



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

BIOLOGIAKO GRADUA

GRADU AMAIERAKO LANA

**Euskal Herriko hiru iratze mehatxaturen
esporen bideragarritasuna epe laburrera
mantentzen duen biltegitratze-metodo
optimoa**

Maite Lopez de Arbina Labandibar

Leioa, 2013ko uztaila

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

LABURPENA

Hiru iratze mehatxatuen (*Thelypteris palustris* Schott, *Dryopteris submontana* (Fraser-Jenk. & Jermy) Fraser-Jenk eta *Culcita macrocarpa* C. Presl) esporen ernetze portzentajea lortu da hilabetez esporak -20, 5 eta 20°C-tan Eppendorf hodi (baldintza lehorra) eta agarrezko kultibo mediodun Petri plaketan (baldintza hezea) biltegitratuta egon ondoren. Horrela, espezie bakoitzaren esporen bideragarritasuna mantentzen duen biltegitratze metodo optimoa lortu da, eta modu honetan esporak epe-ertainean gorde eta espezie hauen kontserbazio eta berreskuratze proiektuetan erabili ahal izango da. Espezie guztietan, esporen ernetze portzentajearen biltegitratze motak, tenperaturak, eta biltegitratze-tenperatura interakzioak eragin esangarria izan zuten. Salbuespena *T. palustris* izan zen, espezie honek duen estresarekiko jasagarritasun altua dela eta, tenperaturak ez zuen eragin esangarririk izan. *T. palustris* espeziearen kasuan, -20 °C-tako tratamenduaren ostean gametofitoak garatu ziren, tenperatura honetan esporen garapen-tasa beste tenperaturetan baino azkarragoa izanik. *C. macrocarpa* eta *D. submontana* espezieetan ordea, -20°C-ko baldintza hilkorra izan zen. Kasu gehienetan, baldintza heze eta 5°C-ko biltegitratzea izan zen esporen bideragarritasuna hoberen mantendu zuena. Hilabete batean biltegitratze lehorrean esporek bideragarritasuna galdu zuten, espezie bakoitzaren eskakizun ekologikoek esporen bideragarritasunean eragina dutela adieraziz eta esporen kontserbazio programetan kontuan hartzea komeni da. Azterketak erakusten du Euskal Herrian garrantzitsuak diren hiru iratze espezie hauen esporen bankuak *ex situ* kontserbaziorako bide posible eta lagungarria eskaintzen duela.

ABSTRACT

Spore germination of three threatened fern species (*Thelypteris palustris* Schott, *Dryopteris submontana* (Fraser-Jenk. & Jermy) Fraser-Jenk and *Culcita macrocarpa* C. Presl) was determined after one month of storage in Eppendorf tubes (dry storage) or on agar plates (wet storage) at -20, 5 and 20°C temperatures. Thereby, we identify the suitable storage condition for spore of fern species that best preserved viability. In this way, it will be possible to storage spores for medium term and use them in conservation and restoration projects. In most cases, storage technique, storage temperature and technique-temperature interaction had a significant effect on germination percentage, except for *T. palustris*, since in this case the temperature was not significant. Spores of *T. palustris* developed gametophytes after being at -20°C storage, so in this temperature the development-rate was higher than in the others. By contrast, in *C. macrocarpa* and *D. submonata* species, the -20°C temperature was lethal for spores. In general, wet storage at 5°C was the procedure that best preserved viability. The dry storage produced the decline in germination percentage in this three species over one month, suggesting that the ecological requirements of species may influence spore viability and should be taken into account when designing spore conservation programs. The study shows how helpful it is for *ex situ* conservation for these species of great importance in the Basque Country the use of germoplasm banks.

SARRERA

Pteridofitoak primitiboenak diren trakeofitoak dira eta bizi-zikloan zehar duten urarekiko menpekotasuna eta baldintza zorrotzen beharra dela eta, ingurumen asaldurekiko oso sentiberak dira (Ballesteros *et al.*, 2004; Delgado & Plaza, 2010). Honegatik, klima aldaketagatik eta habitat galerengatik, iratze taxon asko desagertzeko arriskuan aurkitzen dira. Euskal Herrian 60 bat espezie aurkitzen dira eta horietako 13 espezie zerrenda gorrian daude katalogatuta (Eusko Jaurlaritza, 2011; Nafarroako Gobernu Forala, 1997).

Iratze hauen biziraupena *in situ* bermatzea da kontserbazioaren helburu nagusia. Hala eta guztiz ere, osagarriak diren *ex situ* metodoak beharrezkoak dira espezieen biziraupen aukera emendatzeko (Magrini *et al.*, 2010). Germoplasma bankuek esporen edota hazien bideragarritasuna, hazkuntza gaitasuna eta osotasun genetikoa epe luzera mantentzen dute (Ballesteros *et al.*, 2012), kontserbaziorako beharrezkoa dena. Hau dela eta, germoplasma bankuetan iratze esporak barne hartzea beharrezko neurria da (Ballesteros *et al.*, 2004; Ballesteros & Walters, 2007) eta espezie mehatxatuen berreskurapen plan gehienetan burutu beharrekoa da. Gainera, iratze esporekin lan egiteak abantailak dakartza, izan ere, esporak kopuru handietan erraz lortu daitezke, biltegiratzeko leku gutxi behar dute eta erraz ernetzen dira kultiborako betekizun hertsirik gabe (Quintanilla *et al.*, 2002).

Ex situ kontserbazio arrakastatsua lortzeko, espezie bakoitzaren esporen bideragarritasuna nola mantendu jakitea beharrezkoa da (Ballesteros & Walters, 2007; Quintanilla *et al.*, 2002). Pteridofitoei, oro har, esporen bideragarritasuna epe motz-ertainera mantendu dezakete, normalean 1 eta 3 urte bitartean zehar, baina aldakortasun handia dago espezieen artean. Bariazio honen erantzule nagusietako bat zeluletan klorofilaren presentzia-absentzia da, haien arteko ernetze tasa eta bideragarritasuna izugarri desberdinak izanez (Gabriel y Galán & Prada, 2010). Hainbat ikerketa burutu dira bi espora moten arteko aldeen zergatia aztertzen dutenak (Lloyd & Klekowski, 1970). Honetaz aparte, proposatu da genotipoak, adinak, baldintza abiotikoei edota lehiak eragina dutela bideragarritasunean (Gabriel y Galán & Prada, 2010). Honen inguruan ikerketa ugari egin dira hazietan, baina gutxi dakigu esporetan ematen diren aipatutako faktoreen eta bideragarritasunaren arteko erlazioei buruz.

