

**CONVENIO DE COLABORACION ENTRE EL MINISTERIO DE MEDIO
AMBIENTE Y EL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO DENOMINADO
“BANCO DE GERMOPLASMA DE ESPECIES DE FAUNA SILVESTRE
AMENAZADA”**

En Madrid, a de 2003

REUNIDOS

De una parte la Ilma. Sra. Dña. **INÉS GONZÁLEZ DONCEL**, Directora General de Conservación de la Naturaleza, según R.D. 894/2000 de 19 de Mayo, en nombre y representación del Ministerio de Medio Ambiente (en adelante MIMAM) en virtud de la Orden de Delegación de Atribuciones de 6 de Febrero de 2001 (B.O.E. de 14 de Febrero de 2001), con domicilio a efectos de notificaciones en la Gran Vía de San Francisco nº 4 de Madrid.

Y de otra el Excmo. Sr. D. **EMILIO LORA-TAMAYO D’OCON**, Presidente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (en adelante CSIC),

Se reconocen ambas partes con capacidad suficiente y poder bastante para este acto y

EXPONEN

Primero.- Que el MIMAM tiene institucionalmente asignadas competencias en el apoyo técnico de las medidas contempladas en los planes de recuperación y conservación de las especies de fauna silvestre incluidas en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas y en este marco acomete la creación de un banco de germoplasma para especies de fauna silvestre.

Segundo.- Que la Estrategia Española para la Conservación y el Uso Sostenible de la Diversidad Biológica establece que desde el campo de la investigación deben desarrollarse técnicas inocuas de recolección y de conservación ex situ de recursos biológicos autóctonos, principalmente de los amenazados y que como medidas de aplicación en este campo se consideran, entre otras la ampliación de la cobertura nacional y aumento de la capacidad de los bancos de germoplasma.

Tercero.- Que el Plan de Cría en Cautividad del Lince ibérico, aprobado por la Comisión Nacional de Protección de la Naturaleza el 8 de

febrero de 2001, establece la necesidad de crear un Banco de Recursos Genéticos con el fin de obtener la mayor representación de diversidad genética existente en las poblaciones silvestres de esta especie.

Cuarto.- Que el CSIC es un Organismo Público de Investigación de los previstos en la Ley 13/1986, de 14 de abril, de Fomento y Coordinación General de la Investigación Científica y Técnica que, por Ley 50/1998, de 30 de diciembre, ha sido adaptado a la categoría de Organismo Público previsto en la Ley 6/1997, de 14 de abril, de Organización y Funcionamiento de la Administración General del Estado (LOFAGE).

Quinto.- Que el CSIC, a través del Museo Nacional de Ciencias Naturales, ha venido desarrollando en los últimos años una importante línea de trabajo sobre recogida y conservación de muestras de germoplasma de especies silvestres de la fauna española y que gran parte de esta información resulta imprescindible para acometer con éxito el mencionado proyecto. Asimismo el CSIC ha desarrollado proyectos de gran relevancia sobre las especies catalogadas amenazadas, parte de cuyos resultados han servido de base para la elaboración de las estrategias nacionales para la conservación del Lince ibérico y del Oso pardo, y en consecuencia manifiesta su máximo interés en el estudio al que se ha hecho referencia en el punto anterior.

Quinto.- Que por tanto existe una concordancia de objetivos entre ambos organismos para la realización del mencionado proyecto, y por ello acuerdan suscribir el presente Convenio de Colaboración que se registrará por las siguientes

CLAUSULAS

Primera.- El presente convenio tiene por objeto la realización del proyecto denominado **“BANCO DE GERMOPLASMA DE ESPECIES DE FAUNA SILVESTRE AMENAZADA”**

Segunda.- El CSIC a través del Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN), se compromete a ejecutar el citado estudio de acuerdo con el plan de trabajo detallado en el Anexo técnico que acompaña al presente Convenio y del que forma parte inseparable.

Tercera.- El presente Convenio entrará en vigor en el momento de su firma y tendrá una duración máxima inicial hasta el 30 de noviembre de 2005, que podrá ser prorrogada por acuerdo expreso de ambas partes siempre que la investigación objeto del proyecto así lo aconseje.

Cuarta.- El importe total para la realización de este trabajo es de DOSCIENTOS SESENTA MIL (260.000) EUROS.

