



MEMORIA FINAL DE LOS TRABAJOS
PARA EL CULTIVO *EX SITU* DE
Rhynchospora fusca (L.) Aiton fil.

*Actividad incluida en la acción "Mejora del estado de
conservación de los enclaves higroturbosos" del
LIFE+ PROIZKI*

Diciembre de 2015



EQUIPO DE TRABAJO

Directores

Maialen Arrieta Aseginolaza (Licenciado en Biología)

Leire Oreja Gutiérrez (Licenciada en Biología)

Joseba Garmendia Altuna (Licenciado en Biología)

Equipo de trabajo

Amaia Arrese-Igor (Licenciada en Biología)

Larraitz Zabala (Licenciada en Biología)

Aitziber Zufiaurre (Licenciada en Biología)

Yoana García (Licenciada en Biología)

Lorena Uriarte (Licenciada en Biología)

Mikel Etxeberria (Estudiante de la UPV)

Este trabajo ha sido realizado por la Sociedad de Ciencias Aranzadi mediante la financiación de la Diputación Foral de Álava/Araba dentro del LIFE+PRO-IZKI, la Diputación Foral de Gipuzkoa y el Gobierno Vasco y con la colaboración del Millennium Seed Bank (Kew Gardens) y Patxi Heras y Marta Infante, del Museo de Ciencias Naturales de Álava.



AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer toda la ayuda empleada a los trabajadores del vivero de Arizmendi y laboratorio Agroambiental de Fraisoro, ambos de la Diputación Foral de Guipuzkoa.

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICE

| | | |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. | INTRODUCCIÓN..... | 9 |
| 2. | MATERIAL Y MÉTODOS | 10 |
| 2.1. | Trabajo de campo..... | 10 |
| 2.2. | Trabajo de laboratorio..... | 10 |
| 2.3. | Análisis de los datos | 13 |
| 3. | RESULTADOS..... | 14 |
| 3.1 | Semillas conservadas | 14 |
| 3.2 | Protocolos de germinación de las semillas..... | 14 |
| 3.2. | Test de tetrazolio | 17 |
| 3.3 | Protocolos de cultivo de la planta a partir de las semillas germinadas y material vegetativo | 18 |
| 4. | DISCUSIÓN | 20 |
| 5. | CONCLUSIÓN..... | 22 |
| 6. | BIBLIOGRAFÍA..... | 23 |

1. INTRODUCCIÓN

En el *Convenio sobre la Diversidad Biológica* (CDB) firmado en Río de Janeiro (Brasil) en 1992, se planteó la necesidad de desarrollar estrategias para la puesta a punto de mecanismos para garantizar la conservación *ex situ* de las especies amenazadas. A partir del CDB se derivaron otros convenios como la *Estrategia Europea para la Conservación Vegetal* de 2001 (Prüohnice, República Checa), la *Estrategia Global para la Conservación Vegetal* de 2002 (La Haya, Holanda), la *New European Strategy Plant Conservation* (ESPC) 2008-2014, y más recientemente, las Naciones Unidas han declarado la próxima década como la *Década de la Biodiversidad* (2011-2020) y el CDB ha desarrollado la nueva *Estrategia Mundial Actualizada para la Conservación de las Especies Vegetales 2011-2020*.



El objetivo final de esta última Estrategia es el de detener la continua pérdida de diversidad de las especies vegetales. Con este fin se definen varios objetivos, entre los que se incluyen las siguientes: conservar *in situ* por lo menos el 75 % de las especies vegetales amenazadas conocidas y conservar por lo menos el 75 % de las especies vegetales amenazadas en colecciones *ex situ*, de las cuales el 20 % deben estar introducidos en programas de restauración.

En las últimas décadas los trabajos llevados a cabo *ex situ* fuera de las áreas naturales de distribución de las especies) se han convertido en una de las herramientas más importantes para garantizar la conservación de la biodiversidad vegetal.

Por sí solas las actuaciones *ex situ* no deberían ser el objetivo final, sino estar supeditadas a las actuaciones *in situ* (en las áreas naturales de distribución de las especies) y coordinadas mediante planes de recuperación o gestión específicos para las especies más amenazadas.

En este contexto se sitúa el objetivo principal de éste trabajo: Producir planta para su uso en el reforzamiento de la población de Galbaniturri y conservar *ex situ* una colección de semillas para su uso en futuras actuaciones de conservación.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Trabajo de campo

Recogida de semillas

En esta segunda fase la recolección de las semillas se ha realizado en 2014 y 2015, tras varias visitas para garantizar la recolección del material en su estado óptimo de maduración. Las semillas se han guardado en bolsas de papel para su posterior traslado al laboratorio dentro las primeras 24 horas tras su recolección.

2.2. Trabajo de laboratorio

Maduración y limpieza de semillas

Una vez en el laboratorio, se les ha asignado un código de identificación a cada accesión. Las semillas recogidas en el campo pueden encontrarse en diferentes estados de maduración (BACCHETTA *et al.*, 2008), y por tanto para completar el proceso de maduración se han mantenido durante 15 días en bandejas de aluminio al 30-40% de humedad relativa y a 20-25 °C (JIMÉNEZ & FERNÁNDEZ, 2009). Una vez transcurridos los 15 días, se han limpiado las semillas a mano, sacando las semillas del fruto (de tipo cápsula) y escogiendo aquellas que presentan un buen estado desarrollo y maduración (Figura 1). Para finalizar, se han mantenido en la cámara de desecación (15 °C / 15 % HR) hasta ser utilizadas para los protocolos.