Azken urteetan egin diren pteridofitoei buruzko lan urriek, esporen bideragarritasuna epe luzean mantentzeko metodo optimoaren analisisian jarri dute arreta. Izan ere, biltegiratze baldintza optimoa lortuta, mehatxatuak dauden espezieen esporetatik ale berriak lortu ahalko dira, populazioan jatorrizko genotipoa barneratzea ahalbidetuz (Magrini *et al.*, 2010). Iratze esporen bizitza-luzera, biltegiratuta daudeneko hezetasun eta tenperatura baldintzen arabera da (Gabriel y Galán & Prada, 2010). Tenperatura da esporen funtzionamenduan eragina duen kanpo faktore ezagunena eta biltegiratzea hainbat tenperatura desberdinekin testatua izan da (Aragon & Pangua, 2004; Ballesteros

et al., 2004; Ballesteros *et al.*, 2012; Ballesteros & Walters, 2007; Pence, 2000; Quintanilla *et al.*, 2002). Hezetasunak biltegitratuta dauden esporetan duen eragina aztertzeke hainbat metodo erabili dira, hala nola baldintza heze eta lehorren alderatzea (Quintanilla *et al.*, 2002; Aragon & Pangua, 2004), hezetasun erlatiboaren kontrola (Ballesteros *et al.*, 2012; Ballesteros & Walters, 2007) eta krio-biltegitratzea (Ballesteros *et al.*, 2012). Baldintza hezean 5 edo 20°C-tan mantentzen dela hoberen bideragarritasuna ondorioztatu da ikerketa gehienetan (Quintanilla *et al.*, 2002; Aragon & Pangua, 2004; Ballesteros, 2010).

Ikerketa honekin jakin nahi duguna da zeintzuk diren Euskal Herrian mehatxatuak dauden hiru iratze espezieen esporen bideragarritasuna mantentzeko biltegitratze baldintza espezifiko optimoak, esporak epe-ertainean gorde eta espezie hauen kontserbazio eta berreskuratze proiektuetan erabiltzeko helburuarekin. Ikerketa *Thelypteris palustris* Schott (Thelypteridaceae), *Dryopteris submontana* (Fraser-Jenk. & Jermy) Fraser-Jenk (Dryopteridaceae) eta *Culcita macrocarpa* C. Presl (Disksoniaceae) iratzeekin burutu da, hiruen esporak ez-klorofilikoak izanik.

T. palustris Schott urpeko errizomadun iratze bizikorra da, peziolo glabroa, fronde bakarti luzanga-lantzeolatua eta bitan pinatua duena. Pinula triangeluar lantzeolatuen azpialdean, ertzetik oso hurbil esporangioak ditu eta esporak elipsoidalak eta azal latzekoak dira. Esporak uztaila eta iraila bitartean heldu eta udazkeneko euriekin ernatzen dira. Banaketa zirkumboreala du eta EAEn itsasorantz doazen erreka txikien ertzetan dauden populazio sakabanatu eta mugatueta aurkitzen da, 0-600 m-ko altitudetan eta lurzoru hareatsu eta hezeetan. Populazio hauen arteko distantziak, populazio bakoitzeko ale kopuru murrizak eta *Baccharis halimifolia* moduko landare inbaditzaileen zabaltzeak iratze hau zerrenda gorrian galtzeko arrisku kategorian egotea eragin dute (Aizpuru *et al.*, 2010; Eusko Jaurlaritza, 2011; Urtaran *et al.*, 2011a).

D. submontana (Fraser-Jenk. & Jermy) Fraser-Jenk errizomatik hainbat fronde berde argi garatzen dituen iratzea da. Ezkataz inguraturiko peziolo motz eta fronde triangeluar lantzeolatuak dauzka eta bitan edo hirutan pinatuak dira. Fronde azpialdean eta pina ardatzetan ile txikiak ditu, eta landarean zehar limoi usaia askatzen duten eta bereizgarriak diren guruin ugari ditu. Esporangioak pinuletan daude eta esporak ekaina eta iraila bitartean heltzen dira, elipsoidalak direnak. EAEn oso populazio gutxi ezagutzen dira, denak kareharrizko harkaitzetako zirrikitueta, giro heze eta freskoa duten leku elurtsu eta lainotsuetan agertuz. Iratze honen egungo banaketa klima-faktorek mugatu dute, populazioak altitude handiko mendietan eta elkarrengandik oso banatuak egonik. Honek arriskuan jartzen du landarearen biziraupena, eta orain kaltebera moduan katalogatua egon arren, egoerak okerrera egin dezake (Aizpuru *et al.*, 2010; Eusko Jaurlaritza, 2011; Urtaran *et al.*, 2011b)

C. macrocarpa C. Presl iratzeak fronde lantzeolatua, larrukara, distiratsua eta 2-5etan pinatua du, oso handia izan ohi dena gainontzeko iratzeekin konparatzen bada. Pinulen azpian eta bi kuskuek osatutako egitura oboideetan, kopa-itxurako esporangioak ditu, indusioz estaliak eta esporak uda eta udazken hasieran heltzen dira. Esporek toki gerizpetsu eta hezeak behar dituzte ernetzeko eta

triangelu-itxurakoak dira. Iratze honek lur silizeoak, giro epel, atmosfera oso heze eta garaiera baxuak behar ditu bizitzeko. Altitude oso baxuetan eta asko jota itsasertz atlantikotik 20 km-ra agertzen da. Bere eremu nagusia makaronesia (Azores, Madeira eta Kanariar Irlak) da eta mesozoikoko klima epel eta hezeagoen azken aztarnetariko bat bezala hartzen da Europa kontinentalean. Bizkaiko populazioek osatzen dute taxon honen mundu-mailako banaketaren ekialdeko muga. Bizkaiko populazioak txikiak eta ale kopuru urrikoak dira eta kostaldetik hurbil dauden errekaetako haitz-ezponda bakan batzuetan topa daitezke. Baldintza ekologiko eta klimatiko zorrotzak eta populazioak gehienetan zuhaitz-landaketan ertzean egoteak eragin du espezie hau galtzeko arrisku larrian egotea (Aizpuru *et al.*, 2010; Eusko Jaurlaritza, 2011; Urtaran *et al.*, 2011b).