Quinta.- El CSIC a través del Museo Nacional de Ciencias Naturales aportará el personal científico, técnico y auxiliar que requiera la correcta ejecución del proyecto, espacio de trabajo y almacenamiento de muestras de material biológico, equipos e instrumental, vehículos de transporte, colecciones de consulta y la infraestructura de los servicios del centro que sean necesarios, además de correr a cargo de la divulgación del trabajo resultante, valorándose su aportación total en CIENTO TREINTA MIL (130.000) EUROS.

El MNCN podrá contratar asistencias técnicas o servicios así como conveniar con terceros, la ejecución de las actuaciones contempladas en el presente proyecto.

Sexta.- Como contraprestación para la realización del proyecto el MIMAM, a través de la Dirección General de Conservación de la Naturaleza (en adelante DGCN) se compromete a abonar al CSIC la cantidad de CIENTO TREINTA MIL (130.000) EUROS, incluidos impuestos en caso de que estos fueran de aplicación, con cargo a la aplicación presupuestaria 23.09.533A.640, de acuerdo al siguiente calendario:

- **Primer plazo.-** por un importe de DIEZ MIL EUROS (10.000 euros) a la firma del Convenio, a la entrega de una Memoria incluyendo el equipo técnico, plan de trabajo y una revisión bibliográfica de la situación del tema tal y como refleja el Anexo técnico.
- **Segundo plazo.-** por un importe de SESENTA MIL EUROS (60.000 euros) antes del 31 de Enero de 2004, y a la entrega de la segunda memoria parcial que recogerá los resultados del proyecto obtenidos hasta esa fecha, tal como se contempla en el Anexo técnico.
- **Tercer plazo.-** por un importe de CINCUENTA MIL EUROS (50.000 euros) antes del 31 de Enero de 2005, y a la entrega de una memoria que recogerá los resultados del proyecto obtenidos hasta esa fecha, tal como se contempla en el Anexo técnico.
- **Cuarto plazo.-** por un importe de DIEZ MIL EUROS (10.000 euros) y antes del 30 de noviembre de 2005, a la entrega de la memoria que recogerá los resultados del proyecto obtenidos, tal como se contempla en el Anexo técnico.

La entrega de los informes se realizará contra certificación expedida por la DGCN en la que quede constancia de su recepción.

Séptima.- El abono de dichas cantidades se hará efectivo en la cuenta restringida número 0049.5117.26.2310105161, abierta en el Banco Santander Central Hispano a nombre del CSIC-MNCN.

Octava.- Los derechos de la propiedad intelectual de la publicación resultante así como los derechos de explotación serán compartidos al 50% entre el CSIC y el Ministerio de Medio Ambiente. En cualquiera de los casos de difusión de resultados se hará siempre referencia especial al presente Convenio. Ambas partes se comprometen a no difundir, sin autorización de la otra parte, las informaciones científicas o técnicas obtenidas en el desarrollo del Proyecto de Investigación objeto de este Convenio.

Novena.- Serán causas de extinción del presente Convenio de colaboración el incumplimiento por alguna de las partes de cualquiera de sus cláusulas o del Anexo al mismo y la denuncia del Convenio por cualquiera de las partes que, deberá ser argumentada y notificada a la otra parte al menos con un mes de antelación.

Décima.- El CSIC, en la medida de su aportación, asumirá la cobertura de todas aquellas obligaciones relativas al personal que aporte para la ejecución de los trabajos previstos (Cláusula quinta) debiendo ser, asimismo, responsable de la cobertura de la responsabilidad civil en que pueda incurrir durante el desarrollo de los trabajos.

Undécima.- Por la DGCN se designará un Director Técnico del Proyecto, que en contacto con el Investigador Principal designado por el CSIC, como se indica en el Anexo técnico, estará debidamente informado de la marcha del trabajo.

Duodécima.- Los objetivos, finalidad y justificación del estudio en cuestión, así como la metodología a seguir para su elaboración y la forma de presentar los informes parciales y final, figuran en el Anexo a este convenio, que la entidad investigadora se compromete a cumplir.

Decimotercera.- Este convenio es de naturaleza administrativa y las cuestiones litigiosas que pudieran surgir en su interpretación y cumplimiento, serán de conocimiento y competencia del orden jurisdiccional contencioso-administrativo. Asimismo el presente Convenio está incluido dentro de los previstos en el artículo 3.1 c) del texto refundido de la Ley de Contratos de las Administraciones Públicas aprobado por Real Decreto Legislativo 2/2000 de 16 de junio, y por lo tanto, queda fuera de su ámbito de aplicación, sin perjuicio de aplicar los principios de esta Ley para resolver las dudas y lagunas que pudieran presentarse.