Figura 1. A) Limpieza de las semillas de *Rh.fusca* mediante tamices de diferentes mallas. B) Detalle de las semillas después de ser limpiadas y seleccionadas.

Protocolos de germinación

- Prolongación de los protocolos de germinación llevados a cabo en 2013

Los porcentajes de germinación obtenidos en los protocolos llevados a cabo en el año 2013 fueron muy bajas, en torno al 7 % en el mejor de los casos (GARMENDIA *et al.*, 2013), por lo que se optó por prolongar los protocolos. Todas las semillas no germinadas en 2013 se introdujeron en la cámara de cultivo a 30/20°C con fotoperiodo de 12 horas, donde estuvieron durante varias semanas. Después se les aplicó una nueva estratificación en frío (cámaras frigoríficas, 3°C) durante 4 meses y para terminar se introdujeron de nuevo en la cámara de germinación de 30/20°C, donde permanecieron durante 10 meses.

- Protocolos de germinación llevados a cabo en 2015

Una vez limpias, se ha comprobado que haya un número suficiente de semillas para llevar a cabo las pruebas de germinación; seleccionando posteriormente de forma aleatoria un total de 800 semillas.

El medio de cultivo empleado ha sido agar al 1%. Tras diluir el agar en agua desionizada se ha esterilizado mediante autoclave. Posteriormente se ha repartido el agar en 32 placas petri (Ø 9 cm) (4 réplicas para cada condición). Una vez enfriado y solidificado el agar se han sembrado 25 semillas de *Rh. fusca* en cada placa (unidad de muestreo) (ISTA, 2004). Todo este proceso se ha realizado dentro de una cámara de flujo laminar y esterilizando las pinzas empleadas al fuego después de cada tanda de sembrado. Finalmente, se han sellado las placas petri con parafilm para garantizar una humedad relativa cercana al 100 %.

Una vez separadas las semillas en 32 placas petri (800 semillas), se han sometido a los diferentes tratamientos de germinación. Todas las placas petri se han expuesto a diferentes periodos de estratificación fría, simulando diferentes periodos de temperaturas frías de invierno.

El proceso al que se han sometido las semillas consta de cuatro pasos (Figura 2). Primero todas las placas petri se han estratificado durante 2 semanas (en condiciones de oscuridad y a 3 °C). Posteriormente, se han introducido al azar cuatro petris en la cámara de germinación a 30/20°C, y sucesivamente cada dos semanas se ha repetido la misma actuación hasta el paso de 16 semanas. De esta manera, se han realizado 8 tratamientos con diferente duración de la estratificación fría; el primer tratamiento (T2) consiste en dos semanas de estratificación fría y el último tratamiento (T16) dieciséis semanas de estratificación fría. Las petris se han mantenido en la cámara de germinación durante 8 semanas. Después de terminar este periodo de germinación, se han vuelto a estratificar todas las petris durante 10 semanas. Para finalizar el protocolo, se han introducido de nuevo sucesivamente en la cámara de germinación de mayor temperatura durante 4 semanas.

No se han hecho seguimientos para detectar semillas germinadas durante la estratificación fría puesto que en anteriores protocolos ninguna semilla germinó en condiciones de oscuridad y 3 °C. Tras pasar las placas a las cámaras de cultivo se han realizado tres conteos semanales. A medida que las semillas han germinado han sido repicadas de las placas a sustrato.