Biltegitratze baldintza optimoa lortzeko, esporak hilabete batez baldintza heze edo lehorrean mantendu dira -20, 5 edo 20°C-tan, eta ernetze portzentajea 30 egun ernetze-ganbaran egon ondoren determinatu da. Biltegitratzea eman ondoren, gero eta ernetze portzentaje altuagoa izan, hobe izango da baldintza. Gure hipotesia da espezie guztien esporen ernetze portzentajearen, biltegitratze motak eta tenperaturak eragin esangarria izango dutela eta ekologiak biltegitratze optimoan eragina izango duela.

MATERIAL ETA METODOAK

Ikerketa Euskal Herriko hiru iratze mehatxaturekin burutu zen; *C. macrocarpa* galtzeko arrisku larrian, *T. palustris* galtzeko arriskuan eta *D. submontana* kaltebera kategorian sailkatuak (Eusko Jaurlaritza, 2011). Lehenengo espeziearen esporak Iturritan Lorategi Botanikoko (Aia, Gipuzkoa) ale bakarretik bildu ziren (jatorrizko populazioa Bermeo, Bizkaia) eta azken bi espezieenak populazio jakinako gutxienez hamar indibiduoetatik lortu ziren, populazioaren aldakortasun genetikoa biltzeko (Quintanilla *et al.*, 2002). Korologia eta fenologiaren arabera, espezie bakoitzeko indibiduo bakoitzetik esporangio osasuntsu, heldu eta itxiak zituzten hainbat fronde zati batu ziren (Ballesteros, 2008a). Frondeak Euskal Herriko gunen desberdinetan 2012-2013 urteen bitartean bildu ziren (1.Taula). Esporen askapen goiztiarra ekiditeko, fronde zatiak paperezko poltsetan bildu ziren (Quintanilla *et al.*, 2002). Esporak eskuratzeko, bildutako fronde zatiek bost egun eman zituzten paper-orrietan, gainean pisu arinarekin (Ballesteros, 2008a). Espezie bakoitzeko indibiduo desberdineko esporak, Petri plaka bakarrean bildu ziren eta 5°C-etako ganbaran mantendu ziren ikerketa hasi arte (Delgado & Plaza, 2010). Bildu eta azterketa hasi arteko denborak ez du eragin esangarririk esporen bideragarritasunean (Ballesteros & Walters, 2007).

Esporak baldintza heze eta lehorrean biltegitratu ziren. Biltegitratze lehorrean, esporak Eppendorf hodieta jarri ziren. Biltegitratze hezean, esporak zuzenean %1eko kontzentrazioko agarrezko hazkuntza mediotan erein ziren Petri plaketan. Esporak ez ziren esterilizatu, bideragarritasuna murriztu dezakeelako (Ballesteros, 2008a). Honen ordean, mediora onddoen agerpena oztopatzen duen Nystatin (100 U·ml⁻¹) fungizida gehitu zen. Fluxu laminarreko ganbaran, esporak

pintzelarekin batu eta kolpeak emanez plaketan banatu ziren, jarraian Parafilm (Amercan Nacional Can, Chicago, Illinois, USA)-arekin zigilatuz. Petri plakak eta Eppendorf hodiak aluminiozko paperarekin estali, eta hilabetez -20, 5 edo 20°C-tan biltegitatu ziren. Biltegitatze lehorreko esporak, ernetze testa hasi baino lehen agarrezko Petri plaketara pasa ziren.

Hilabete bateko biltegitatzearen ondoren, baldintza heze eta lehorretan egondako Petri plakak, 12 orduko foto-periodoa eta egunean 22°C (hodi fluoreszente bidezko egunekoa argia) eta gauean 12°C-ko tenperaturetako ernetze-ganbarara lekualdatu ziren (Delgado & Plaza, 2010). Ikerketa hasi aurretik, ernetze baldintza hauek *D. submontana* iratzearentzat egokiak direla ziurtatu zen, esporetatik gametofitoak lortuz (Garmendia *et al.*, 2012). Hiru espezie, bi biltegitatze mota eta hiru tenperatura aztertu zirenez, 18 tratamendu desberdin aztertu ziren. Tratamendu bakoitzeko, ernetze testa hiru Petri plakekin (erreplika) burutu zen. 30 egun ernetze-ganbaran eman ondoren, erreplika bakoitzetik 25 esporako multzoetan 200 espora zoriz aukeratu ziren eta zenbat ernatu ziren determinatu zen. R programa estatistikoak, 200 espora hauetatik 100 zoriz aukeratu zituen, erreplikako ernetze portzentaje bat lortuz. Bideragarriak diren esporak ernetzen direnez, iratze esporen bideragarritasuna ernetze portzentajearen bitartez neurtzen da (Gabriel y Galán & Prada, 2010). Esporaren pareta hautsia eta lehen zelula jada irteten hasia zenean, espora ernatutzat hartu zen (Quintanilla *et al.*, 2002). Esporak ikusi ahal izateko NIKON ZM800 lupa binokularra erabili zen. Biltegitatze aurreko kontrola (1.Taula) burutzeko, ernetze test berdina burutu zen espezie bakoitzeko hiru erreplikekin.

1.Taula. Hiru iratzeen populazioen kokalekua, bilketa-data eta biltegitatu aurreko ernetze portzentajea. *C. macrocarpa* espeziearen ernetze portzentajea Quintanilla *et al.* (2002) (*)-tik lortu da eta Ballesteros *et al.* (2012) ikerketetatik *D. filix-max* espeziearen datua (**), egin diren ikerketetatik hori baita *D. submontana* espezieetik ebolutiboki gertuen dagoen espeziea (Juslen *et al.*, 2011).