POR LA DIRECCIÓN GENERAL
DE CONSERVACIÓN DE LA
NATURALEZA

POR EL CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Fdo.: Inés González Doncel

Fdo.: Emilio Lora-Tamayo D'Ocon

ANEXO 1

PRESCRIPCIONES TÉCNICAS QUE REGIRÁN EL CONVENIO PARA EL PROYECTO: “BANCO DE GERMOPLASMA DE ESPECIES DE FAUNA SILVESTRE AMENAZADA ”

ANTECEDENTES

Los bancos de germoplasma permiten conservar la variabilidad genética que existe hoy en día y posibilitan el manejo genético de los recursos naturales (Ballou 1992, Wildt 1990, 1992). En los bancos de germoplasma se conserva semen, óvulos y embriones congelados que pueden ser utilizados durante muchos años. Así pues, la utilización de los gametos conservados en estos bancos permiten intercambiar material genético tanto entre poblaciones (ya sea en la naturaleza o en cautividad) como entre generaciones. De esta forma se mejora tanto la conservación *in situ* como la conservación *ex situ* al evitarse la pérdida de variabilidad genética y la consanguinidad, fenómenos habituales en especies amenazadas.

El intercambio de material genético entre poblaciones mediante el empleo de gametos se realiza de forma más económica que el intercambio de animales, se evitan los riesgos sanitarios asociados a la introducción de individuos en poblaciones diferentes y se elimina la necesidad de extraer un número elevado de individuos de poblaciones naturales bien para introducirlos en otras poblaciones, bien para iniciar programas de cría en cautividad.

Las muestras que entran a formar parte de un banco de germoplasma pueden obtenerse mediante electroeyaculación de animales vivos, o pueden proceder de animales muertos siempre que las muestras se obtengan poco tiempo después de la muerte del animal.

En otros países se han establecido bancos de germoplasma de especies silvestres en peligro de extinción y, aunque el progreso es lento, se ha demostrado la enorme utilidad de estos bancos tanto en programas de cría en cautividad como en el intercambio de recursos genéticos entre poblaciones naturales (Loskutoff 1998, Wildt 1992, 1995, 1997).

Además de germoplasma, es de interés conservar otros tipos de materiales biológicos de especies amenazadas que permitan, en el futuro, desarrollar e implementar otras tecnologías de conservación de especies, o llevar a cabo estudios de biología o patología. Diversos zoos o programas de cría en cautividad conservan fibroblastos (u otras células) congelados para posibles usos futuros en técnicas de clonación, estudios citogenéticos o moleculares, o suero y otros líquidos biológicos para estudios de patología.

La principal dificultad de crear un banco de germoplasma radica en la necesidad de conocer en profundidad la reproducción de la especie en cuestión. Puesto que a lo largo de la evolución las especies han divergido principalmente en los aspectos reproductivos, las diferencias entre especies en comportamiento y fisiología reproductiva son mucho mayores que en otros niveles (Roldán y Gomendio, 1992). Los intentos llevados a cabo hasta la fecha han demostrado hasta qué punto las técnicas de reproducción asistida y los protocolos de congelación varían de una especie a otra (Watson 2000; Roldán et al. 2002). Por ello, es fundamental llevar a cabo una primera etapa de investigación y puesta a punto de protocolos de congelación de semen, lo que constituye el principal objetivo de este Convenio.

La congelación del semen supone desafíos importantes (Arav et al. 2002, Medeiro et al. 2002). Los espermatozoides son células delicadas que para sobrevivir la criopreservación requieren ser deshidratados y rehidratados mediante el uso de crioprotectores específicos (productos que estabilizan las membranas celulares), y mediante unos procesos de enfriamiento y congelación que minimicen el daño que el hielo produce en la célula (Roldan et al. 1984, 2002). Por lo tanto, los protocolos de criopreservación deben de ser modificados y optimizados cuidadosamente para cada especie (Watson 1995, Wildt & Wemmer 1999). Cabe mencionar la gran variabilidad en las características del semen, incluido el número de espermatozoides producidos y eyaculados, la composición lipídica de las membranas de los espermatozoides, la susceptibilidad a la congelación, y la variabilidad en las condiciones que preparan a los espermatozoides para la fecundación, entre otros (Roldan 1996).

