BASES CIENTÍFICAS PARA LA CONSERVACIÓN DE *Berula erecta* (Huds.) Coville, UNA PLANTA EN PELIGRO DE EXTINCIÓN EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DEL PAÍS VASCO.

Autor: Eder Somoza Valdeolmillos

Directores: Agustí Agut Escrig y Javier Loidi Arregui

Máster en Biodiversidad, Funcionamiento y Gestión de Ecosistemas

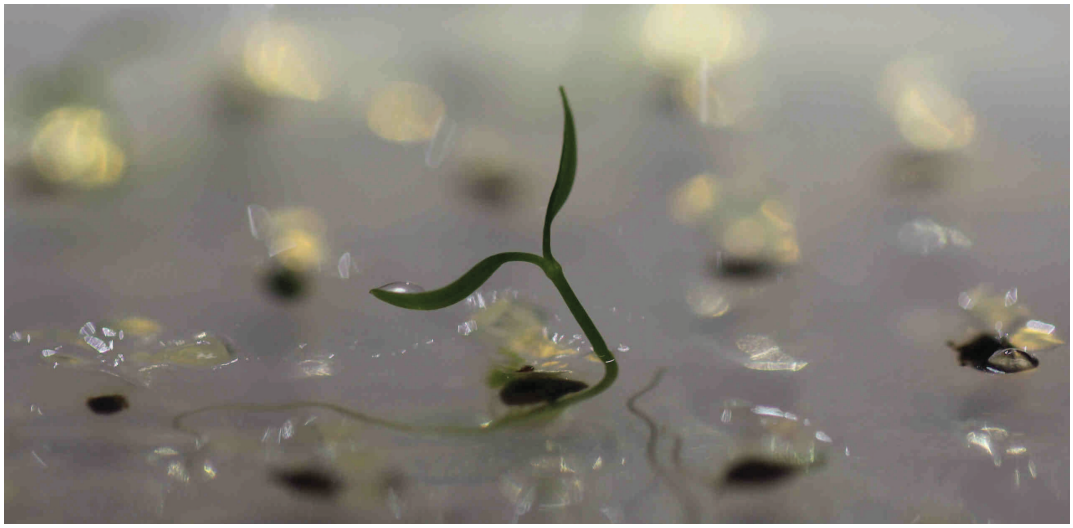


Imagen: Germinación de *Berula erecta* en placa petri sembrada en soporte de agar (AGUT, A. *et al*., 2012).

Departamento de Biología Vegetal y Ecología

Facultad de Ciencia y Tecnología/ZTF. Universidad del País Vasco/EHU, Leioa.

Desarrollado en el Banco de Germoplasma del Jardín Botánico de Olarizu

(Centro de Estudios Ambientales - Ayuntamiento de Vitoria-Gazteiz).

Firmado:

Eder Somoza Valdeolmillos Agustí Agut Escrig Javier Loidi Arregui

Fecha inicio: 3 de Octubre de 2012
Fecha fin: 05 de septiembre de 2013
Fecha presentación: 6 de Septiembre de 2013

BASES CIENTÍFICAS PARA LA CONSERVACIÓN DE *Berula erecta* (Huds.) Coville, UNA PLANTA EN PELIGRO DE EXTINCIÓN EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DEL PAÍS VASCO.

Eder Somoza Valdeolmillos[1,2], Agustí Agut Escrig[1], Nancy Salas García[1,2] & Javier Loidi Arregui[2].

[1]Banco de Germoplasma Vegetal del Jardín Botánico de Olarizu. Centro de Estudios Ambientales (CEA). Departamento de Medio Ambiente y Espacio Público. Ayuntamiento de Vitoria-Gasteiz. Casa de la Dehesa de Olarizu s/n; 01006; Vitoria-Gasteiz (Álava/Araba) (edersvs@hotmail.com; aagut@vitoria-gasteiz.org).

[2]Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n; 48940 Leioa (Bizkaia).

Abstract:

*Berula erecta (*Huds.) Coville is an endangered species (EN) in the Basque Country (VV.AA., 2010; BOPV, 2011). It is a hydrophyte, stoloniferous and perennial which has three known populations in the Basque Country (located in Álava). Vitoria-Gasteiz has one of them, thus it is a priority in conservation efforts in the Plant Germplasm Bank (BG) of Olarizu Botanical Garden (JBO).

Objectives of the study were: updating existing information on known populations in the Basque Country, checking the optimal timing of seed collection, finding out if it is possible the *ex situ* conservation of this species knowing the necessary conditions and determining optimal germination protocol.

BG of JBO (AGUT, A. *et al*., 2012) established an optimal germination protocol for fresh seed of *Berula erecta*, collected in two different periods in 2011. These were compared with the results of this work after *ex situ* conservation conducted according to international standards.

Statistical analysis using the *R* software, were based on the binomial logistic regression model.

The results of this study are an important contribution for future conservation plans for this species as they have increased the information possessed, achieved successfully the optimal protocol of germination (20°C in fresh seeds and 25°C after the freezing, both with photoperiod 16/8h day/night), obtained the period most suitable for collecting seeds (September) and determined that it is possible to keep them *ex situ* (seeds ultra-dry at -18°C).

Key words: *Berula erecta*, Germination protocol, Germplasm Bank (BG), seed, *ex situ* conservation, dessication, freezing, Binomial Logistic Regression.

Resumen:

Berula erecta (Huds.) Coville es una especie en peligro de extinción (EN) en la CAPV (VV.AA., 2010; BOPV, 2011). Es un hidrófito, perenne y estolonífero que cuenta con tres poblaciones conocidas en el País Vasco (localizadas en Álava). Vitoria-Gasteiz alberga una población, siendo un objetivo de conservación prioritario para el Banco de Germoplasma Vegetal (BG) del Jardín Botánico de Olarizu (JBO).

Los objetivos del estudio eran: actualizar la información existente sobre las poblaciones conocidas en la CAPV, verificar el momento óptimo de recolección, averiguar si es posible su conservación *ex situ*, conocer las condiciones necesarias y determinar su protocolo óptimo de germinación.

El BG del JBO (AGUT, A. *et al*., 2012), estableció un protocolo óptimo de germinación para las semillas de *Berula erecta* en fresco, recolectadas en dos períodos diferentes del 2011. Tras el proceso de conservación *ex situ* (según estándares internacionales) se contrastó con los resultados de este trabajo.

El análisis estadístico realizado con el software *R* fue basado en el modelo de regresión logística.

Los resultados en este estudio este estudio son una importante contribución para los futuros planes de recuperación de esta especie porque: se ha actualizado la información que se poseía sobre *Berula erecta*, se ha determinado su protocolo óptimo de germinación (con fotoperíodo 16/8 día/noche) en fresco (20ºC) y tras la congelación (25ºC), se ha obtenido el período óptimo de recolección (Septiembre) y se ha probado que sus semillas son ortodoxas pudiendo ser conservadas *ex situ* (ultrasecas y a -18ºC).

Palabras clave: *Berula erecta*, conservación *ex situ*, Protocolo de Germinación, Banco de Germoplasma (BG), semilla, desecación, congelación, Regresión Binomial Logística.

Introducción

El presente trabajo establece las bases científicas para la conservación de *Berula erecta* (Huds.) Coville, una especie en Peligro de Extinción en la Comunidad Autónoma del País Vasco (VV.AA., 2010; BOPV, 2011). Los objetivos de este trabajo son:

1. Actualizar la información existente sobre las poblaciones conocidas en la CAPV.

1.a.- Censos poblacionales.

1.b.- Datos fenológicos.

1.c.- Datos fitosociológicos.

2. Determinar el protocolo óptimo de germinación para *Berula erecta*.

2.a.- Semillas frescas.

2.b.- Semillas conservadas *ex situ.*

3. Determinar el momento óptimo de recolección de semillas.

4. Averiguar si es posible conservar *ex situ* la especie y conocer las condiciones necesarias.

- Interés del estudio

Este trabajo cobra especial relevancia frente a la actual pérdida de biodiversidad, mayoritariamente debida a la actividad humana. La importancia de conservar la diversidad reside en que la existencia de todos depende, directa o indirectamente, de la diversidad biológica, ya que ésta garantiza la existencia y persistencia de condiciones idóneas para el ambiente y la evolución de la propia vida (BACCHETTA, G. *et al.,* 2008).