Espezieak	Populazioen kokalekua	Bilketa-data	Biltegitatu aurreko ernetze %
<i>Dryopteris submontana</i>	Araba: Aratz mendia	2012, Uztaila	78 ± 3,8**
<i>Thelypteris palustris</i>	Gipuzkoa: Jaizkibel mendia, Higerreko Talaia pasealekua	2012, Urria	89 ± 3,6
<i>Culcita macrocarpa</i>	Gipuzkoa: Aia, Iturraran. Jatorrizko populazioa Bermeo, Bizkaia	2013, Urtarrila	69 ± 3*

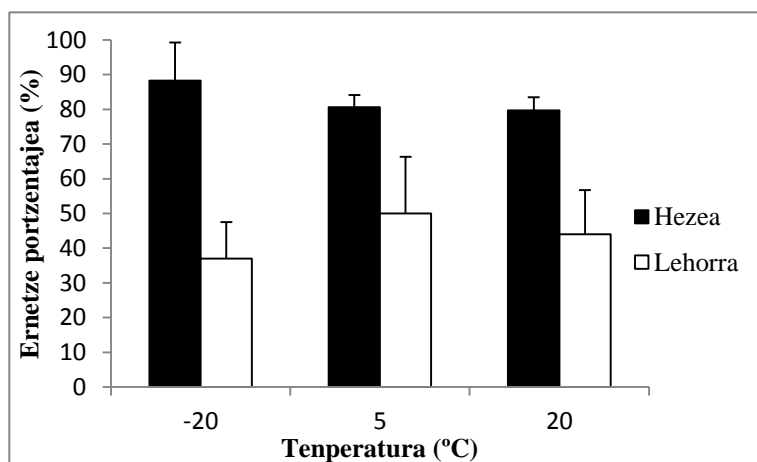
Menpeko aldagaia den ernetze portzentajearen eta aldagai finkoak diren biltegitatze mota eta tenperaturaren arteko erlazio lineal, erroreen banaketa normal eta bariantza konstantzia ezak, ikerketa honetan eredu linealaren bidezko analisisa egokia ez zela adierazi zuen. Portzentajeekin lan egitean ohikoak dira ezaugarri horiek. Arazo hau menpeko aldagaiaren transformazioa burutuz konpondu ohi

da baina ez da beti lortzen eta datuen interpretazioa zailtzen du. Honen ordez, MLG erabiltzea komeni da, datuak transformatzen baititu dagokion erroreen banaketa espezifikoan oinarrituta (Cayuela, 2010). Espezie bakoitzeko datuak estatistikoki analizatu ziren MLG (“Modelos Lineales Generalizados”) ereduaren bidez, erroreen banaketa binomiala eta funtzio-lotura “logit” zela adieraziz. Eredu honek lortutako datuak egokiro transformatzen zituela ziurtatu zen. Analisi estatistiko guztiak R programarekin burutu ziren.

EMAITZAK

Hiru espezieen esporen bideragarritasunean, biltegiratze motak eta tenperaturak duen eragina estatistikoki esangarria izan zen, baita biltegiratze-tenperatura interakzioa ere (denak $P < 0,01$, 2.,3. eta 4.Taulak, A). Salbuespen bakarra *T. palustris* izan zen, kasu honetan tenperaturak eragin esangarria izanik (2.Taula), eta gure hipotesia ez betez. Bi faktoreen arteko interakzioa esangarria izateak adierazten du tenperaturaren eragina desberdina dela biltegiratze mota bakoitzean.

T. palustris espeziearen bideragarritasuna hobe mantendu zen biltegiratze hezean (1.Irudia), izan ere biltegiratze lehorrak ernetze portzentajea esangarriki jaitsi zuen (2.Taula, B). Biltegiratze hezeko ernetze portzentajearen aldakortasuna lehorrekoa baino txikiagoa izan zen (1.Irudia). Baldintza lehorretan bideragarritasuna 5 eta 20°C-tan, -20°C-tan baino hobe mantendu zen esangarriki (2.Taula, B). Baldintza hezean, ordea, hiru tenperaturatan antzeko ernetzea lortu zen (1.Irudia). Esporak -20°C-tan mantendu ostean, gametofitoen garapena hasi zen, espezie honen esporen garatzea tenperatura honetan gainontzeko tenperaturetan baino azkarrago eman zela adieraziz. Hala ere, lehen aipatu bezala, tenperaturak ez zuen eragin esangarririk izan. Aztertutako faktoreek, emaitzen % 82,178 azaldu zuten (2.Taula, A), hau da, gehiena.



1.Irudia. *T. palustris* iratze espeziearen ernetze portzentajea (%) tenperatura (°C) eta biltegiratze heze eta lehorrean.

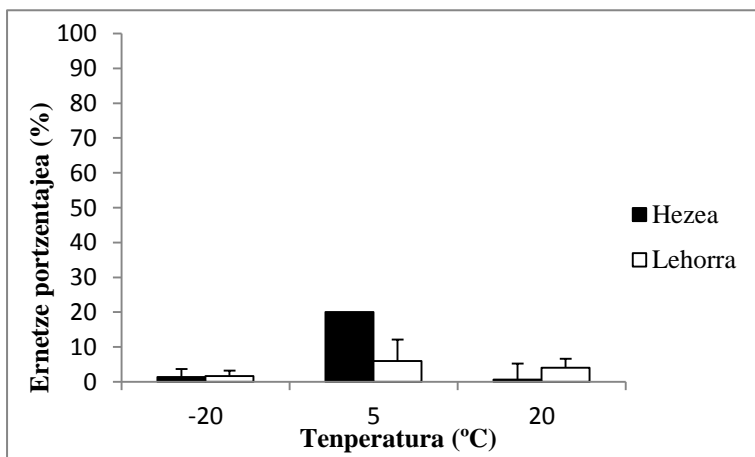
2.Taula. *T. palustris* espeziearen esporen ernetze portzentaje menpeko aldagaia eta “biltegitratze” eta “tenperatura” faktore finkoen ANOVA analisi estatistikoaren emaitzak (A) eta GLM analisisian lortutako parametroei buruzko emaitzak.