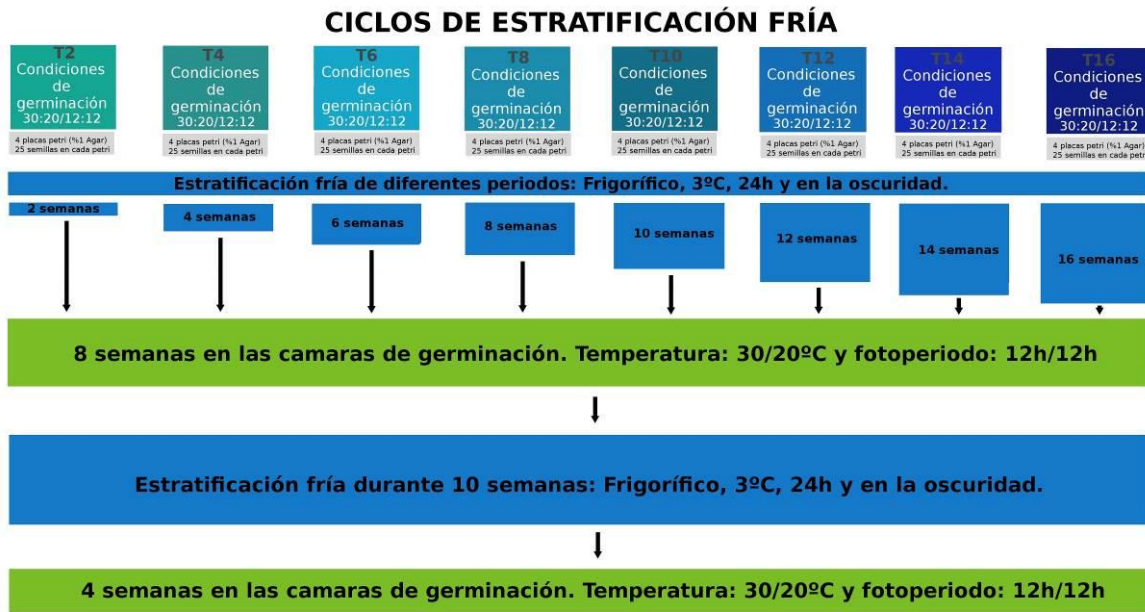


Figura 2. Esquema de los protocolos de germinación según los ciclos de estratificación fría. El experimento consta con 4 pasos, dos estratificaciones frías y dos periodos de germinación. La primera fase de estratificación fría consta con diferentes periodos de estratificación, la cual marca la diferencia entre los diferentes tratamientos.

Test de tetrazolio

Se ha llevado a cabo una prueba de viabilidad mediante el test de tetrazolio con los lotes de semillas recolectadas en 2012, 2014 y 2015. Dado a la singularidad del taxón (*en peligro de extinción*, BOPV, 2011) y la dificultad de interpretar los resultados del test, se ha optado por utilizar 20 semillas de cada lote para realizar la prueba de viabilidad.

Cultivo de plántulas a partir de semillas germinadas y material vegetativo

El repicado y posterior cultivo de las plantas obtenidas a partir de semillas es un paso crítico. Las primeras semillas germinadas después de ser repicadas han sido trasladadas al vivero de Arizmendi perteneciente a la Diputación Foral de Gipuzkoa (Urnieta), donde las condiciones de temperatura y humedad no están reguladas.

Dado a los resultados obtenidos en el vivero, se ha optado por mantener las semillas repicadas en sustrato turboso y saturado de agua durante algunas semanas en las mismas condiciones en las cuales las semillas han germinado. Los alveolos se han introducido en bolsas zip para garantizar una humedad relativa cercana al 100%. En un principio se han mantenido en la cámara de germinación a 30/20°C (12h/12h), y posteriormente se han trasladado a la cámara de germinación de 22/12°C. Al cabo de varias semanas se han retirado las bolsas zip y se han trasladado al invernadero de Arizmendi. De esta manera las plántulas se han aclimatado antes de ser sometidas a las condiciones del invernadero.

Partiendo del material vegetativo recolectado en 2012 se ha realizado la separación de matas y se han trasplantando en alveolos con turba negra. Los alveolos mantenidos

en bandejas saturadas de agua han estado varias semanas dentro del invernadero y transcurrido este tiempo se han trasladado al umbráculo exterior para la aclimatación. Este procedimiento se ha repetido durante los años 2013, 2014 y 2015.

2.3. Análisis de los datos

Índices de germinación

Los datos obtenidos en cada tratamiento, se han utilizado con el objetivo de calcular el porcentaje de germinación y la velocidad de germinación (T_{50}) (BACCHETTA *et al.*, 2008; BEWLEY & BLACK, 1994)

- **Porcentajes de germinación**

El porcentaje de germinación se ha calculado para cada réplica mediante esta fórmula:

$$(\text{Número de semillas germinadas} / \text{número total de semillas}) \times 100$$

De momento, en esta fórmula no se han tenido en cuenta las semillas vacías, ya que no se han realizado pruebas de corte para evitar la pérdida de material potencialmente germinable.

El porcentaje final del ensayo se ha obtenido con la media de las réplicas sometidas a las mismas condiciones de germinación.

- **Velocidad de germinación (T_{50})**

El T_{50} es el parámetro más utilizado para determinar la velocidad de germinación. Se calcula en número entero de días y corresponde al tiempo necesario para obtener el 50% de la capacidad germinativa del lote.

Herramientas estadísticas

Se ha comparado las diferencias entre los diferentes tratamientos mediante el empleo del software de análisis estadísticos R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

3. RESULTADOS

3.1 Semillas conservadas

En la segunda fase se han recolectado las semillas en 2014 y 2015. En los dos años la recolecta se ha realizado a principios de septiembre, sucesivamente el 5 de septiembre y 10 de septiembre (119/2014 y 85/2014).

Dentro del LIFE se han recolectado 3 accesiones (113/2012, 119/2014 y 85/2014) que suman unas 10.000 semillas de *Rh. fusca*, de las que se conservan más de 8.000 en el Banco Activo (Figura 3).



Figura 3. A) Semillas conservadas en el Banco Activo. B) Detalle de las semillas de *Rh. fusca* recolectadas en 2012 y conservadas en el Banco (113/2012).

3.2 Protocolos de germinación de las semillas

- Resultados obtenidos de la prolongación de los protocolos de germinación llevados a cabo en 2013

Al dar por finalizada la prolongación de los protocolos, la cantidad de semillas germinadas se ha elevado de 4 semillas, a 27 semillas (4,5% del total). Así mismo, la tasa de germinación más alta ha sido del 10,19% (Figura 4). Este dato corresponde a las semillas que durante el protocolo de germinación previo se sometieron al tratamiento de estratificación fría (3°C, 12 semanas) y temperatura de germinación más alta (30/20°C, 12h/12h).

