a particular genotype, conventional techniques of vegetative multiplication or micropropagation techniques can be used. Micropropagation techniques are attractive due to its high multiplication rates and the reduced amount of starting material that is required. Nevertheless, significant problems can arise to reproduce the stored genetic diversity of one species and maintain its genetic integrity.

KEY WORDS: Storage
Propagation
Germplasm bank
In vitro culture
Cryopreservation
Orthodox and recalcitrant seeds

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL D.C., PAWAR S.S., MASCARENHAS A.F., 1993. Cryopreservation of spores of *Cyanthea spinulosa* Wall. ex. Hook. f. - an endangered tree fern. *Journal of Plant Physiology* 142,124-126.
- ARORA R., BHOJWANI S.S., 1989. *In vitro* propagation and low temperature storage of *Saussurea lappa* C.B. Clarke - An endangered, medicinal plant. *Plant Cell Reports* 8,44-47.
- ASHTON P.S., 1987. Biological considerations in *in-situ* versus *ex-situ* plant conservation. En: *Botanic Gardens and the World Conservation Strategy*. Bramwell, D., Hamann, O., Heywood, V.H., Synge, H., eds. Academic Press, London, pp. 117-130.
- ASTLEY D., 1991. Exploration: Methods and Problems of Exploration and Field Collecting. En: *Genetic Conservation of World Crop Plants*. Hawkes, J.G., ed. Academic Press, Harcourt, Brace and Javnovitch Publishers, London, pp. 11-22.
- BENSON E., 1999. Cryopreservation. En: *Plant Conservation Biotechnology*. Benson, E. (ed.). Taylor & Francis, London, pp. 83-95.
- BERJAK P., VERTUCCI C.W., PAMMENTER N.M., 1993. Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds of *Camelia sinensis*. *Seed Science Research* 3,155-166.

- BEWLEY J.D., BLACK M., 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, New York, 462 pp.
- CHANG T.T., 1985. Crop history and genetic conservation: rice - a case study. *Iowa State Journal of Research* 59, 425-455.
- CHIN H.F., 1988. *Recalcitrant Seeds. A Status Report*. IBPGR, Roma, 28 pp.
- CHIN H.F., 1994. Seedbanks: conserving the past for the future. *Seed Science and Technology* 22, 385-400.
- CHIN H.F., ROBERTS E.H., 1980. *Recalcitrant Crop Seeds*. Tropical Press SDN. BHD, Kuala Lumpur.
- CLEMENTE M., 1999. *In Vitro Culture (IVC) and Plant Conservation*. En: *A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation*. Bowes, B.G. (ed.), Manson Publishing, London, pp. 77-86.
- CONWAY W., 1988. Can technology aid species preservation? En: *Biodiversity*. Wilson, E.O., ed., National Academy Press, Washington, DC, pp. 263-268.
- DAMANIA A.B., 1996. Biodiversity conservation: a review of options complementary to standard *ex situ* methods. *Plant Genetic Resources Newsletter* 107, 1-18.
- DODDS J.H., 1991. *In Vitro Methods for Conservation of Plant Genetic Resources*. Chapman & Hall, London, 240 pp.
- ELLIS R.H., HONG T.D., ROBERTS E.H., 1985. *Handbook of Seed Technology for Genebanks*. Vol. I. Principles and Methodology. *Handbooks for Genebanks: No. 2*. IBPGR Secretariat, Roma, 210 pp.
- ELLIS R.H., HONG T.D., ROBERTS E.H., 1990a. An intermediate category of seed behaviour? 1. Coffee. *Journal of Experimental Botany* 41, 1167-1174.
- ELLIS R.H., HONG T.D., ROBERTS E.H., TAO K.L., 1990b. Low moisture limits to relations between seed longevity and moisture. *Annals of Botany* 65, 493-504.
- FAHY G.M., MERYMAN H.T., ANGELL C.A., 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21, 407-426.