De esta manera, el interés de este estudio es mantener, en la medida de lo posible, la biodiversidad vigente, asegurando la conservación de *Berula erecta*, cuyo grado de amenaza ha sufrido un aumento en relativo poco tiempo.

Con este trabajo se actualiza la información sobre la biología, la ecología y las poblaciones existentes, aportando nuevos datos sobre la biología de la semilla y su conservación *ex situ*.

- Antecedentes

La propuesta del científico ruso Nicolai Ivanovitch Vavilov, de preservar semillas *ex situ* garantizando su viabilidad en un periodo largo de tiempo, nació entre los años 1920 y 1930 (Koo B. *et al*., 2004). Hasta 1992 las semillas conservadas eran de importancia económica; tras la Cumbre de la Tierra de Río de Janeiro se aprobó el Convenio de Diversidad Biológica (CDB) que motivó el cambio del objetivo de conservación de los bancos de germoplasma hacia las plantas silvestres raras o en riesgo de extinción.

El JBO constituyó su Banco de Germoplasma Vegetal en el año 2010 y en el "Programa de conservación y reintroducción de la flora amenazada y característica de los Robledales isla de la Llanada Alavesa (LIC ES2110013)" (AGUT, A. *et al*. 2012) incorporó entre sus objetivos de conservación a *Berula erecta*. Sus semillas se conservaron *ex situ* ultrasecas y a bajas temperaturas. Para hallar el protocolo óptimo de germinación se realizaron ensayos de germinación con semillas de esta especie en fresco (temperaturas: 10, 15, 20 y 25ºC; fotoperíodo: 16/8h día/noche).

- Descripción de la especie

Berula erecta es una umbelífera acuática (cuadro 1), conocida con el nombre común castellano de *chirivía de agua*, *berro falso* o *berra*, y como *cutleaf* w*ater parsnip* por su nombre común en inglés. Es una hierba perenne, estolonífera, glabra, con olor y apariencia similar al apio. Los tallos son de 20-100cm x 1cm, erectos o decumbentes, fistulosos y asurcados. Sus hojas son una vez pinnatisectas, las sumergidas laciniadas y las aéreas con folíolos ovado-lanceolados. Sus umbélulas tienen radios secundarios finos y lisos de 3-5mm en la fructificación. Cuenta con 4-8 bractéolas, de ordinario indivisas, tubuladas. Sus estilos son recurvados, ligeramente más largos que el estilopodio y los estigmas capitados. Los pétalos son blancos y emarginados; y su fruto subglobuloso. (CASTROVIEJO, S. *et al.* 1986; BOLÒS, O. *et al*. 2000; MIRANDA ARCE, M. G., 2013).

Cuadro 1: Clasificación taxonómica de *Berula erecta* (BISBY, F.A., 2006, ipni.org, 2013; MIRANDA ARCE, M. G., 2013).

Berula erecta (Huds.) Coville	
Clasificación Taxonómica	
Reino	*Plantae*
Subreino	*Traqueobionta*
Superdivisión	*Spermatophyta*
División	*Magnoliophyta*
Clase	*Magnoliopsida*
Subclase	*Rosidae*
Orden	*Apiales*
Familia	*Apiaceae (Umbeliferae)*
Subfamilia	*Apioideae*
Tribu	*Oenantheae*
Género	*Berula* W.D.J. Koch
Especie	*Berula erecta*

- Fenología anual

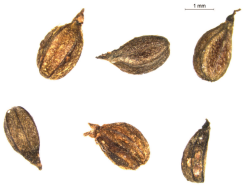
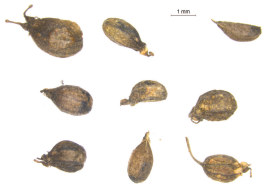
Publicaciones y estudios previos (AIZPURU, I. *et al*., 1999; AGUT, A. *et al*., 2012) aportan datos fenológicos que se han comprobado y ampliado en este trabajo.

- Descripción de la semilla como unidad de conservación

Las semillas de *B. erecta* están catalogadas en la Seed Information Data Base of the Royal Botanic Gardens (Kew, 2013). Su protocolo de germinación está definido con un 100% de germinación en: agar al 1%, temperatura de 25/10ºC y fotoperíodo de 16/8h (día/noche). Se considera a ésta como "¿ortodoxa?", pues los ensayos de germinación fueron realizados tras el almacenamiento a 5ºC durante doce meses en condiciones herméticas con ambiente de aire-seco (contenidos de humedad en la semilla menores de los que normalmente se logran en la naturaleza) sin que perdieran viabilidad. De este modo, se incrementa su longevidad de una forma cuantificable y predecible. Con este estudio, se pretende averiguar si se trata de semillas ortodoxas y mejorar la información existente.

En el cuadro 2, se muestra la semilla junto con los descriptores morfocolorimétricos básicos. Se tomaron imágenes a las dos accesiones recolectadas en la misma población pero en períodos distintos (en Septiembre la 125/2011 y en Octubre la 144/2011), mediante un microscopio estereoscópico apocromático (tabla de anexo I. materiales).

Cuadro 2: Características de la semilla de Berula erecta, extraído de (AGUT, A. *et al*., 2012).

Talla (mm x mm)	2,5 x 1.	**Detalle de la semilla**	**Muestra de semillas: Accesión 125/2011**	**Muestra de semillas: Accesión 144/2011**
Número de cotiledones	Dicotiledónea.			
Contorno	Piriforme.			
Sección	Comprimido (1:3).			
Color	Marrón - Amarillenta.			
Estructura exteriores	Cubierta externa con costillas filiformes.			
Ornamentación	Linear - reticulada.			
Tipo de semillas	Endospérmica.			
Tipo de embrión	Axial.			
Cat. de conservación	Parece ser ortodoxa.			

- Hábitat y ecología

Berula erecta vive a orillas de masas permanentes de agua corriente o estancada (ríos, arroyos, lagunas y pequeños humedales), en zonas, en general, con aguas poco profundas, entre formaciones de grandes helófitos (carrizales de *Phragmites australis*, espadañales de *Typha latifolia*, mansiegares de *Cladium mariscus*, comunidades de *Scirpus lacustris*, etc.) y en el contacto de dichas formaciones con el Hábitat de interés comunitario 1410 (Juncales mediterráneos).

En la Península Ibérica (PI) se encuentra hasta los 900-1000m de altitud y en el País Vasco desde el nivel del mar hasta los 650m (AIZPURU, I. *et al*., 1999; BOLÒS, O. *et al*., 2000; VV.AA. 2010).

Es una planta indiferente al sustrato, que se desarrolla en suelos de pH ácido, neutro o alcalino. Su parte subterránea se desarrolla en soportes con textura arenosa, franca o arcillosa, que se mantienen húmedos o empapados. Puede desarrollarse en lugares con semisombra o con exposición directa al sol.

- Encuadre fitosociológico

Berula erecta crece en comunidades vegetales pertenecientes a la clase fitosociológica *Phragmito-Magnocaricetea*, que agrupa todos los tipos de vegetación acuática o higroturbosa, oligo-meso-éutrofa, formada por helófitos erguidos o decumbentes de media o gran talla, que se desarrolla en márgenes de ríos, lagunas y cursos de agua más o menos permanentes. La tipificación fitosociológica de las comunidades de *Berula erecta*, cuando ésta es la especie dominante, no está bien estudiada y dentro de la clase, algunos autores, las asignan a la alianza *Glycerio-Sparganion*. Con menor frecuencia esta especie también participa en algunas comunidades ibéricas de la alianza *Molinio-Holoschoenion vulgaris* de la clase *Molinio-Arrhenatheretea* (BOLÒS, O. *et al*. 2000; LOIDI, J. *et al.,* 1997; RIVAS MARTINEZ, S. *et al.*, 2002).

- Distribución

Su área de distribución natural se extiende por Europa, SW de Asia y N de América, por lo que se incluye en el elemento florístico Circumboreal (Reino Holártico).

En la PI, está repartida de manera muy laxa por reducidos enclaves húmedos de 23 provincias españolas (ANTHOS, 2009).

En el País Vasco existen citas antiguas que no han podido ser confirmadas en la actualidad: en Algorta y Abadiño (Bizkaia), en Ilarraza (La Rioja), en las orillas del Bidasoa (Gipuzkoa).