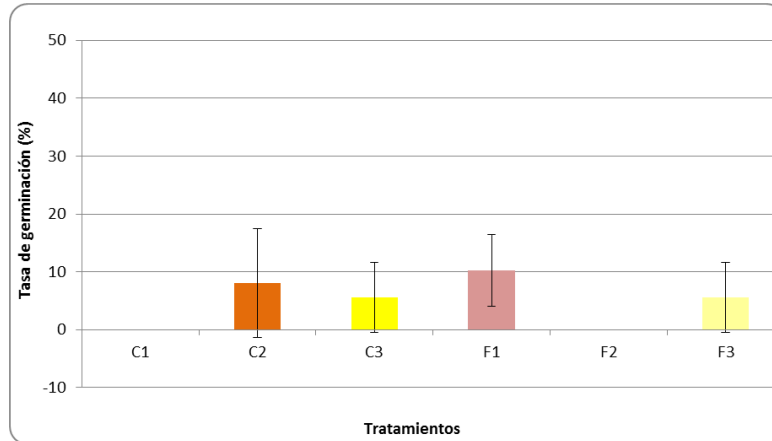


Figura 4. Tasas de germinación (%) obtenidas de la prolongación de los protocolos de germinación llevados a cabo en 2013. Cada color representa un tratamiento (C1: estratificación cálida + 30/20°C; C2: estratificación cálida + 22/12°C; C3: estratificación cálida + 14/4°C; F1: estratificación fría + 30/20°C; F2: estratificación fría + 22/12°C; F3: estratificación fría + 14/4°C) y las líneas negras simbolizan la desviación estándar (n=4).

- Resultados obtenidos al final de los protocolos de 2015

Tras exponer las semillas a los ciclos de estratificación fría en total han germinado 49 semillas (6,125% del total). La mayor tasa de germinación (9% de tasa de germinación) se ha obtenido en los tratamientos en los que las semillas han estado durante 6 y 8 semanas (T6 y T8, respectivamente) en el primer ciclo de estratificación fría (Figura 5.A). En cuanto a la velocidad de germinación, el T6 es el tratamiento que ha obtenido mayor tasa de germinación en menor tiempo (Figura 5.B).

En todos los tratamientos de diferentes ciclos de estratificación fría ha germinado alguna semilla de *Rh. fusca* menos en el tratamiento T10 (10 semanas de estratificación fría en el primer ciclo de estratificación), donde la tasa de germinación ha sido 0% al terminar el protocolo (Figura 5).

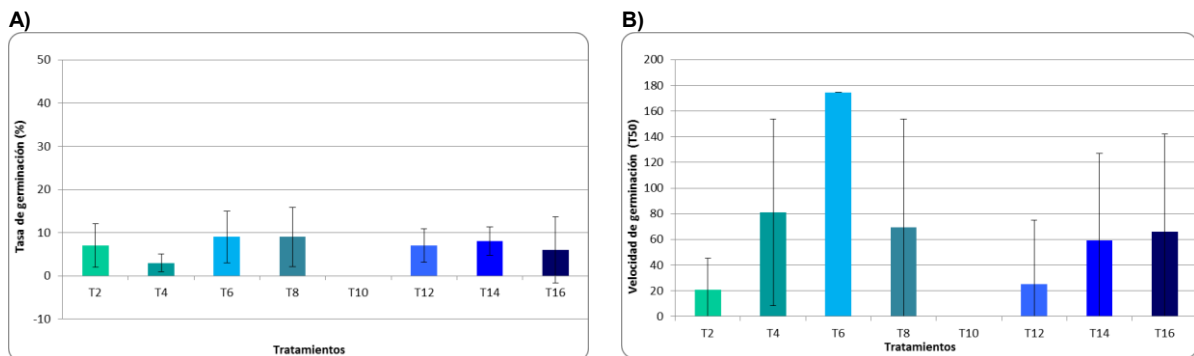


Figura 5. Resultados obtenidos al final de los protocolos de 2015. Cada color representa un tratamiento, y las líneas negras simbolizan la desviación estándar (n=4). A) Tasas de germinación (%). B) Velocidad de germinación (T50).

Aunque parece ser que el periodo de la estratificación fría afecta a la tasa de germinación de las semillas de *Rh. fusca*, estas diferencias no son estadísticamente significativas. En el gráfico *box plot* (Figura 6), se aprecia como la gran variabilidad entre las réplicas de cada tratamiento no permite detectar una tendencia concreta.

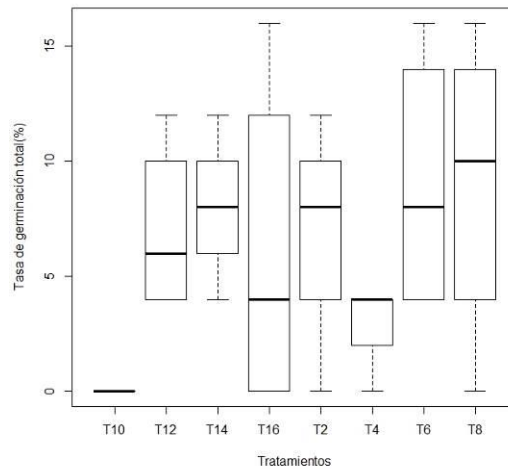


Figura 6. Gráficos *box plot* de los tratamientos al finalizar los protocolos realizados en 2015. Las líneas negras simbolizan la desviación estándar (n=4).