A				
	DH	Df	D ² (%)	P
NULL	401,93	17		
B	92,01	16	77,106	***
T	89,94	14	0,516	e.e.
B:T	71,63	12	4,554	***

B				
	PE	E. est.	z balioa	P
(Intercept)	2,024	0,179	11,256	***
B[T.L]	-2,557	0,216	-11,837	***
B[T.L]:T[T.5]	1,128	0,285	3,955	***
B[T.L]:T[T.20]	0,950	0,284	3,343	***

DH, Debiantza hondarra; Df, Askatasun gradua; D², Debiantza; B, biltegitratzea; T, tenperatura; L, lehorra; PE, parametroaren estima; E. est., errore estandarra; e.e., (P > 0,05); ·, (P < 0,1); *, (P < 0,05); **, (P < 0,01); ***, (P < 0,001)

D. submontana espeziearen esporen ernetzean eragin gehiena tenperaturak izan zuen (D² = 56,524, 3.Taula, A), 5°C-ko tenperaturan esangarriki ernetze portzentaje altuagoa izanez. Hain zuzen ere, -20 eta 20°C-tan ia ez zen esporarik ernatu (2.Irudia, 3.Taula,B). Baldintza lehorrak 5°C-tan ernetzea jaitzi zuen esangarriki; 20°C-tan, ordea, eman zen ernatze portzentajearen igoera ez zen esangarria izan (3.Taula, B). Espezie honen esporentzat -20°C-ko tenperatura ia hilkorra izan zen. Bideragarritasuna hoberen mantentzen zuen baldintza, hezea eta 5°C-koa zen, aldakortasun oso baxua izanez (2.Irudia). Orokorrean, ernetze portzentaje oso baxuak lortu ziren. Baldintza hezean kutsaduren agerpenak (onddoak), baldintza horretan emandako datu baxuak azalduko lituzke, lehorrekoak aldiz, ez. Aztertutako faktoreek emaitzen %78,786a azaldu zuten (3.Taula, A), gehiengoa, baina ernetze arrakastaren jaitzieran eragina izan zuen kanpo eragile ezezaguna egon zela ezin daiteke baztertu.



2.Irudia. *D. submontana* iratze espeziearen ernetze portzentajea (%) tenperatura (°C) eta biltegitratze heze eta lehorrean.

3.Taula. *D. submontana* espeziearen esporen ernetze portzentaje menpeko aldagai eta “biltegitratze” eta “tenperatura” aldagai finkoen ANOVA analisi estatistikoaren emaitzak (A) eta GLM analisisian lortutako parametroei buruzko emaitzak.

A

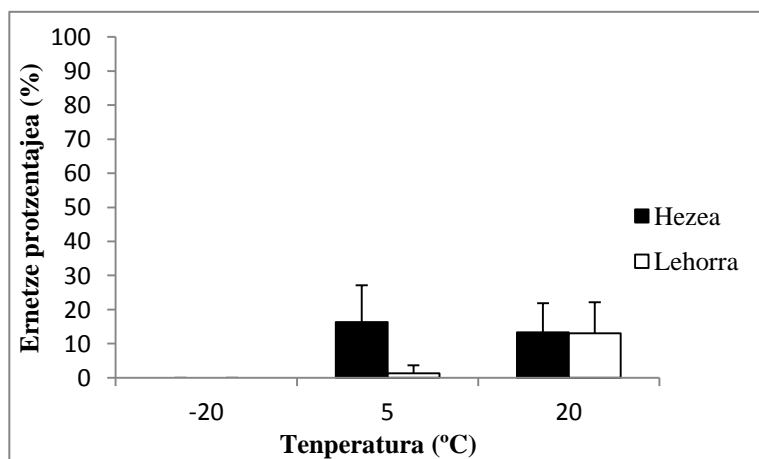
	DH	Df	D ² (%)	P
NULL	156,760	17		
B	146,524	16	6,529	**
T	57,916	14	56,524	***
B:T	33,255	12	15,732	***

B

	PE	E. est.	z balioa	P
(Intercept)	-4,304	0,503	-8,551	***
B[T.L]	0,227	0,675	0,335	e.e
T[T.5]	2,917	0,523	5,572	***
T[T.20]	-0,699	0,869	-0,805	e.e
B[T.L]:T[T.5]	-1,592	0,732	-2,173	*
B[T.L]:T[T.20]	1,599	1,023	1,563	e.e

DH, Debiantza hondarra; Df, Askatasun gradua; D², Debiantza; B, biltegitratzea; T, tenperatura; L, lehorra; PE, parametroaren estima; E. est., errore estandarra; e.e., (P > 0,05); ., (P < 0,1); *, (P < 0,05); **, (P < 0,01); ***, (P < 0,001).

C. macrocarpa espeziearen esporetan ere tenperaturak izan zuen eragin gehien ernetzean (D² = %53,196, 4.Taula), bi kontserbazio baldintzetan (lehorra eta hezea) -20°C-ko tenperatura hilgarria izanik (3.Irudia). Baldintza hezean ernetze portzentajea altuagoa izan zen, izan ere baldintza lehorrak ernetzea jaisten zuenaren joera eman zen, jaitsiera nabariena 5°C-etan emanaz (4.Taula,B). Bideragarritasuna, beraz, baldintza hezean 5 eta 20°C-tan mantendu zen hoberen. Orokorrean, ernetze portzentaje nahiko baxua lortu zen (3.Irudia). Aztertutako faktoreek emaitzen % 79,519 azaldu zuten (4.Taula, B).



3.Irudia. *C. macrocarpa* iratze espeziearen ernetze portzentajea (%) tenperatura (°C) eta biltegitratze heze eta lehorrean.

4.Taula. *C. macrocarpa* espeziearen esporen ernetze portzentaje menpeko aldagai eta “biltegitratze” eta “tenperatura” aldagai finkoen ANOVA analisi estatistikoaren emaitzak (A) eta GLM analisisian lortutako parametroei buruzko emaitzak.

A				
	DH	Df	D ² (%)	P
NULL	223,192	17		
B	205,551	16	7,903	***
T	86,761	14	53,196	***
B:T	56,371	12	13,616	***

B				
	PE	E. est.	z balioa	P
(Intercept)	-2,231E+01	2,450E+03	-0,009	e.e.
B[T.L.]	1,542E-08	3,464E+03	0,000	e.e.
T[T.5]	2,068E+01	2,450E+03	0,008	e.e.
T[T.20]	2,044E+01	2,450E+03	0,008	e.e.
B[T.L]:T[T.5]	-2,670E+00	3,454E+03	-0,001	e.e.
B[T.L]:T[T.20]	-2,916E-02	3,454E+03	0,000	e.e.