Las únicas citas comprobadas actualmente son las de Arreo a 650 m y la de Estarrona, río Zalla a 500 m de altura, ambas localidades en Álava. Recientemente ha sido descubierta una nueva población en un pequeño Humedal de Peñacerrada a unos 740 m (J. GARMENDIA com. pers.) que ha sido incluida en el estudio. Así pues, la planta parece ser rarísima en la actualidad en la CAPV (VV.AA., 2010), y restringida a esos tres puntos.

Las localidades más cercanas a la CAPV (incluidas geográficamente en ella) serían las del Condado de Treviño (Burgos), en el nacedero del río San Vicentejo (Los Chorros) (VV.AA., 2010) y en la ladera sur de los Montes de Vitoria, entre Gobierno y Arrieta, esta última recientemente descubierta (P.M. URIBE-ECHEBARRÍA com. pers.).

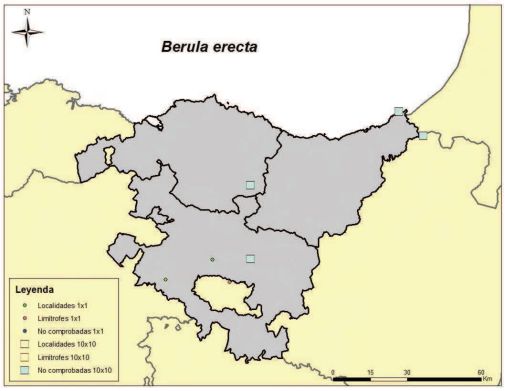


Imagen 1: Mapa de distribución de las poblaciones de *Berula erecta* conocidas en la CAPV (VV.AA., 2010).

- Localidades en Espacios Protegidos en el País Vasco

En el río Zadorra (LIC ES2110010) y en el Lago de Arreo (ES2110007) de la Red Natura 2000 (ingurumena. ejgv.euskadi.net, 2013).

- Catalogación de *Berula erecta* en el País Vasco y en la Península Ibérica.

En la evaluación realizada para la elaboración de la Lista Roja de la Flora Vascular de la CAPV, siguiendo los criterios de la UICN (UICN, 2012), *Berula erecta* ha sido evaluada como EN (en peligro de extinción) B2ab (i, ii, iii, iv, v) debido a: la escasez de localidades conocidas (solamente 3), la disminución histórica (6 localidades citadas), poblaciones con menos de 250 individuos maduros y la escasa probabilidad de "efecto rescate" de las poblaciones circundantes (URIBE-ECHEBARRÍA, P.M., 2010; VV.AA., 2010). Gracias a esto, *Berula erecta* se añadió en la última revisión del Catálogo Vasco de Especies Amenazadas de la Fauna y Flora, Silvestre y Marina (B.O.P.V., 2011) dotándola de una figura de protección.

En la Comunidad Autónoma de Castilla y León se encuentra catalogada como Especie de Atención Preferente (Decreto 63/2007, de 14 de junio), en la C.A. de Cantabria como Vulnerable (UICN 1994) y en la C. A. de las Islas Baleares como con Datos Insuficientes (UICN 2001) (ANTHOS, 2013).

- Amenazas

Los enclaves en los que habita *Berula erecta* son de los más frágiles ante obras de drenaje de zonas húmedas, alteración que puede explicar su desaparición de las localidades de donde se citó antiguamente. Ésta puede ser la causa de que esta planta sea una de las más amenazadas en la CAPV, y que corra un previsible riesgo de extinción local a corto o medio plazo (VV.AA., 2010).

Por otro lado, el bosque galería del río Zalla está muy fragmentado y deteriorado, habiendo sido sustituido en muchos tramos por plantaciones de chopos. También la ocupación de las márgenes por actividades agrícolas, huertas e instalaciones industriales contribuye a la pérdida de potencialidad ecológica (ingurumena. ejgv.euskadi.net, 2013).

Material y Métodos

En este apartado se presentan los protocolos empleados para los censos poblacionales y el tratamiento experimental de los datos recabados.

Además, se recogen los protocolos seguidos en el BG del JBO para la recolección, post-maduración, cuarentena y limpieza, caracterización de semillas y accesiones, conservación e ingreso de las semillas en el BG y estudio del protocolo de germinación de *Berula erecta* (AGUT, A. *et al.*, 2012), dirigidos a determinar los protocolos óptimos de recolección y germinación, y estudiar si es factible la conservación *ex situ* de *Berula erecta*.

- Censos poblacionales

Se hizo un seguimiento mensual de todas las poblaciones conocidas de *Berula erecta* de la CAPV y el Condado de Treviño. El censo se llevó a cabo utilizando el procedimiento propuesto en la Metodología del Atlas de Flora Amenazada de España (AFA) (IRIONDO, 2011). Como es una especie estolonífera y en ocasiones permanece bajo el curso de agua, se optó por realizar el censado mediante el "área de ocupación".

- Fenología anual

Con el seguimiento mensual se tomaron los datos fenológicos de las poblaciones presentes en la CAPV y territorios limítrofes.

- Datos fitosociológicos

Para la caracterización fitosociológica de las comunidades vegetales en que participa *Berula erecta* se han realizado inventarios empleando la escala de abundancia de Braun-Blanquet (BRAUN-BLANQUET, J., 1979).

- Tratamiento de las semillas

Recolección. Se recolectaron dos muestras en sendas accesiones de semillas de la población del río Zalla (Estarrona, Vitoria-Gasteiz). Ambas se recogieron asegurando la mayor diversidad genética posible, sin comprometer la viabilidad de la población en su hábitat natural; calibrando la presión ejercida por la recolección y adaptándola a la población. Por esto se hizo importante conocer y considerar las características biológicas de la especie, su ciclo vital y biología reproductiva (BACCHETTA, G. *et al.*, 2008) mediante el seguimiento y la vigilancia de la población durante las semanas previas.

Se realizaron dos recolecciones de semillas en distintas épocas a lo largo de todo el período de dispersión recabando la máxima información del proceso.

Se recolectó la semilla junto a los frutos que las contienen, de este modo se evita interrumpir el proceso de maduración fisiológica que se está produciendo, a la vez que se favorece la adquisición de tolerancia a la deshidratación. Este material se guardó en bolsas de papel, dejándolas en lugares sin altas temperaturas ni irradiación solar directa.

Post-maduración, cuarentena y limpieza. Una vez que el material llegó al Banco, se depositó en una bandeja sobre papel de filtro dentro del armario de post-maduración, en condiciones de 20-22ºC y 40-45% HR durante 2-3 semanas. Este proceso permite alcanzar a las semillas no maduras la capacidad de germinación.

En el proceso de limpieza se separaron las semillas de ramas, hojas, frutos, cubiertas, impurezas, etc. Se utilizaron procedimientos manuales y mecánicos.

Conservación e ingreso de las semillas en el Banco de Germoplasma. Se separaron semillas frescas para los ensayos de germinación y el resto de las muestras siguieron el protocolo de conservación. Sus etapas fueron: desecado, ultradesecado, encapsulado y almacenamiento por congelación.

Las semillas limpias se introdujeron en la sala de desecado, con condiciones ambientales controladas (10ºC y 10-15% HR), durante 2-3 semanas; en recipientes de plástico abiertos para que las semillas se equilibrasen con las condiciones de la sala. Después, se metieron en una vitrina de metacrilato bajo condiciones controladas (7-12% HR). Se monitorizó la disminución de su peso y su humedad en equilibrio (a_w, actividad del agua), utilizando una microbalanza de precisión y un psicrómetro (Anexo I), respectivamente. Se realizaron tres medidas de estos parámetros, una en cada estado (fresco, seco, ultraseco).

Las semillas ultradesecas de cada accesión se repartieron en tubos de vidrio reforzado conformando distintas submuestras, de peso y cantidad conocida. Se añadió un tampón de algodón hidrófobo separándolas de las cápsulas de gel de sílice (agente desecante e indicador de humedad). Los tubos se etiquetaron y se termosellaron a la llama para garantizar su hermeticidad. Ésta se comprobó en atmósfera saturada de humedad. Por último, se recubrieron con cartón y parafina.

Las etiquetas permitían identificarlos por un código de barras, un código de accesión o entrada y el nombre del taxón. Se colocaron en gradillas en la cámara de conservación. Las condiciones fueron a -18ºC durante un período de tiempo indefinido, anotando la fecha de ingreso en la sala de conservación del BG. Los tubos con las semillas para este ensayo permanecieron 10 meses congelados.