- Resultados obtenidos a fecha de la entrega de la memoria

La experiencia adquirida de los anteriores ensayos realizados con las semillas de *Rh. fusca* nos dice que al cabo de un año de la puesta en marcha de los protocolos todavía las semillas tienden a germinar. Por ello, aunque los ensayos de germinación hayan concluido, se han mantenido las semillas en la cámara de germinación (30/20°C, 12h/12h), tanto para producir más plántulas, como para lograr mejores resultados de las tasa de germinación.

Con los datos recolectados hasta la fecha de entrega de la memoria, la tasa de germinación obtenida (Figura 7.A) ha sido la más alta conseguida (10% de tasa de germinación). Hasta primeros de diciembre han germinado 53 semillas (6,625% del total), 4 semillas más desde que se terminaron los protocolos de diferentes ciclos de estratificación.

Teniendo en cuenta la velocidad de germinación, el T6 es el tratamiento que ha obtenido mayor tasa de germinación en menor tiempo (Figura 7.B).

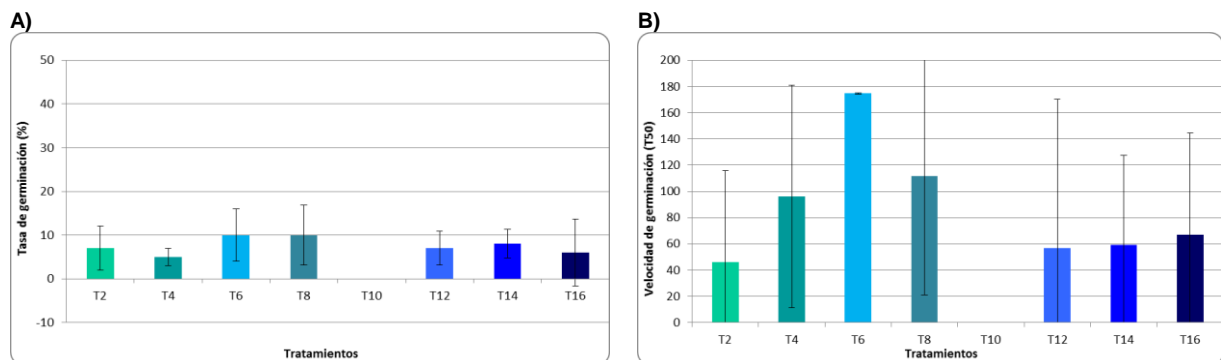


Figura 7. Datos obtenidos de la prolongación de los protocolos realizados en 2015. Cada color representa un tratamiento, y las líneas negras simbolizan la desviación estándar (n=4). A) Tasas de germinación (%). B) Velocidad de germinación (T50).

A pesar de que parezca que los diferentes tratamientos de estratificación fría afectan a la tasa de germinación, estas diferencias no son estadísticamente significativas. En el gráfico *box plot* (Figura 8), podemos apreciar como la variabilidad entre las réplicas de cada tratamiento sigue siendo muy alta.

Todas las semillas no germinadas se mantienen en la cámara de germinación por lo que puede que todavía germinen más semillas.

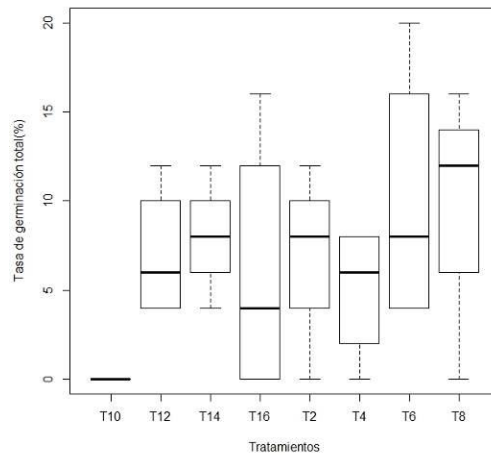


Figura 8. Gráficos *box plot* de la prolongación de los protocolos realizados en 2015. Las líneas negras simbolizan la desviación estándar (n=4).

3.2. Test de tetrazolio

Según el test de tetrazolio la viabilidad de las muestras recolectadas en 2014 es de en torno al 60% (Figura 9).

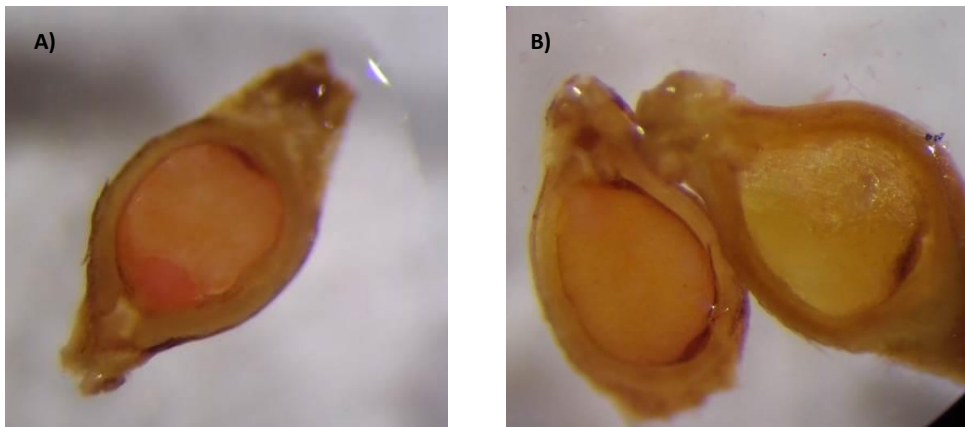


Figura 9. Detalle del corte transversal de las semillas de Rh. fusca tras el test de tetrazolio. A) Semilla positiva: Se aprecia el color rojo del embrión. B) Semilla negativa: no se aprecia la tinción del tetrazolio.