- FALK D., 1987. Exploring seed storage of endangered plants. *Plant Conservation* 2,7.
- FALK D., 1989. The Theory of Integrated Conservation Strategies for Biological Diversity. En: *Proceedings of the Natural Areas Association*. Syracuse, NY, 6-9 June 1988. Nat. Areas Assoc., Rockford, Illinois, pp. 5-10.
- FAO (Food and Agriculture Organization), IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute), 1994. *Genebank Standards*. FAO, IPGRI, Roma.
- FAY M.F., 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 28, 1-4.
- FAY M.F., BUNN E., RAMSAY M.M., 1999. *In Vitro Propagation*. En: *A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation*. Bowes, B.G. (ed.), Manson Publishing, London, pp. 97-107.
- FORBES J.C., WATSON R.D., 1992. *Plants in Agriculture*. Cambridge University Press, Cambridge, 356 pp.
- GEORGE E.F., SHERRINGTON P.D., 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Part 1. The Technology. Exegetics Ltd., Edington, 709 pp.
- GILLMAN M., 1997. *Plant Population Ecology*. En: *Plant Genetic Conservation. The In Situ Approach*. Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V., Hawkes, J.G., ed. Chapman & Hall, London, pp. 114-131.
- GÓMEZ-CAMPO C., 1985. The Conservation of Mediterranean Plants: Principles and Problems. En: *Plant Conservation in the Mediterranean Area*. Gómez-Campo, C., ed. *Geobotany 7*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, pp. 3-8.
- GÓMEZ-CAMPO C., 1987. A strategy for seed banking in botanic gardens: some policy considerations. En: *Botanic Gardens and the World Conservation Strategy*. Academic Press, London, pp. 151-160.
- GONZÁLEZ-BENITO M.E., IRIONDO J.M., PÉREZ-GARCÍA F., 1998. Seed cryopreservation: an alternative method for the conservation of Spanish endemics. *Seed Science & Technology* 26,257-262.
- GONZÁLEZ-BENITO M.E., MARTÍN C., IRIONDO J.M., PÉREZ C., 1999. Conservation of the Rare and Endangered Plants Endemic to Spain. En: *Plant Conservation Biotechnology*. Benson, E. (ed.). Taylor & Francis, London, pp. 251-264.
- GONZÁLEZ-BENITO M.E., NÚÑEZ-MORENO Y., MARTÍN C., 1998. A protocol to cryopreserve nodal explants of *Antirrhinum microphyllum* by encapsulation-dehydration. *Cryo-Letters* 19, 225-230.
- GONZÁLEZ-BENITO M.E., PÉREZ C., 1992. Cryopreservation of *Quercus faginea* embryonic axes. *Cryobiology* 29, 685-690.
- GONZÁLEZ-BENITO M.E., PÉREZ C., 1994a. Studies on the cryopreservation of nodal explants of *Centaureum rigualii* Esteve, an endemic threatened species, through vitrification. *Botanic Gardens Micropropagation News* 1,82-84.
- GONZÁLEZ-BENITO M.E., PÉREZ C., 1994b. Cryopreservation of embryonic axes of two cultivars of hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Cryo-Letters* 15, 41-46.

- GONZÁLEZ-BENITO M.E., VIVIANI A.B., PÉREZ C., 1997. Cryopreservation of nodal explants of an endangered plant species (*Centaurium rigualii* Esteve) using the encapsulation-dehydration method. *Biodiversity and Conservation* 6, 583-590.
- HARTMANN T.H., KESTER D.E., DAVIES F.T., GENEVE R.L., 1997. *Plant Propagation: Principles and Practices*. Prentice-Hall International, London, 770 pp.
- HEYWOOD V.H., 1990. Objectives and strategies for a network of Mediterranean botanic gardens. En: *Conservation Techniques in Botanic Gardens*. Hernández-Bermejo, J.E., Clemente, M., Heywood, V.H. (eds.). Koeltz Scientific Books, Koenigstein, pp. 57-62.