- Tratamiento experimental

Este trabajo compara los datos del ensayo realizado en el BG del JBO para las semillas en fresco (AGUT, A. *et al*., 2012), frente a los realizados durante este estudio con las semillas tras la congelación.

Se realizó el cifrado, la selección aleatoria y la extracción de los tubos termosellados con las semillas congeladas de *Berula erecta*. Se pasaron a la cámara de secado durante 24h para que se atemperasen. Tras este período, se abrieron y se mantuvieron otras 24 h en la sala de secado para equilibrar su contenido de humedad con el de la sala. A continuación, se extrajeron al laboratorio donde pasaron 24 h a temperatura y humedad ambientales. Tras otro período de 24 h. se introdujeron a un envase hermético en ambiente saturado de humedad y temperatura ambiente donde las semillas completaron su rehidratación.

Para realizar el ensayo de germinación fueron utilizadas 400 semillas de cada accesión (100 semillas para cada temperatura de ensayo: 10, 15, 20 y 25ºC). Las semillas para el ensayo fueron seleccionadas de forma aleatoria.

La semilla podía no estar completamente desarrollada en el momento de la siembra (diferentes grados de maduración), por lo que fue necesario sembrarla en el medio de cultivo adecuado (LOBATO DE OLIVEIRA FISCHER, L. *et al.* 2013). Por tanto, se utilizó agar al 0.6% en agua destilada. Se esterilizó en autoclave 20min a 121ºC. Se dejó enfriar y se procedió al plaqueado en condiciones asépticas en cabina de flujo laminar.

24h después de la rehidratación se realizó la siembra en las placas.

Los recuentos de germinación se realizaron de lunes a viernes. Las semillas germinadas en placa, se sembraron en bandejas de alveolos forestales con sustrato universal y se regaron periódicamente, manteniéndolas en las cámaras de germinación y crecimiento durante las primeras fases de crecimiento. Posteriormente, se transportaron al invernadero del JBO.

- Análisis de datos:

Con los datos tomados a lo largo del ensayo de germinación se pudieron caracterizar los resultados obtenidos mediante el cálculo de varios parámetros germinativos que se definen a continuación (BACCHETTA, G. *et al.*, 2008):

Velocidad de germinación (T_{50}) (CÔME, D., 1970):

$$T_{50} = \frac{[(N/2) - N_1) \cdot (T_2 - T_1)]}{N_2 - N_1} + T_1$$

Donde:

N= porcentaje final de semillas germinadas,

N_1= porcentaje de semillas germinadas por debajo de N/2,

N_2= porcentaje de semillas germinadas por encima de N/2,

T_1= número de días que corresponden a N_1, y

T_2= número de días que corresponden a N_2.

Retardo germinativo: Es el tiempo necesario para observar la primera semilla germinada (BACCHETTA *et al.,* 2008).

Tiempo medio de germinación: Permite conocer el tiempo medio de germinación de las semillas analizadas (TOMPSETT P.B. & PRITCHARD H.W., 1998).

$$MGT = \frac{\sum n_i \cdot d_i}{N}$$

Donde:

n_1 = nº de semillas germinadas en el día *d,*

d_1 = nº de días desde el inicio del ensayo de germinación, y

N = nº total de semillas germinadas al final del ensayo.

Valor Pico (VP): Es el porcentaje de germinación en un punto T respecto al número de días necesarios para alcanzar este punto (BACCHETA *et al.,* 2008).

$$VP = \frac{\%\text{ germinación en T}}{\text{punto T}}$$

Donde:

El punto T es en el que se cortan la curva de germinación (donde la velocidad de germinación empieza a descender) y una recta tangente a la misma desde el origen.

Valor de Germinación media diaria:

$$GMD = \frac{\%\text{Germinación total}}{\text{Duración del ensayo}}$$

Vigor de Germinación: relaciona los parámetros VP y GMD mediante la siguiente expresión:

$$VG = VP\ x\ GMD$$

- Herramientas estadísticas:

Fue necesario generar los modelos estadísticos que se ajustaran a los ensayos realizados tanto en fresco como tras la congelación. Para ello, se empleó el *software* de análisis estadísticos R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

El procedimiento seguido atiende a un modelo de ensayo de Bernoulli:

1. La variable aleatoria se ajusta a dos resultados posibles: éxito o fracaso. Donde p es la probabilidad de éxito (valor esperado de la variable aleatoria) y su varianza es p (1-p).

2. El resultado de cada ensayo es independiente de los obtenidos en ensayos anteriores (los ensayos de Bernoulli carecen de memoria). Por tanto, la germinación o no de cada semilla se considera como un éxito o fracaso respectivamente.

3. La probabilidad de éxito, p, es constante, modelando el cambio de p a lo largo de un gradiente de temperatura.

Dados n ensayos de Bernoulli (γ_i, donde $_i$ = 1, 2, 3,…, n), el modelo de regresión logístico con independencia de la probabilidad del éxito p_i [P (Y_i = 1)] en los valores correspondientes a las k variables explicativas x_i1, x_i2, …, x_ik puede ser descrito como (HOSMER, D.W. & LEMESHOW, S., 1989):

$$Ln\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = \alpha + \sum_{j=i}^{k} \beta_j x_{ij}$$

Donde:

$$P(Y_i=0) = 1 - (Y_i=1) = 1 - p_i$$

Las variables explicativas pueden ser continuas o categóricas. En este estudio, la variable continua es la temperatura, y las categóricas son los estados de las semillas y las accesiones.

La relación $p_i/1\text{-}p_i$ es conocida como odds de éxito o simplemente odds *o*. El log-odds es

también conocido como "logit (p_i)". Por lo tanto, simplificando y expandiendo la parte derecha del modelo se tiene (DALGAARD, P., 2008):

$$Ln(odd) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + ... + \beta_k x_k$$

Nota: Observar la sustitución de α por β_0.

- Protocolo óptimo de germinación

A través de los modelos estadísticos se extraen las conclusiones para el protocolo óptimo de germinación.

- Momento óptimo de recolección

A través de los modelos estadísticos obtenidos se extraen las conclusiones para el momento óptimo de recolección.

- Conservación *ex situ*

Se comprueba, mediante los porcentajes de germinación, si mantiene una capacidad germinativa aceptable después del proceso de conservación.

Resultados

- Censos poblacionales

Se ha hallado que el área de ocupación total de cada una de las poblaciones de Álava estudiadas es de 24m^2 en el caso del Humedal de Peñacerrada y de 27,5 m^2 y 10m^2 en cada cuadrícula UTM de 1km^2 del río Zalla. A continuación se presentan los datos.

Cuadro 3: Censos poblacionales de *Berula erecta* en el Humedal Peñacerrada y río Zalla.

Localización	Peñacerrada	Río Zalla	Río Zalla
Coordenadas UTM	30TWN2320	30TWN1944	30TWN1945
Altura (m)	738	500	500
Hábitat	Carrizal	Vegetación riparia	Vegetación riparia
Núcleos	2	17	12
Área de Ocupación (m^2)	10,5 y 13,5	Individuos aislados y masas de hasta 6,25	Individuos aislados y masas de hasta 4

En el actual estudio se han corroborado los emplazamientos de *Berula erecta* en el río Zalla (ver imagen 2) presentados en (AGUT, A. *et al.*, 2012).

Imagen 2: Distribución actual de la población de Berula erecta del río Zalla (Estarrona, Vitoria-Gasteiz) (AGUT, A. *et al.*, 2012).

- Fenología anual

En el cuadro siguiente se presentan los datos fenológicos observados.

Cuadro 4: Datos fenológicos de *Berula erecta*.

	Inicio	**Fin**
Quiescencia	Noviembre	Marzo
Crecimiento	Abril	Julio
Floración	Agosto	Septiembre
Fructificación	Septiembre	Octubre

- Datos fitosociológicos

Se presentan dos inventarios realizados en el río Zalla. El primero de una comunidad de *Scirpus lacustris* en la que participa *Berula erecta* y, el segundo, de una comunidad dominada por *B. erecta*. Ésta impera en pequeños montículos en el margen del cauce o en contacto con la orilla que quedan por encima del nivel del agua durante los meses de estiaje, cuando la planta tiene tiempo de crecer, florecer y fructificar.