3.3 Protocolos de cultivo de la planta a partir de las semillas germinadas y material vegetativo

Durante este proyecto en total se han producido cerca de 500 plantas, la mayoría a partir de material vegetativo. Casi la mitad de estas plantas (241 plantas), se han utilizado para los trabajos de reforzamiento experimental (Tabla 1). Concretamente, 120 han sido plantados en Galbaniturri durante la primavera del 2015.

Ya que durante los años 2014-2015 no se han recolectado nuevos ejemplares de material vegetativo, el trabajo de vivero se ha centrado en producir ejemplares a partir del material recolectado en años anteriores de este proyecto (Figura 10). La tasa de supervivencia de las plantas producidas a partir de la división de matas del material vegetativo es del 100% (GARMENDIA *et al.*, 2013).

Tabla 1. Plantas producidas durante el proyecto

| ORIGEN | TOTAL | ACTUALMENTE EN VIVERO | EN | IN SITU |
|-----------------|------------|----------------------------------------------|----|------------|
| Semilla | 80 | 58 | | 20 |
| Mat. vegetativo | 418 | 198 (98 en alveolos +unos 100 en bandeja) | | 220 |
| | 496 | 256 | | 240 |

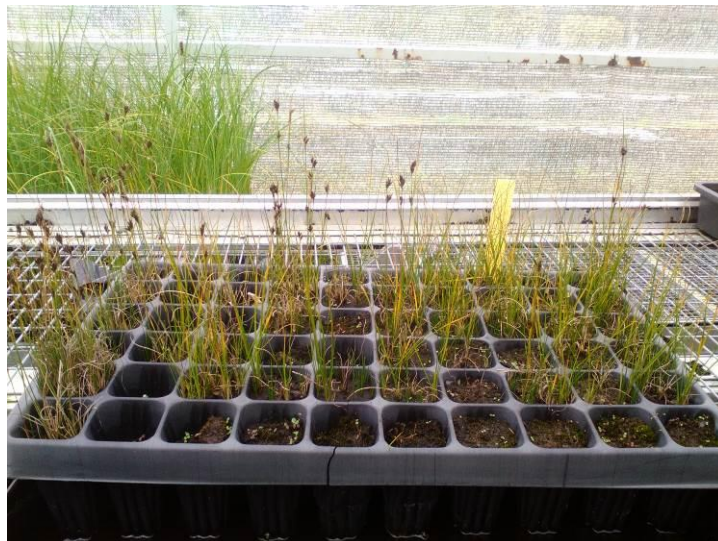


Figura 10. Bandeja con plantas de *Rh. fusca* producidas a partir de material vegetativo.

En cuanto a las plantas producidas a partir de semillas germinadas, la tasa de supervivencia varía según la tanda en la que hayan germinado (Figura 10). Las primeras semillas germinadas han sido trasladadas según se repicaron al invernadero, y la tasa de supervivencia es del 75%.

En la segunda tanda de germinación, las plántulas se han mantenido en las cámaras de cultivo durante varias semanas y después de llevarlas al invernadero, la tasa de supervivencia ha sido considerablemente menor (53,6%). Pero si tenemos en cuenta que la razón por la que 17 plántulas perecieron debido a problemas técnicos de una de las cámaras de cultivo del material del laboratorio, la tasa de supervivencia sería casi del 92%.

Por último, la tasa de viabilidad de las semillas germinadas en la tercera tanda y las cuales todavía no han sido expuestas a las condiciones del invernadero (Figura 11), puesto que se mantienen en las cámaras de cultivo, es del 100%.

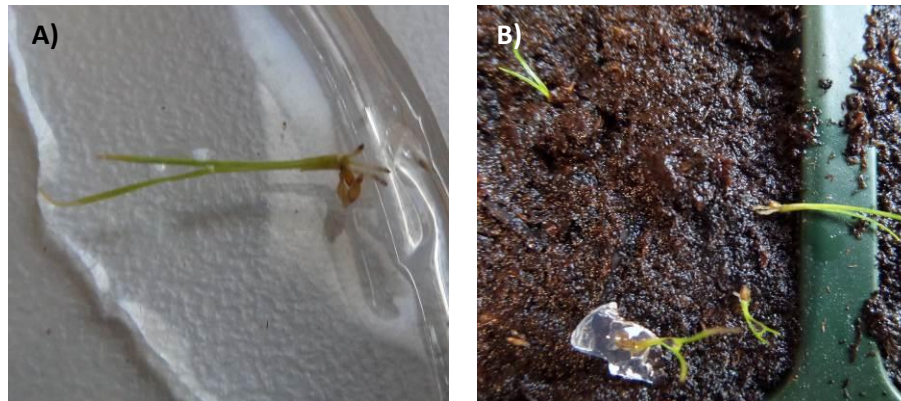


Figura 10. Plántulas del taxón *Rhynchospora fusca* obtenidas de los protocolos llevados a cabo en 2015. A) Detalle de la plántula. B) Siembra de las plántulas en substrato turboso y saturado de agua.