DH, Debiantza hondarra; Df, Askatasun gradua; D², Debiantza; B, biltegitratzea; T, tenperatura; L, lehorra; PE, parametroaren estima; E. est., errore estandarra; e.e., (P > 0,05); -, (P < 0,1); *, (P < 0,05); **, (P < 0,01); ***, (P < 0,001)

EZTABAIDA

Lan honen helburua Euskal Herriko 3 iratze mehatxaturen espora ez-klorofilikoen biltegitratze metodo optimoa zein den jakitea da, hiru iratze hauen esporak *ex situ* kontserbatzeko beharrezko informazio praktikoa lortzearen eta modu honetara esporak epe-ertainean gorde eta espezie hauen kontserbazio eta berreskuratze proiektuetan erabili ahal izateko.

Biltegitratze mota hezeak hilabete batez biltegitratuta egon diren esporen bideragarritasuna hobeto mantendu du lehorrak baino, baita gutxienez 12 edo 24 hilabetez bilduta egondakoenak ere (Aragon & Pangua, 2004; Quintanilla *et al.*, 2002). Epe motz edo ertainera kontserbatu nahi diren esporentzat biltegitratze mota hau kontsideratzen da egokiena, izan ere, esporak hidratatuak daudenean, DNA endekapena ekiditen duen zelulen konpontze-metabolismoa martxan jartzen da. Epe laburreko biltegitratzean abantaila dena, epe luzekoan desabantaila da, konstantea den gastu metabolikoak esporaren erreserba substantziak agortzen dituelako, espora azkenean hilez (Ballesteros, 2008b). Hala ere, eragotzi ezin diren arazoak suertatu daitezke baldintza hezeko biltegitratzean, hala nola, onddoen agerpena, ikerlan honetan *D. submontana* espeziean eman zen moduan. Hiru espezieen esporen bideragarritasuna baldintza hezeetan hobeto mantentzea ekologiarekin lotua egon daiteke, izan ere, iratze hidrofiloak dira, alegia, baldintza hezeetan hazten direnak. Ekologiak iratze esporen bideragarritasunean duen eragina ez dago argi, ikerketa batzuek ez baitute hauen arteko erlaziorik

aurkitu (Ballesteros *et al.*, 2004; Ballesteros *et al.*, 2012), baina beste batzuek berriz, bai (Aragon & Pangua, 2004). Hilabete batez soilik biltegitratuta egon ostean eman zen biltegitratze motaren arteko desberdintasun nabaria ekologiak azaltzen du. Denbora tarte laburregia da zeluletan emandako hondatzeak biltegitratze moten arteko aldea eragiteko. Hortaz, bigarren hipotesia baieztatu zen.

T. palustris iratzearen esporek -20°C -tan erretze portzentaje altua izan zuten eta emaitza hauek bat datoz Hill (1971) ikerketan lortu zirenekin. Tenperatura baxuetan tasa metabolikoa murriztu egiten da eta erreserben kontsumoa beste tenperatura altuagoetan baino baxuagoa denez, zelulen hondatze tasa motelagoa da. Hala ere, -20°C -ko tenperaturaren triazilglicerolen eta uraren kristalizazioa eman ohi da. Honek, zelulen pareta haustea eragiten du, esporak hilez (Aragon & Pangua, 2004; Ballesteros *et al.*, 2012; Quintanilla *et al.*, 2002), emaitzetan *D. submontana* eta *C. macrocarpa*-n ikusi zen moduan. Ballesteros & Walters (2007) egindako ikerketak proposatu zuen *T. palustris* espeziaren esporek xurgatzen duten ur kopurua tenperaturarekin gutxi aldatzen dela, estresaren aurrean substantzia hidrofiloak metatzen dituztelako, hala nola, azukreak eta proteina disolbagarriak. Honek zelula barruko urarekiko afinitate kimikoa emendatzen du. Ondorioz, esporak molekularki egonkor samarrak dira eta estresarekiko jasangarritasun altua dute. Horrela azaltzen da esporak tenperatura oso baxuetan bizirik jarraitzea. -20°C -tan bildutako esporek gainontzeko tenperaturatan baino erreserba gehiago dituztenez, baldintza hauetan soilik garatu ziren gametofitoak.

D. submontana espeziaren esporen bideragarritasuna baldintza hezeetan 5°C -tan mantendu zen hoberen, Quintanilla *et al.* (2002) lanak *Dryopteris* generoko hiru espezie esporekin proposatu zuen moduan. Emaitza hau bat dator Ballesteros & Walters (2007) lanean lortutakoarekin. *D. filix-mas* (L.) Schott espeziaren esporek xurgatzen duten ur kopurua tenperaturarekin asko aldatzen dela proposatu zen, alegia, estresarekiko jasankortasun baxua dutela. Tenperatura baxuetan ematen den esporen galeraz gain, hainbat lanetan ikusi da giro-tenperaturaren bideragarritasunaren galera esangarriki altuagoa dela 5°C -tan ematen dena baino (Ballesteros *et al.*, 2012, Ballesteros *et al.*, 2004). Hala ere, Ballesteros *et al.* (2012) ikerketak *D. filix-max* (L.) Schott espeziaren esporen %10a baino gutxiagoren bideragarritasuna hiru urtez mantentzea lortu zuen baldintza lehor eta giro-tenperaturaren. Esporak biltegitratuta egon beharreko debora-luzeraren arabera, metodo optimoa desberdina izango da, aurretik aipatutako esporen hidratazioak metabolismoan duen eraginagatik.

C. macrocarpa espeziaren esporek hilabete batez -20°C -tan bi biltegitratze motatan bideragarritasuna guztiz galtzeak eta orokorrean lortutako erretze portzentaje baxuak espezie honen esporen sentikortasunaren adierazle dira. Beste tenperaturetan, erretzea lehorrean hezean baino txikiagoa izan zen, beste ikerketetako emaitzek ere adierazi duten moduan (Quintanilla *et al.*, 2002). Baldintza lehorrean 20°C -tan esporen bideragarritasuna hezean baino altuagoa ematea ez zen esangarriki azaldu, baina hala ere, bibliografiara jotzen bada, espezie honen esporen bideragarritasuna lehorrean asko jaisten dela tenperatura guztietan proposatzen da (Quintanilla *et al.*, 2002).