Cuadro 5: Inventario 1. Comunidad de *Scirpus lacustris* 30TWN1944, 500 m, río Zalla (Estarrona, Vitoria-Gasteiz).

Índice	**Especie**
4	*Scirpus lacustris*
3	*Phragmites australis*
2	*Mentha aquatica*
2	***Berula erecta***
1	*Lycopus europaeus*
1	*Apium nodiflorum*
1	*Carex riparia*
+	*Alisma lanceolatum*
+	*Solanum dulcamara*
+	*Alisma plantago-aquatica*
+	*Lysimachia vulgaris*
+	*Rorippa nasturtium-aquaticum*
+	*Cyperus longus*
+	*Calystegia sepium*
+	*Typha latifolia*
+	*Sparganium erectum*

Cuadro 6: Inventario 2. Comunidad de *Berula erecta* 30TWN1944, 500 m. río Zalla (Estarrona, Vitoria-Gasteiz).

Índice	Especie
5	***Berula erecta***
1	*Mentha aquatica*
1	*Phalaris arundinacea*
1	*Calystegia sepium*
1	*Rorippa nasturtium-aquaticum*
+	*Scirpus lacustris*
+	*Alisma lanceolatum*

En Peñacerrada crece en contacto con un carrizal formando una comunidad monoespecífica que ocupa el canal que queda al margen del humedal.

- Parámetros germinativos

Los resultados obtenidos en condiciones lumínicas en (AGUT, A. *et al.*, 2012) y en el estudio actual se presentan en el cuadro 7.

Los parámetros son: Accesión, Estado, Temperatura (T), Porcentaje de Germinación (N), Duración Ensayo (DE), Retardo Germinativo (RG), Tiempo de Última Germinación (TUG), Tiempo 50 (T50), Tiempo Medio de Germinación (MGT), Valor Pico (VP), Germinación Media Diaria (GMD) y Vigor de Germinación (VG).

Cuadro 7: Resultados de los parámetros obtenidos durante los ensayos realizados.

Accesión	Estado	T (ºC)	N	DE	RG	TUG	T50	MGT	VP	GMD	VG
125/2011	Fresco	10	15	64	30	56	33,4	40,1	0,3	0,2	0,1
		15	36	64	21	64	29,1	36,6	0,7	0,6	0,4
		20	81	64	22	43	20,5	27,1	2,2	1,3	2,8
		25	52	64	14	64	26,9	35,0	1,1	0,8	0,9
144/2011	Fresco	10	3	64	35	43	37,0	40,3	0,1	0,0	0,0
		15	24	64	21	43	30,9	30,2	0,6	0,4	0,2
		20	89	64	21	56	24,6	31,3	2,1	1,4	3,0
		25	62	64	22	56	28,2	34,5	1,2	1,0	1,1
125/2011	Descongelado	10	14	66	23	52	32,3	7,3	0,3	0,2	0,1
		15	45	66	17	60	25,9	20,4	1,0	0,7	0,7
		20	57	66	12	66	38,0	25,5	1,9	0,9	1,6
		25	80	66	13	62	25,3	35,4	1,9	1,2	2,3
144/2011	Descongelado	10	7	66	20	61	43,0	4,4	0,1	0,1	0,0
		15	28	66	15	66	28,8	13,7	0,6	0,4	0,3
		20	40	66	13	66	22,0	16,1	1,2	0,6	0,7
		25	70	66	11	66	24,9	30,7	1,4	1,1	1,5
		Media =	44	65	19	58	29,4	26,8	1,0	0,7	1,0

- Protocolo óptimo de germinación

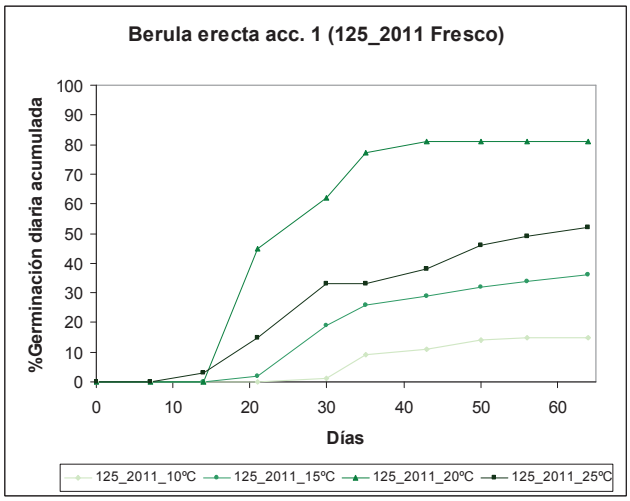
En las gráficas 1, 2, 3 y 4, se representa la germinación acumulada con respecto a los días de duración del ensayo.

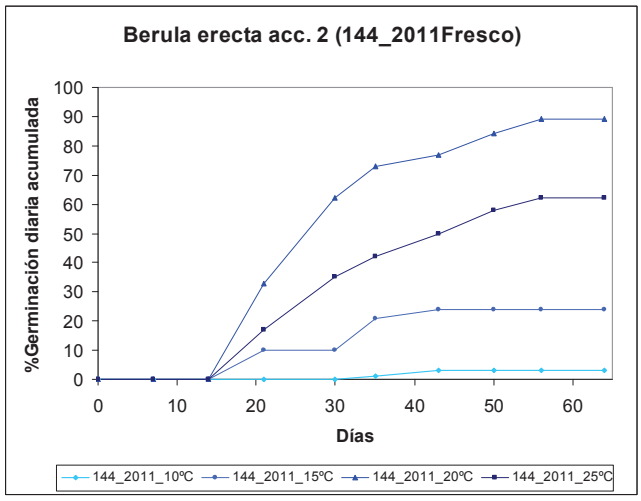
- Modelos estadísticos

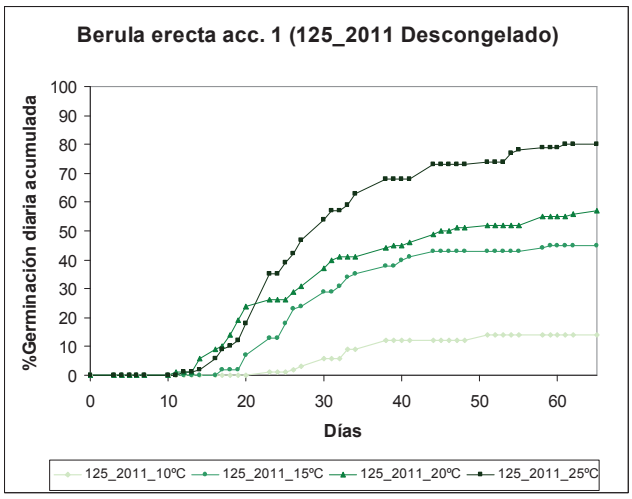
Para la comparación entre ambas accesiones se han definido los modelos estadísticos, de las germinaciones obtenidas en cada uno de los estados de conservación estudiados (fresco y descongelado), según el Modelo de Regresión Binomial Logístico. Las curvas atienden a un modelo de regresión cúbico. En fresco la R^2 obtenida es de 0.9533 (cuadro 8) y para descongelado es de 0.9988 (cuadro 9).

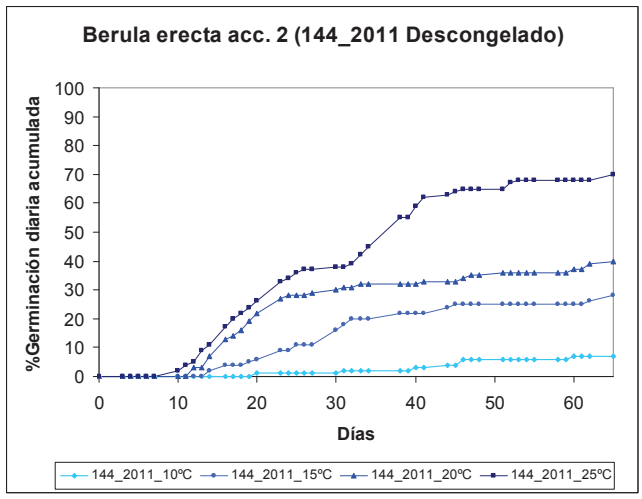
Por otro lado, se presenta el modelo estadístico (cuadro 10) que describe las diferencias entre temperaturas y accesiones en ambos estados (fresco y descongelado). Como el efecto de la temperatura explica las diferencias entre germinaciones para el 95.33% en fresco y el 99.86% tras la congelación, se va a presentar el modelo con la variable "temperatura" en *offset* realzando así la significancia de los parámetros "accesión" y "estado" dentro del modelo generado ($p<0.01$ y $p<0.001$ respectivamente). La curva atiende a un modelo de regresión linear quedando un R^2 de 0.0274.