Figura 11. Plántulas germinadas en la tercera tanda que a fecha de entrega de la memoria se mantienen en la cámara de germinación de Fraisoro (22/12°C, 12h/12h)

4. DISCUSIÓN

Con los datos obtenidos en los protocolos llevados a cabo hasta la fecha podemos decir que parece que el periodo de estratificación influye en la germinación de las semillas de *Rh. fusca*, pero no podemos especificar cuál sería el protocolo adecuado para germinar las semillas de este taxón. La variabilidad de los resultados obtenidos no ha permitido detectar diferencias significativas entre los diferentes protocolos. Sólo podemos decir que las tasas de germinación más elevadas se han obtenido en los protocolos cuya estratificación fría inicial era de 6 y 8 semanas.

La variabilidad interna de las réplicas de cada tratamiento no permite definir cuáles son las condiciones idóneas para la germinación en *Rh. fusca*. Estos resultados nos hacen pensar que hay factores o cierto factor que no se ha tenido en cuenta durante el ensayo, el cual influye sobre la germinación de las semillas. Este factor podría explicar tanto la diferencia entre los tratamientos, como la diferencia entre las réplicas de cada tratamiento.

Cabe la posibilidad de que la viabilidad de las semillas sea uno de estos factores clave que ayudaría a interpretar los resultados obtenidos. Las pruebas de viabilidad se han realizado empleando una muestra (20 semillas) de cada lote estudiado, pero no con las semillas no germinadas en los protocolos de germinación. Teniendo en cuenta que la viabilidad de las semillas es de 60%, aumenta el valor de las tasas de germinación reflejadas en los anteriores apartados. De esta manera la mayor tasa de germinación lograda sería de 16,67%, la cual pertenece a los tratamientos T6 y T8, después de la prolongación de los protocolos.

Se ha observado que las semillas pueden germinar varios meses después de que acaben los protocolos de germinación, y siendo la prioridad la obtención de plántulas se ha optado por, de momento, mantener las semillas no germinadas durante los protocolos de germinación en las cámaras de cultivo. Teniendo en cuenta esto, sería recomendable realizar la prueba de viabilidad de las semillas no germinadas después de que pasen un tiempo prudencial en la cámara de germinación, para contrastar los resultados de la viabilidad obtenidos en este trabajo. De este modo, se podría corroborar la hipótesis de que la baja tasa de germinación y la variabilidad de los resultados, incluso en réplicas del mismo tratamiento, se pueda explicar, por lo menos en parte, por la baja viabilidad de las semillas.

Aun así, puede haber otros factores que influyan en la germinación de las semillas de *Rh. fusca*, como puede ser algún tipo de dormición, por lo que habría que plantearse realizar otros experimentos combinando invernalizaciones de diferentes periodos con otros tipos de pretratamientos (escarificación mecánica o química, hormonas...).

En cuanto a la producción de la planta de *Rh. fusca*, por el momento la producción a partir del material vegetativo ha dado mejores resultados, ya que todas las plantas producidas han sobrevivido en el invernadero. Pero, este tipo de producción plantea varios problemas, como la sustracción de material de la población original, producción de clones genéticamente idénticos y dificultades para garantizar la diferenciación entre *Rh. fusca* y *Rh. alba* hasta su floración.

Parece ser que la aclimatación de plántulas producidas a partir de las semillas en las cámaras de cultivo ha tenido éxito y ha aumentado la tasa de supervivencia; sin tener

en cuenta las plántulas pericidas debido a problemas técnicos del 75% al 92%. Aun así, para confirmar este éxito deberemos esperar a que las últimas semillas germinadas sean trasladadas al invernadero, y así corroborar esta tendencia.

La elaboración de estos trabajos *ex situ* nos han proporcionado alrededor de 500 plantas que han permitido llevar a cabo reforzamientos en la población original. De esta manera durante la primavera de 2015 se han plantado 120 ejemplares creando nuevos núcleos en la población de *Rh. fusca* de Galbaniturri (HERAS & INFANTE, 2015). Por último mencionar que durante el transcurso de este proyecto se han conservado *ex situ* unas 8000 semillas para su uso en futuras actuaciones de conservación.

5. CONCLUSIÓN

El cultivo *ex situ* de *Rhynchospora fusca* (L.) Aiton fil. ha sido una tarea complicada teniendo en cuenta los resultados obtenidos por los dos grupos de investigación (BVG y JBA) que paralelamente han estado trabajando en este proyecto. Aunque el cultivo de la especie mediante mecanismos vegetativos ha sido exitoso (tasa de pervivencia del 100%), el mayor esfuerzo se ha hecho en la obtención de plantas partiendo de las semillas recolectadas en campo ya que la obtención de ejemplares genéticamente diferenciados debería priorizarse antes que la reproducción vegetativa de la especie.