- HUMMER K.E., 1999. Biotechnology in Plant Germplasm Acquisition. En: *Plant Conservation Biotechnology*. Benson, E. (ed.). Taylor & Francis, London, pp. 25-39.
- IRIONDO J.M., 1996. The survey and modelling of small plant populations as a basis for developing conservation strategies. *Bocconea* 5, 151-157.
- IRIONDO J.M., DE HOND L., 1996. OPTIMA News. OPTIMA Newsletter 30,20.
- IRIONDO J.M., DE HOND L., GÓMEZ-CAMPO C., 1994. Current research on the biology of threatened plant species of the Mediterranean basin and Macaronesia: a database. *Bocconea* 4, 1-383.
- IRIONDO J.M., PÉREZ C., 1991. *In vitro* storage of three endangered species from S.E. Spain. *Botanic Gardens Micropropagation News* 1, 46-48.
- IRIONDO J.M., PÉREZ C., 1996. Micropropagation and *in vitro* storage of *Centaurium rigualii* Esteve (Gentianaceae). *Israel Journal of Plant Sciences* 44, 115-123.
- IRIONDO J.M., PÉREZ C., 1999. Propagation from Seeds and Seed Preservation. En: *A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation*. Bowes, B.G. (ed.), Manson Publishing, London, pp. 46-57.
- IRIONDO J.M., PÉREZ C., PÉREZ-GARCÍA F., 1992. Effect of seed storage in liquid nitrogen on germination of several crop and wild species. *Seed Science and Technology* 20, 165-171.
- JUSTICE O.L., BASS L.N., 1978. Principles and practices of seed storage. USDA Handb. 506. U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 289 pp.
- LALIBERTÉ B., 1997. Botanic garden seed banks / genebanks worldwide, their facilities, collections and network. *Botanic Gardens Conservation News* 2, 18-23.
- LYNCH P.T., 1999. Tissue Culture Techniques in *In Vitro* Plant Conservation. En: *Plant Conservation Biotechnology*. Benson, E. (ed.). Taylor & Francis, London, pp. 41-62.
- MARTÍN C., 1993. Micropropagación y conservación *in vitro* de seis especies del género *Limonoium* endémicas de la Península Ibérica. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.
- MARZALINA M., KRISHNAPILLAY B., 1999. Recalcitrant Seed Biotechnology. Applications to Rain Forest Conservation. En: *Plant Conservation Biotechnology*. Benson, E. (ed.). Taylor & Francis, London, pp. 265-276.
- MATTHEWS P., 1999. Vegetative Propagation from Stem Cuttings, Leaves and Roots. En: *A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation*. Bowes, B.G. (ed.), Manson Publishing, London, pp. 58-68.
- MAXTED N., FORD-LLOYD B.V., HAWKES J.G., 1997. Complementary Conservation Strategies. En: *Plant Genetic Conservation. The In Situ Approach*. Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V., Hawkes, J.G., ed. Chapman & Hall, London, pp. 15-39.
- MCCOMB J.A., 1985. Micropropagation of the rare species *Stylidium coroniforme* and other *Stylidium* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 4, 151-158.
- MCNEELY J.A., MILLER K.R., REID W.V., MITTERMEIER R.A., WERNER T.B., 1990. *Conserving the World Biological Diversity*. IUCN, WRI, CI, WWF-US, the World Bank, Gland, Suiza, 193 pp.
- MENGES E., 1986. Predicting the future of rare plant populations: demographic monitoring and modeling. *Natural Areas Journal* 6, 13-25.
- MILLER K., ALLEGRETTI M.H., JOHNSON N., JONSSON B., 1995. Measures for Conservation of Biodiversity and Sustainable Use of its Components. En: *Global Biodiversity Assessment*. Heywood, V.H., ed., UNEP - Cambridge University Press, Cambridge, pp. 919-1061.
- MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, 1999. *Estrategia Española para la Conservación y el Uso Sostenible de la Diversidad Biológica*. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, 160 pp.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- PENCE V., 1999. The Application of Biotechnology for the Conservation of Endangered Plants. En: *Plant Conservation Biotechnology*. Benson, E. (ed.). Taylor & Francis, London, pp. 227-250.
- PHILLIPS R.L., KAEPLER S.M., OLHOFT P., 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proceedings National Academy Science* 91, 5222-5226.
- PRANCE G.T., 1997. The Conservation of Botanical Diversity. En: *Plant Genetic Conservation. The In Situ Approach*. Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V., Hawkes, J.G., ed. Chapman & Hall, London, pp. 3-14.

- PRITCHARD H.W., 1995. Cryopreservation of Seeds. En: Methods in Molecular Biology, Vol. 38. Day, J.G., McLellan, M.R. (eds.). Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 133-144.
- RAMANATHA RAO V., RILEY K.W., 1994. The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. Plant Genetic Resources Newsletter 97, 3-19.
- REID W.V., MILLER K.R., 1989. Keeping Options Alive. The Scientific Basis for Conserving Biodiversity. World Resources Institute, Washington, 128 pp.
- SCHEMSKE D.W., HUSBAND B.C., RUCKELSHAUS M.H., GOODWILLIE C., PARKER I.M., BISHOP J.G., 1994. Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. Ecology 75, 584-606.
- SCOWCROFT, W.R., 1985. Somaclonal Variation: the Myth of Clonal Uniformity. En: Genetic Flux in Plants. Hohn, B., Dennis, E.S. (eds.). Springer-Verlag, Wien, pp. 217-245.
- SMITH N.J.H., 1986. Botanic Gardens and Germplasm Conservation. University of Hawaii Press, Honolulu, 55 pp.
- STANWOOD P.C., 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. En: Cryopreservation of Plant Cells and Organs. Kartha, K.K. (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 199-236.
- STANWOOD P.C., BAAS L.N., 1981. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. Seed Science and Technology 9, 423-437.
- TOUCHELL D.H., DIXON K.W., 1994. Cryopreservation for seedbanking of Australian species. Annals of Botany 74, 541-546.
- TOUCHELL D.H., DIXON K.W., 1999. *In Vitro* Preservation. En: A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation. Bowes, B.G. (ed.), Manson Publishing, London, pp. 108-118.
- UNCED, 1992. Convention on Biological Diversity. United Nations Conference on Environment and Development, Ginebra.
- VERTUCCI C.W., 1989. Effects of cooling rates on seeds exposed to liquid nitrogen temperatures. Plant Physiology 90, 1478-1485.
- VERTUCCI C.W., ROOS E.E., 1990. Theoretical basis of protocols for seed storage. Plant Physiology 94, 1019-1023.
- VERTUCCI C.W., ROOS E.E., 1993. Theoretical basis of protocols for seed storage II. The influence of temperature on optimal moisture levels. Seed Science Research 3, 201-213.
- WANG B.S.P., CHAREST P.J., DOWNIE B., 1993. *Ex - Situ* Storage of Seeds, Pollen and *In-Vitro* Cultures of Perennial Woody Plant Species. FAO Forestry Paper 113. UN Food and Agriculture Organization, Roma, 83 pp.
- WALTER K.S., GILLET H.J., 1998. 1997 IUCN Red List of Threatened Plants. Compiled by the World Conservation Monitoring Center. IUCN - The World Conservation Union, Gland, 862 pp.
- WITHERS L.A., 1985. Long-term storage of *in vitro* cultures. En: *In Vitro* Techniques, Propagation and Long-Term Storage. Schafer-Menuhr, A. (ed.), Martinus Nijhoff & Dr. Junk Pub., Dordrecht, pp. 137-148.
- WITHERS L.A., 1993. Conservation methodologies with particular reference to *in vitro* conservation. En: Proceedings of the Asian Sweet Potato Germplasm Network Meeting, Guangzhou, China. CIP, Manila, pp. 102-109.