En las gráficas 5 y 6 se muestra las curvas de regresión de las dos accesiones en cada estado de conservación.









Gráficas 1 y 2 (arriba); 3 y 4 (abajo): Resultados de las accesiones en fresco y descongelado (germinación diaria acumulada frente a días).

Cuadro 8: Modelo de Regresión Binomial Logístico para las accesiones 1 y 2 en fresco (125/2011 y 144/2011).

	Parámetros estimados	Error estándar	Valor de z	Pr(>|z|)	
β0	18,979	4,951	3,833	1,27E-04	***
β1 (acc)	-0,045	0,173	-0,260	7,95E-01	
β2 (temp)	-4,731	0,932	-5,078	3,81E-07	***
β3 (temp^2)	0,328	0,056	5,903	3,57E-09	***
β4 (temp^3)	-0,007	0,001	-6,407	1,48E-10	***
LnOdds=β0+β1*acc+β2*temp+β3*temp^2+β4*temp^3					
LnOdds=18,979-0,045*acc-4,731*temp+0,328*temp^2-0,007*temp^3					

***Nivel de significancia de 0,001

Cuadro 9: Modelo de Regresión Binomial Logístico para las accesiones 1 y 2 descongelado (125/2011 y 144/2011).

	Parámetros estimados	Error estándar	Valor de z	Pr(>|z|)	
β0	-1,491E+01	4,395E+00	-3,392	0.000693	***
β1 (acc)	-6,779E-01	1,654E-01	-4,099	4.15E-05	***
β2 (temp)	2,433E+00	8,189E-01	2,971	0.002971	**
β3 (temp^2)	-1,298E-01	4,836E-02	-2,683	0.007294	**
β4 (temp^3)	2,390E-03	9,101E-04	2,626	0.008641	**
LnOdds=β0+β1*acc+β2*temp+β3*temp^2+β4*temp^3					
LnOdds=-1,491E-1-6,779E-1*acc+2,433*temp-1,298E-1*temp^2+2,390E-3*temp^3					

***Nivel de significancia de 0,001 **Nivel de significancia de 0,01

Cuadro 10: Modelo de Regresión Binomial Logístico para las accesiones 1 y 2 (125/2011 y 144/2011) explicando el comportamiento de la semilla durante el proceso de conservación de manera global.

	Parámetros estimados	Error estándar	Valor de z	Pr(>|z|)	
β0	-22,0273	1,1323	-19,454	<2E-16	***
β1 (acc)	2,124	0,6988	3,040	2,37E-03	**
β2 (est)	3,3280	0,7462	4,460	8,19E-06	***
β3 (acc:est)	-2,2669	0,4502	-5,036	4,76E-07	***
LnOdds=β0+β1*acc+β2*est+β3*acc:est					
LnOdds=-22,0273+2,124*acc+3,3280*est-2,2669*acc:est					

***Nivel de significancia de 0,001 **Nivel de significancia de 0,01

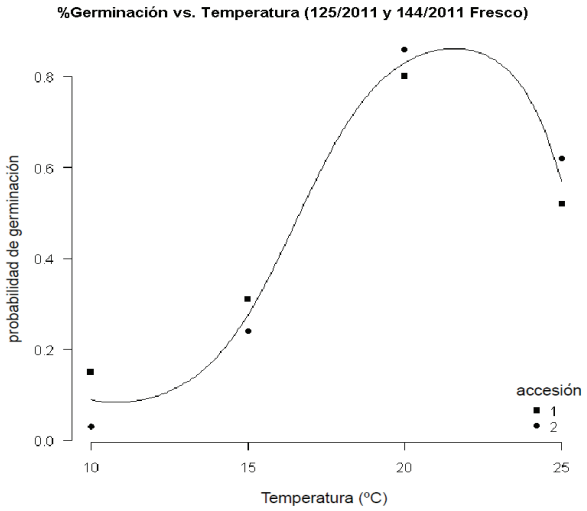
- Protocolo óptimo de recolección

Para las accesiones en fresco, las recogidas en Octubre han obtenido un 8% de germinación mayor que las recolectadas en Septiembre.

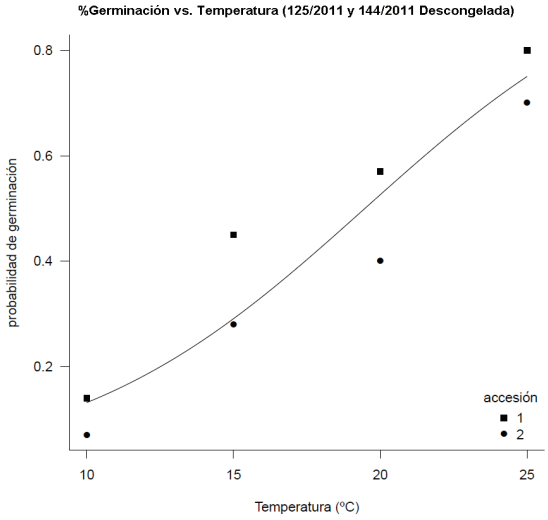
Tras el proceso de conservación *ex situ* las semillas de Septiembre germinan un 10% más.

- Conservación *ex situ*

A continuación, se presentan las curvas que dibujan los porcentajes de germinación de las dos accesiones frente a la temperatura en cada uno de los estados (gráfica 5 y 6).



Gráficas 5: Resultados de ambas accesiones en fresco (probabilidad de germinación frente a la temperatura).



Gráficas 6: Resultados de ambas accesiones tras el descongelado (probabilidad de germinación frente a la temperatura).

Discusión:

- Censos poblacionales

Se conoce una nueva población en Peñacerrada (P.M. URIBE-ECHEBARRÍA com. pers.) de la CAPV y se ha comprobado la persistencia de las poblaciones conocidas, corroborando que la población del río Zalla se extiende aguas arriba con presencia en una nueva cuadrícula UTM de 1km de lado (AGUT, A. *et al*., 2012).

- Fenología anual

Se establece la fenología anual de las poblaciones de la CAPV, aportando una mayor precisión y datos novedosos no recogidos en ningún estudio anterior.

- Datos fitosociológicos

Se aportan nuevos inventarios fitosociológicos, pero se necesita más información para tipificar las comunidades vegetales donde crece, sobre todo, donde domina *Berula erecta.*

- Parámetros germinativos

N. Se observa que la germinabilidad de las semillas de *Berula erecta* en fresco es buena a temperaturas cálidas (superior al 50%). El mayor porcentaje de germinación de las semillas en fresco se obtiene a 20ºC (90%).

Tras la congelación se observa que a temperaturas cálidas la germinabilidad es buena (superior al 40%). En este estado el mayor porcentaje de germinación se obtiene a 25ºC (70-80%).

Por último, el modelo que recoge todos los ensayos (cuadro 10), realza que tanto el estado como las accesiones difieren significativamente. Es decir, que la elección del período de recolección depende del fin para el que están destinadas las semillas (conservación o cultivo y producción de planta) y que la temperatura óptima es específica para cada estado de conservación. Es posible que las conclusiones que se obtienen de la comparación de ambos estados, estén afectadas en cierta manera por realizar los ensayos en diferentes períodos de tiempo.

RG. Es menor a temperaturas cálidas por lo que se aconseja utilizar temperaturas de 20/25ºC para los ensayos de germinación y producción de planta de *Berula erecta*. Mediante este parámetro se puede concluir que en comparación con los resultados obtenidos en semillas frescas, el estado de envejecimiento de lotes conservados no afecta a la germinabilidad necesitando una media de 19 días para darse la primera germinación.

TUG. Puede ser conveniente prolongar unos días6 los ensayos debido a que las últimas germinaciones se dan al final.

T50. Se comprueba que para temperaturas altas se obtiene un menor T50, afianzándose así la idea de que se requieren temperaturas cálidas o elevadas para obtener porcentajes de germinación elevados.