En relación a este esfuerzo, partiendo de los resultados obtenidos en 2013, durante el 2015 se han realizado nuevos ensayos y se han conseguido mayores tasas de germinación en los protocolos realizados. Pero aun así, la tasa de germinación sigue siendo relativamente baja, aunque la posterior supervivencia de las plántulas obtenidas ha mejorado. Ya que teniendo en cuenta el paso crítico del repicado y posterior cultivo, las plántulas han sido expuestas a un periodo de aclimatación en las mismas condiciones en las cuales han germinado.

Todavía es necesario profundizar en el trabajo de laboratorio para poder determinar las razones que hacen que el taxón presente una tasa de germinación tan baja. Podría tratarse de problemas derivados de una baja variabilidad genética de las poblaciones, lo que conllevaría problemas de consanguinidad y baja viabilidad de las semillas, aunque en la familia *Cyperaceae* no es infrecuente la autogamia; o podría deberse a algún tipo de dormición (JENSEN, 2004).

En la restauración de la población de Galbaniturri y la fundación de nuevos núcleos se han utilizado plantas cultivadas a partir de material vegetativo (rizomas). Este método ha demostrado ser más efectivo para la producción de planta a mayor escala, aunque plantea varios inconvenientes; desde el punto de vista de la variabilidad genética de los nuevos núcleos creados y por el hecho de mermar, en parte, el tamaño de la población original.

Por otro lado la tasa de supervivencia final de reintroducciones realizadas en Galbaniturri durante 2013 y 2015 con el material procedente de cultivo vegetativo se considera baja (28%) (HERAS & INFANTE, 2015). Se estima que la pérdida se ha producido principalmente por arrastre mecánico con las diferentes arroyadas, y no por falta de vigor, problemas climáticos o de adaptación. Estos datos nos indican que hay que estudiar más a fondo los métodos de reforzamiento de la población de *Rh. fusca*. En futuras actuaciones se recomienda tener en cuenta la época en la que se introduzcan los ejemplares, evitando las peores tempestades invernales y mejorar el sistema de anclaje mediante una red de fibra orgánica.

En definitiva, se recomienda seguir trabajando en los aspectos en los cuales los resultados no han sido del todo exitosos, así como, en los protocolos de germinación y en el método de reforzamiento de la población de Galbaniturri. De esta manera se completaría el desarrollo del método para conseguir más individuos de *Rhynchospora fusca* con gran variabilidad genética que se puedan reintroducir el campo con una alta tasa de supervivencia.

6. BIBLIOGRAFÍA

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

BEWLEY, J.D. & M. BLACK (1994). *Seeds: physiology of development and germination*. 2ª Ed. Plenum Press. New York. 445 pp.

BOPV/EHAA núm. 37 zbk. (2011). Orden de 10 enero, de la Consejera de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca, por la que ese modifica el Catálogo Vasco de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre y Marina, y se aprueba el texto único. *Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz*. Núm. 37, 10/01/2011. 937-948 pp.

GARMENDIA, J., L. OREJA, A. ARRESE, L. ZABALA., A. ZUFIAURRE, Y. GARCÍA, L. URIARTE & M. ARRIETA. (2013). *Trabajos para el cultivo ex situ de Rhynchospora fusca (L.) aiton fil. Actividad incluida en la acción "mejora del estado de conservación de los enclaves higroturbosos" del LIFE+ PRO-IZKI*. Informe inédito realizado a través de Aranzadi Z.E para el Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco, Diputación Foral de Gipuzkoa y la Diputación Foral de Álava/Araba dentro del LIFE+ PRO-IZKI. 30 pp.

HERAS, P. & INFANTE, M. (2015). *Reforzamiento de la población de rhynchospora fusca del trampal de Galbaniturri (Parque natural de Izki)*. Memoria año 2015 final. Museo de ciencias naturales de Alava. 44 pp.

ISTA 2004. *International rules for seed testing (2004)*. The International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf.

JENSEN K. (2004). *Dormancy patterns, germination ecology, and seed-bank types of twenty temperate fen grassland species*. *WETLANDS*, Vol. 24: No. 1, 152–166

JIMENEZ B. & E. FERNANDEZ (2009). *Protocolo de tratamiento de semillas*. Indurot, Universidad de Oviedo, Banco de Germoplasma del Jardín Botánico Atlántico.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2011). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.Rproject.org/> 25/03/2013.

Páginas webs consultadas:

Millenium Seed Bank, Kew Gardens

<http://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Rhynchospora+&Species=fusca&StorBehav=0>

Flora Iberica

http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/18_173_16_Rhynchospora.pdf

Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2013. *Cbd.int* [on-line] [fecha de consulta: 2013/06/04; 11:26]

<http://www.cbd.int/2011-2020/goals/>

Plants 2020, Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2013. *Plants2020.net* [on-line] [fecha de consulta: 2013/06/03;9:35]

http://www.plants2020.net/files/Plants2020/general_background/guide_gspc___english.pdf

United Nations Environment Programme, 2013. *Unep.org* [on-line] [fecha de consulta: 2013/06/08;15:03]

http://www.unep.org/wed/2010/english/PDF/BIODIVERSITY_FACTSHEET.pdf