Diseinuari dagokiola, lehenik eta behin, Ballesteros (2008a) lanak iratze ale desberdinen esporen batzea proposatzen du. Hainbat ikerketek (Ballesteros *et al.*, 2012; Quintanilla *et al.*, 2002), baita honek ere, metodo hau jarraitu duten arren, etorkizuneko ikerketek indibiduo desberdinen esporak bereiztea kontsideratu beharko lukete. Horrela, indibiduo mailako erantzunak duen eragina aztertu ahalko litzateke, populazio barruko erretze gaitasunaren aldakortasuna ezagutzea ahalbidetuz.

Ikerketa honetan esporen erretze portzentajea lortzeko erabili zen metodologia, alegia, zoriz 25 esporako multzoetan 200 esporen erretze arrakasta determinatzea, etorkizuneko ikerketetan ekiditea komeni da. Izan ere, analisi estatistikoak egiterako momentuak, arazoak sortu zituen. Zuzenean 100 espora zoriz 100 esporetako multzoetan determinatzea komeni da.

Etorkizunean kontuan hartu beharreko beste faktore garrantzitsu bat biltegiratutako esporen dentsitatea da, erretze portzentajearen eragina duelako, bideragarritasunaren balioztapena eraldatuz (Gabriel y Galán & Prada, 2010). Hala ere, zaila da determinatzen iratze esporen dentsitatea, tamaina oso txikia baitute eta egindako lan gehienetan ez da kontuan hartu (Aragon & Pangua, 2004; Ballesteros *et al.*, 2004; Ballesteros *et al.*, 2012; Delgado & Plaza, 2010; Pence, 2000; Quintanilla *et al.*, 2002).

Hainbat ikerketa egin dira genotipo eta adinak erretze portzentajearen duten eragina aztertzen dutenak. Autoreek baieztatu dute alo-poliplidizazioak ez duela eraginik esporen erretzean. Adinak ordea, erlazio zuzena eta positiboa du esporen bideragarritasunean (Gabriel y Galán & Prada, 2010), azkena kontuan hartu beharreko faktorea izanik.

Azken urteetan egindako lanek biltegiratze metodo desberdinak proposatu dituzte. Ikusita izozteak esporen heriotza eragiten duela (Ballesteros *et al.*, 2012), krio-biltegiratzea testatua izan da ikerketa desberdinetan. Ballesteros & Walters (2007) lanak proposatu zuen iratze espora gehienek egonkortasun molekularra lortzen dutela, esporak puntu zehatzera arte deshidratatu eta biltegiratze guneko hezetasun erlatiboaren kontrol zehatza burutzen bada. Horrela, urak sortzen dituen kristalak ekidin egingo dira, epe luzeko biltegiratzerako aukera zuzena eskainiz. Esporak biltegiratzeko, nitrogeno likidoan murgildu edo Ballesteros *et al.* (2012) lanak mikrobioen agerpena ekiditeko proposatu bezala, nitrogeno likidoaren lurrunean mantentzea da ikerketetan burutu dena. Metodo honek esporen bideragarritasuna murrizten ez duela testatu da (Ballesteros *et al.*, 2006; Ballesteros *et al.*, 2012; Pence, 2000). Epe laburreko biltegiratzea burutzeko ez da metodorik egokiena, ikerketan ikusi den moduan, errazagoak eta merkeagoak diren metodo funtzionalak daudelako. Epe luzerako biltegiratzean, aldiz, metodo hau oso komenigarria da bideragarritasuna ahalik eta luzean mantentzea baita helburua.

Hiru iratze espezieen esporen bideragarritasunean biltegiratze metodoak duen eragina, epe luzeagoan aztertu behar da, oso mugatua izan baita lanaren biltegiratze denbora (hilabete bat). Aurrerantzean, beharrezkoa izango da datu hauek biltegiratze denbora luzeagoan lortutakoekin

konparatzea. Horrela, denboran zehar emandako erretze portzentajearen joera eta esporek bideragarritasuna zenbatera galtzen duten jakin ahalko da.

ONDORIOAK

T. palustris-en esporen epe laburreko biltegitratze optimoa baldintza hezea dela, eta esporak duen tenperatura aldaketekiko jasangarritasuna dela eta, tenperatura desberdinetan erretze portzentaje altua lortuko dela ondoriozta daiteke. -20°C -tan gametofioak garatzeak adierazi du garapen-tasa tenperatura honetan gainontzekoetan baino azkarragoa dela. Galtzeko arriskuan dagoen iratze honen esporek *ex situ* kontserbatzeko baldintza zorrotzak behar ez izatea jakiteak, asko lagundu dezake kontserbazio eta errekuaratze lanetan. *D. submontana* espezieko esporen bideragarritasuna epe laburrean mantentzen duen biltegitratze metodo optimoa baldintza hezea 5°C -tan da, gainontzeko tenperaturetan ia ez baita esporarik erretu. *C. macrocarpa* iratze esporen bideragarritasuna baldintza hezean 5 eta 20°C -tan hilabete batez behintzat mantendu da, kontserbazio baldintza optimoa izanik. Deshidratazioarekiko sentikorra da eta ez da komeni baldintza lehorretan biltzea, ezta -20°C -ko tenperaturan mantentzea ere, azken hau hilkorra baita. Espezie hauetan biltegitratze optimoa eta ekologia erlazionatuak daude eta etorkizunean iratzeen *ex situ* kontserbazioa diseinatzerakoan, kontuan hartu beharreko faktorea da. Hiru espezieetan lortutako debiantza altuak baieztatzen du biltegitratze mota eta tenperatura direla esporen bizitza-luzeran eragin gehien duten faktoreak.

Beraz, hiru iratze espezieen esporen bideragarritasuna baldintza hezean eta 5°C -tan hilabetez mantentzen egokia dela jakiteak asko erraztu dezake *ex situ* kontserbazioa. Azterketak Euskal Herrian garrantzitsuak diren iratze espezie hauen esporen bankuak *ex situ* kontserbaziorako bide posible eta lagungarria eskaintzen duela erakusten du.

ESKERRONAK

Eskerrak eman nahi dizkiet Aranzadi Zientzia Elkarteko Botanika saileko Joseba Garmendia eta Leire Orejari, diseinu esperimentalean lagundu, metodologiari buruzko argibideak ematean eta lana hobetu duten iradokizunengatik, baita Gipuzkoako Foru Aldundiari esperimentua Fraisoro Ingurumen eta Nekazal Laborategian egitea posible egiteagatik ere, eta Arantza Aldezabali, analisi estatistikoekin laguntzeagatik eta izandako prestutasun eta disponibilitateagatik.