MGT. Se ha obtenido gran fluctuación entre las temperaturas estudiadas y para cada accesión. No se sigue un patrón pero el tiempo medio requerido es de 27 días. Un dato destacado es que a 15ºC y tras la congelación, ambas accesiones requieren poco tiempo de germinación media en comparación al resto. Al margen de esto, los ensayos han de permanecer aproximadamente un mes en las cámaras tras la primera germinación.

VP. Los valores pico mayores son para las temperaturas superiores, con lo que las semillas de *Berula erecta* a dichas temperaturas se comportan de una manera más explosiva.

GMD. Sólo se supera la unidad en las temperaturas cálidas, afianzando la tesis de que a 20 y a 25ºC son las temperaturas idóneas para los estados fresco y tras la congelación respectivamente.

VG. El índice de vigor de germinación consolida las conclusiones obtenidas en los otros parámetros germinativos estudiados.

- Protocolo óptimo de germinación

El protocolo óptimo para las semillas en fresco para ambas accesiones es a 20ºC, con fotoperíodo 16/8 h (día/noche) durante 64 días. Tras el proceso de conservación, el protocolo óptimo es a 25ºC (mismo fotoperíodo) durante 66 días (con un porcentaje de germinación significativamente mayor para la accesión 1, recolectada en Septiembre, al final del período de fructificación).

Por la forma en que las semillas tras la congelación han cambiado su comportamiento frente a la temperatura, tal vez sea conveniente realizar un ensayo con estratificación fría pudiendo obtener así mayores porcentajes germinativos.

Para futuros trabajos, habría que mejorar el diseño experimental realizando los ensayos con las semillas en ambos estados en el mismo período de tiempo. De esta manera se minimizan las variaciones experimentales en los procedimientos y permite realizar conclusiones más exactas. En este estudio se ha procedido de la manera relatada en "materiales y métodos" para que las semillas en fresco no perdieran viabilidad.

- Momento óptimo de recolección

En el primer modelo estadístico generado para las semillas en fresco (cuadro 8), se

observa que las diferencias entre ambas accesiones no son significativas ($p>0.001$). Por tanto, para realizar ensayos de germinación o cultivo y producción con semillas frescas, la recolección se puede hacer tanto en Septiembre como en Octubre, a lo largo de todo el período de fructificación.

Sin embargo, el segundo modelo estadístico correspondiente a las semillas tras la congelación (cuadro 9), pone de manifiesto que las accesiones tienen diferencias significativas en su germinación ($p<0.001$). Por tanto, es aconsejable recolectar las semillas en Septiembre, al inicio del período de fructificación.

Cuando se comparan los estados (cuadro 10) se concluye que la recolección se debe hacer en Octubre si su fin principal es la producción de planta con semillas en fresco (mayor porcentaje de germinación); pero si el objetivo es la conservación la recolección deberá hacerse en Septiembre debido a que las accesiones difieren significativamente ($p<0.01$).

- Conservación ex situ

Las semillas de *Berula erecta* se pueden conservar *ex situ* bajo las condiciones descritas anteriormente (ultrasecas y a -18ºC) manteniendo prácticamente intacta su germinabilidad en las semillas recolectadas en Septiembre, al inicio del período de fructificación y reduciéndose tan solo un 19% en las accesiones recolectadas en Octubre, al final del período de fructificación.

- Conclusión

Este trabajo actualiza y amplía la información que se poseía sobre *Berula erecta* y sus poblaciones conocidas en la CAPV actualmente, define el protocolo óptimo de germinación para sus semillas frescas y tras la congelación de las semillas ultrasecas, obtiene el período más adecuado para la recolección de semillas y determina que es posible su conservación *ex situ*.

Agradecimientos

En primer lugar, del Jardín Botánico de Olarizu y el Centro de Estudios Ambientales del Ayuntamiento de Vitoria-Gasteiz, agradecer a Agustí Agut su implicación, su dedicación y la aceptación de mi candidatura para desarrollar el estudio bajo su dirección. En segundo lugar, dar las gracias a Arantza del Canto y María Franco por haberme acompañado en este largo proceso y haber arrojado luz en los momentos difíciles.

Por último, de la UPV-EHU, a Javier Loidi y a Juan Carlos Iturrondobeitia reconocerles su papel de soporte institucional y personal.

Quería tener una mención especial a Gonzalo García-Baquero por su inestimable ayuda con los análisis estadísticos para la consecución de este trabajo.

No puedo dejar de estar infinitamente agradecido a mi familia y amigos por su paciencia y cariño.

GRACIAS Nancy Salas.

Referencias

AGUT, A., DEL CANTO, A. y MIRA, S. "*Memoria final del proyecto programa de conservación y reintroducción de la flora amenazada y característica de los robledales isla de Llanada Alavesa (LICES2110013)"*, 2012. Banco de germoplasma del Centro de estudios ambientales de Vitoria-Gasteiz. 114pp.

AIZPURUA, I.; ASEGINOLAZA, C.; URIBE-ETXEBARRIA, P.M.; URRITIA, P. & ZORRAKIN, I.; "*Claves ilustradas de la Flora del País Vasco y territorios limítrofes*", 1999. Departamento de Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco. 831pp. ISBN 84-457-1396-5.

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

BISBY, F.A., RUGGIERO, M.A., ROSKOV, Y.R., CACHUELA-PALACIO, M., KIMANI, S.W., KIRK, P.M., SOULIER-PERKINS AND A. & VAN HERTUM, J. "*Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2006 Annual Checklist*", (2006). CD-ROM; Species 2000: Reading, U.K.: http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2006/show_species_details.php?record_id=715546

BOLÒS, O. DE & VIGO, J. "*Flora dels Països Catalans*", 1984-2001. Vols. 1-4. Editorial Barcino. Barcelona.

B.O.P.V. miércoles 23 de febrero de 2011; Nº 37. DEPARTAMENTO DE MEDIO AMBIENTE, PLANIFICACIÓN TERRITORIAL, AGRICULTURA Y PESCA. Con ORDEN de 10 de enero de 2011, de la Consejera de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca, por la que se modifica el Catálogo Vasco de Especies Amenazadas de la Fauna y Flora Silvestre y Marina, y se aprueba el texto único. 937 – 949pp.

BRAUN-BLANQUET, J. "*Fitosociología. Bases para el estudio de las comunidades vegetales*", 1979. Blume Ediciones, Madrid.

CASTROVIEJO, S. *et al*. "*Flora Ibérica: plantas Vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*", 1986. Real Jardín Botánico de Madrid. v. X p 193-195.

CÔME, D. "*Les obstacles à la germination*", 1970. Masson & CIE, París

DALGAARD, P. "*Introductory Statistics with R*", 2008. Tema 13, © Springer Science+Business Media, LLC. 227-248pp. DOI: 10.1007/978-0-387-79054-1

Decreto 63/2007, de 14 de junio, por el que se crean el "*Catálogo de Flora Protegida de Castilla y León y la figura de protección denominada Microrreserva de Flora*", B.O.C. y L. núm. 119/2007, de 20 de junio de 2007; pp. 13197-13204.

HOSMER, D.W. & LEMESHOW, S. "*Applied Logistic Regression*", 1989. Segunda edición. John Wiley & Sons. Capítulo 7, 392pp. ISBN: 0-471-35632-8

IRIONDO, J.M. (Coordinador). "*Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España. Manual de metodología del trabajo corológico y demográfico*", 2011. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino). Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas. Madrid, 70 pp.

KOO B., PARDEY P. & WRIGHT B., 2004. Saving seeds. IPGRI and IFPRI. CABI Publishing. Wallingford, UK. pp. 209-217.

LOBATO DE OLIVEIRA FISCHER, L., ROSSAROLLA, M.D., FISCHER, C., LOBATO DE OLIVEIRA, E. & LUIZ GIACOBBO, C. "*Emergência de plântulas de porta-enxertos de pessegueiro submetidos a diferentes períodos de estratificação*"**,** Enero-Marzo 2013. Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. Revista: Ciência Agronômica, v. 44, n. 1, p. 199-204. www.ccarevista.ufc.br ISSN 1806-6690 Obtenido de http://www.accesowok.fecyt.es/

LOIDI ARREGUI, J., BIURRUN, I. & HERRERA, M. "*La vegetación del centro-septentrional de España*", 1997. Itinera Geobot. Volumen 9. 161-618pp. ISBN: 0213-8530

MIRANDA ARCE M. G., "Tzayanal-quilitl: planta acuática registrada en cuatro códices del siglo XVI". Elementos 89 (2013) 39-42

R DEVELOPMENT CORE TEAM. "*R: A language and environment for statistical computing*", 2011. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: http://www.R-project.org/ 25/03/2013

RIVAS-MARTÍNEZ, S., DÍAZ, T.E., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, F., IZCO, J., LOIDI, J., LOUSÃ, M. & PENAS, ÁNGEL. "*Vascular plant communities of Spain and Portugal. Addenda to the syntaxonomical checklist of 2001*", 2002. Volumen 15 (2). Editado por el Servicio de Publicaciones de la Universidad de León. 922pp. ISSN: 0213-8530

TOMPSETT P.B. & PRITCHARD H.W. "*The effect of chilling and moisture status on the germination, dessication tolerance and longevity of Aeusculus hippocastanus L.* seed", 1998. Annals of Botany 82:249-261.

UICN, "*Red List Categories*", 1994. Prepared by the IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland.

UICN, "*Red List Categories and Criteria: Version 3.1*", 2001. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, Uk.

UICN. "*Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN: Versión 3.1"*. 2012. Segunda edición. Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido: UICN. vi + 34pp. Originalmente publicado como: "*IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1"*. Second edition. (Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN, 2012). ISBN: 978-2-8317-1539-1

URIBE-ECHEBARRÍA DÍAZ, P.M.. "*La flora amenazada del municipio de Vitoria-Gasteiz (Álava)"*, 2010. Centro de Estudios Ambientales, Ingurugiro Gaietarako Ikastegia. Vitoria-Gasteiz. 47pp.

VV.AA. "*Lista roja de la flora vascular de la CAPV*", 2010. IHOBE. Gobierno Vasco. Dpto. de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca. 348pp.

Páginas web consultadas:

http://www.anthos.es/ 4/12/2012

http://www.ingurumena.ejgv.euskadi.net/r49-u95/es/u95aWar/u95aPintaFicheroServlet?R01HNoPortal=true&idiomaFichero=es&codigoFichero=3124&tipoFichero=2&R01HNoPortal=true 31/1/2013

Royal Botanic Gardens, Kew: *www.kew.org/ 5/9/2013*

"*The International Plant Names Index*", 2013. *http://www.ipni.org* 13/08/2013

Anexo I. Tabla de materiales empleados.

Material	Grupo	Marca	Especificaciones
Bata	Equipo de protección		De tela.
Campana extractora	Equipo de protección	TELSTAR Mini-V/PCR	50/60Hz; 0,8Kw; Con lámpara UV.
Gafas Universales	Equipo de protección	MEDOP	Protegen contra pequeños impactos.
Guantes	Equipo de protección	Eurotubo - DELTALAB	Guantes de latex para examen con polvo.
Guantes térmicos	Equipo de protección	CLAVIES	Protección contra materiales calientes.
Mascarilla	Equipo de protección		Desechables. Protege de polvo no tóxico.
Autoclave	Equipos de trabajo	JP. Selecta (Med 12)	121/134ºC. 50-60Hz.
Balanza	Equipos de trabajo	Mettler Toledo Excellence XS205 dual range	Máxima: 81 / 220g.
Baño de agua	Equipos de trabajo	JP. Selecta	A: 2,7; W: 640; V: 230; W: 640; 50-60Hz.
Columna de tamices con vibración	Equipos de trabajo	FILTRA VIBRACIÓN S.L. FTP - 0200	230V (50Hz); 0,8 a 400W
Destilador	Equipos de trabajo	WATERLAB (Sistemas de purificación de agua)	Tipo II: Analytical grade water.
Encapsulador	Equipos de trabajo	Tecnifarma experience Capsunorm	Para el cierre de 100 cápsulas a la vez.
Equipo de cierre de tubos y soporte con ventosas	Equipos de trabajo		Gas Propano-O_2.
Estufa	Equipos de trabajo	JP. Selecta	1600W. 50-60Hz.
Impresora de etiquetas	Equipos de trabajo	BRADY BBP 11	Tinta negra (en rollo).
Granatario	Equipos de trabajo	Mettler Toledo PL602 - L	Máximo: 610g. Mínimo: 0,5g. e: 0,1g. D: 0,01g.
Psicrómetro	Equipos de trabajo	Rotronic Hygroplan	Rango OP: -40 +60ºC. Rango: 5 a 50ºC. Voltage: 3,3 - 5,0 VDC.fuera: 0 1 aw (0 - 100%Hr).
Lector de códigos de barras	Equipos de trabajo	MOTOROLA SYMBOL LS2208	Scanner de códigos de barras.
Microscopio estereoscópico	Equipos de trabajo	Leica S8APO	Asociado a cámara digital y software de imagen (LAS3.7).
Mini-circular de vidrio	Equipos de trabajo	Proxxon D-54518 Nierbach	220-240V; 50/60Hz; 85W; n = 6.500/min; diámetro de la radial: 50-58mm
Pulidora	Equipos de trabajo	SEED PROCESSING - HOLLAND	200-300V; 50-60Hz; 250Va y 10A.
Soplador	Equipos de trabajo	MARATHON ELECTRIC	110-220V; 7,8-3,9A y 2850RPM.
Vitrinas	Equipos de trabajo	Diseño propio	Metacrilato.
Agar Bacteriológico tipo Europeo	Productos y Reactivos	CULTIMED (Panreac)	Límite máximo de impurezas 10% a 105ºC.
Agua destilada	Productos y Reactivos	WATERLAB (Sistemas de purificación de agua)	Tipo II: Analytical grade water.
Algodón	Productos y Reactivos		Hidrófobico.
Cápsulas 00 incoloro	Productos y Reactivos	GUINAMA (Absoluta calidad)	Longitud cuerpo: 20,5mm; Diámetro cuerpo: 8,22mm.

Parafilm Mis	Productos y Reactivos	LABORATORY FILM	4 pulgadas x 125 pies.
Parafina	Productos y reactivos	Leica microsystems (Paraplast Plus)	Punto de fusión de los gránulos: 56ºC. Contiene Dimetil sulfóxido.
Silica - gel	Productos y Reactivos	GeeJay Chemicals LTD.	0,5 - 1,0mm. Vira de naranja a verde con la humedad.
Sustrato para plantas	Productos y Reactivos	LORE-LURRA	Enmienda orgánica para turba Profesional. $[P_2O_5]_{Tot}$ = 2,9%. $[K_2O]_{Tot}$ = 3,1%. $[CaO]_{Tot}$ = 3,1%. Materia Orgánica Total = 65,75%. Carbono Orgánico = 10,60%. Ácidos Húmicos = 5,9%. $[Cu]_{Tot}$ = 0,003%. $[Zn]_{Tot}$ = 0,01%. Relación C/N: 29. Humedad = 50 - 60%. pH = 6-7,5. Conductividad eléctrica = 0,6ds/m.
Bandejas	Material	Araven	Plástico.
Bandejas	Material	BRA	Acero Inoxidable.
Bandeja forestal	Material		Plástico rígido con 54 alvéolos de 16cm de profundidad.
Bolígrafos permanentes	Material		Negros.
Botes	Material		Con cierre hermético.
Embudos	Material		Plástico y vidrio.
Espátulas y micro-espátulas	Material		Metálicas.
Etiquetas	Material		Pequeñas y medianas.
Etiquetas para semilleros	Material		De plástico.
Frascos	Material		Con tapón de rosca 1L.
Gradillas	Material		Plástico blanco. Anticaída (para congelar) y normales.
Lijas	Material		Diferentes grosores.
Pinceles y brochas	Material		Diferentes tamaños (para limpieza de semillas y material).
Pinzas	Material		Metal. Punta curva y punta alargada.
Placas *petri*	Material	Semademi. Rotronic AG., DeltaLab.	Poliestireno. Diferentes medidas: pequeñas, medianas y grandes.
Regaderas	Material		Plástico.
Regla	Material		Plástico.
Semilleros	Material		Pástico negro. De fondo corto y fondo largo.
Sobres	Material		Papel.
Tijeras	Material		Metálicas.
Tubos de cartón	Material	TuboPack	Hechos a medida de los tubos de vidrio.
Tubos de ensayo	Material	Deltalab - Eurotubo	Vidrio.

Cuadro del Anexo I: materiales, productos, reactivos y equipos utilizados en el estudio (elaboración propia).