BIBLIOGRAFIA

Aizpuru, I., K. Álvarez, J. Balentzia, I. Biurrun, J.A. Campos, I. García, J. Garmendia, M. Herrera, L. Oreja, S. Patino, A. Prieto, I. Tamayo & P.M. Uribe-Echebarría. 2011. *Lista Roja de la Flora Vasculare de la CAPV*. Ingurumen, Lurralde Antolamendu, Nekazaritza eta Arrantza saila, Eusko Jaurlaritza. 348 pp.

Aragon C.F. & E. Pangua. 2004. Spore viability under different storage conditions in four rupicolous *Asplenium* L. taxa. *American Fern Journal*, 94(1):28-38.

Cayuela, L. 2010. Modelos lineales generalizados (GLM). Universidad de Granada.

Ballesteros, D. 2008a. Recolección de esporas *In* Bacchetta G., A. Bueno Sánchez, G. Fenu, B. Jiménez-Alfaro, E. Mattana, B. Piotto & M. Virevaire [eds.], *Conservación ex situ de plantas silvestres*, pp. 159-161, Principado de Asturias / La Caixa, Principado de Asturias.

Ballesteros, D. 2008b. Conservación *ex situ* de esporas de pteridofitos *In* Bacchetta G., A. Bueno Sánchez, G. Fenu, B. Jiménez-Alfaro, E. Mattana, B. Piotto & M. Virevaire, [eds.], *Conservación ex situ de plantas silvestres*, pp. 221-224, Principado de Asturias / La Caixa, Principado de Asturias.

Ballesteros, D. 2010. Conservation of fern spores *In* Kumar A., H.Fernandez & M.A. Revilla [eds.], *Working with Ferns: Issues and Applications*, pp. 165-172. Springer, New Yourk, USA.

Ballesteros, D., E. Estrelles & A. M. Ibars. 2006. Responses of Pteridophyte spores to ultrafreezing temperatures for long-term conservation in Germplasm Banks. *Fern Gazette*, 17(5), 293.

Ballesteros D., E. Estrellas, C. Walters & A.M. Ibars. 2012. Effect of temperature and desiccation on ex situ conservation of nongreen fern spores. *American Journal of Botany*, 99(4):721-729.

Ballesteros D., A.M Ibars. & E. Estrelles. 2004. New data about pteridophytic spore conservation in germplasm banks. *In 4th European conference on the conservation of wild plants. A workshop on the implementation of the global strategy for plant conservation in Europe*, Vol. 9, pp. 17-20.

Ballesteros D. & C. Walters. 2007. Water properties in fern spores: sorption characteristics relating to water affinity, glassy states, and storage stability. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 58, No. 5, pp. 1185-1196.

Delgado, A & L. Plaza. 2010. Helechos amenazados de Andalucía. *Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía*. 128 orr.

Eusko Jaurlaritza, 2011. AGINDUA, 2011ko urtarrilaren 10ekoa, Ingurumen, Lurralde Plangintza, Nekazaritza eta Arrantzako sailburuarena. Honen bidez, Basa eta Itsas Fauna eta Landaredian Arriskuan dauden Espezieen Euskadiko Zerrenda aldatzen da, eta testu bakarra onartzen. EHAA 2011ko otsailak 23, asteazkena, zk 37. 2011/973.

Gabriel y Galán J.M. & C. Prada. 2010. Pteridophyte spores viability *In* Kumar A., H. Hernandez & M.A. Revilla [eds.], *Working with Ferns: Issues and Applications*, pp. 193-205, Springer, New Yourk.

Garmendia, J., L. Oreja, M. Arrieta, M. Azpiroz, Y. Garcia, A. Mitxelena & L. Uriarte. Banco Vasco de Germoplasma Vegetal: conservación ex situ de la flora amenazada de la CAPV y del noreste de la Peninsula Ibérica. 2012. Infome inédito realizado para el Gobierno Vasco y las Diputaciones Forales de Araba- Álava, Bizkaia y Gipuzkoa. 43 pp.

Hill, R. H. 1971. Comparative habitat requirements for spore germination and prothallial growth of three ferns in southeastern Michigan. *American Fern Journal*, 61(4), 171.

Juslen, A., H. Vare & N. Wikstrom. 2011. Relationships and evolutionary origins of polyploid *Dryopteris* (Dryopteridaceae) from Europe inferred using nuclear *pgiC* and plastid *trnL-F* sequence data. *Taxon*, 60(5), 1284-1294.

Magrini S., C. Olmati, S. Onofri & A. Scoppola. 2010. Recovery of viable germplasm from herbarium specimens of *Osmunda regalis* L. *American Fern Journal*, 100: 3, pp. 159–166.

Nafarroako Gobernu Forala. 1997. Decreto Foral 94/1997, de 7 de abril, por el que se crea el Catálogo de la Flora Amenazada de Navarra y se adoptan medidas para la conservación de la flora silvestre catalogada B.O.N. núm. 47, de 18 de abril de 1997, págs. 2557-225.

Lloyd, R. M., & E. J. Klekowski. 1970. Spore germination and viability in Pteridophyta: evolutionary significance of chlorophyllous spores. *Biotropica*, pp. 129-137.

Pence, V. C. 2000. Survival of chlorophyllous and nonchlorophyllous fern spores through exposure to liquid nitrogen. *American Fern Journal*, pp. 119-126.

Quintanilla L.G., J. Amigo, E. Pangua & P. Pajaron. 2002. Effect of storage method on spore viability in five globally threatened fern species. *Annals of Botany*. 90(4):461-467.

Urtaran, N., M. Alustiza, O. Azkona & F. Korta. 2011a. *Euskal Herriko Natura aldizkaria*. *Ingurumenari buruzko berezia, galtzeko arriskuan dauden espezieak, espezie kalteberak eta interes bereziko espezieak*. Eusko Jaurlaritza, Kultura saila, zb. 57.

Urtaran, N., M. Alustiza, O. Azkona & F. Korta. 2011b. *Euskal Herriko Natura aldizkaria*. *Ingurumenari buruzko berezia, espezie bakanak, populazio txikiak eta bakartuak dituzten landareak*. Eusko Jaurlaritza, Kultura saila, zb. 65.