De todos modos, se ha utilizado con éxito el principio de los "modelos animales" con el fin de utilizar especies más conocidas de animales domésticos como punto de partida en el desarrollo de tecnologías de congelación de semen de especies silvestres (Leibo y Songsasen 2002). En este contexto, son bien conocidos los casos en los que se han utilizado protocolos de congelación de semen de bovino para ungulados silvestres, o de gato doméstico para felinos en peligro de extinción (Wildt 1990, 1992, 1995).

Por estas razones el presente proyecto propone desarrollar la investigación necesaria para identificar cuáles son los mejores procesos de crio-conservación para el semen de las especies que se deseen conservar en el banco de germoplasma.

OBJETIVOS

- Desarrollar la investigación necesaria para definir protocolos de crio-preservación de gametos en especies de mamíferos silvestres, con el objetivo de comenzar el establecimiento de un banco de germoplasma.
- Poner a punto técnicas de congelación de gametos que permitan preservar el patrimonio genético de especies de mamíferos silvestres amenazados.

- Conservar muestras que permitan desarrollar en el futuro programas de transferencia de germoplasma entre hábitats fragmentados, entre poblaciones naturales y programas de cría en cautividad, o en programas de reintroducción de especies.
- Poner a punto técnicas de recolección, transporte, cultivo y congelación de muestras de tejidos viables de especies de mamíferos silvestres con el fin de complementar el material biológico a conservar en el banco de germoplasma.
- Contribuir a la difusión de información sobre preservación de germoplasma de especies silvestres entre las Comunidades Autónomas y centros de cría en cautividad y rehabilitación de especies amenazadas.

DURACIÓN

La duración prevista será desde la firma del Convenio hasta el 30 de noviembre de 2005.

ÁMBITO TERRITORIAL

Todo el territorio nacional y donde se celebren reuniones internacionales.

DESCRIPCION DE LOS TRABAJOS

Material biológico a estudiar y a conservar

Se investigará la obtención y conservación de espermatozoides mediante criopreservación.

Se investigará la obtención, transporte en condiciones adecuadas, cultivo y crioconservación de tejidos (fibroblastos).

Priorización de las especies de mamíferos ibéricos

Las especies objeto de este Convenio son las incluidas en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas (en peligro de extinción, sensibles a la alteración de su hábitat o vulnerables). Dentro de este grupo se prestará especial atención a las especies en peligro de extinción y dentro de estas se consideran de máxima prioridad el lince ibérico, el visón europeo, el oso pardo y la foca monje. También serán de interés estudios sobre otras especies, como el ciervo ibérico, que, aunque no recogidas en el Catálogo Nacional, serán de enorme utilidad para investigar los efectos de la

variabilidad genética (un factor de riesgo muy importante en las especies amenazadas) sobre la criopreservación del semen.

En el caso de especies en peligro de extinción será poco aconsejable manipular individuos de poblaciones naturales con el objetivo de obtener gametos, aunque se prevé que las muestras podrán provenir de programas de cría en cautividad o de animales muertos en poblaciones naturales. Por ello, es difícil predecir el número de muestras con las que se podrá trabajar. Debido al número limitado de individuos y a la necesidad de minimizar las manipulaciones sobre ellos, en este caso será conveniente poner a punto protocolos de congelación en especies cercanas filogenéticamente. Así pues se propone que en el caso de las especies más amenazadas, como el lince ibérico, se inicien las investigaciones encaminadas a implementar protocolos de congelación adecuados en gato doméstico y en lince europeo, sin perjuicio de trabajar también con muestras de lince ibérico si estas se pueden obtener.

En los casos concretos del lince ibérico o el visón europeo se propone preservar germoplasma de individuos que formen parte de los programas de cría en cautividad.

Obtención de material biológico

La DGCN del MIMAM gestionará la obtención de muestras de especies amenazadas cuyos individuos se encuentran en programas de cría en cautividad, así como de animales muertos de poblaciones naturales.

Metodología a emplear

Obtención y evaluación de semen de felinos y mustélidos:

Cuando se obtenga material de animales muertos, los testículos serán transportados hasta el laboratorio a 4°C o a temperatura ambiente. Los espermatozoides se obtendrán a partir del epidídimo resuspendiéndolos en una solución salina (PBS con albúmina bovina, o medio de cultivo). En animales vivos, las muestras de semen se obtendrán mediante electroeyaculación bajo anestesia quirúrgica. Se evaluará (en semen fresco y en semen diluido en una solución de Tyrode modificada conteniendo albúmina bovina) la calidad de varios parámetros espermáticos: motilidad, viabilidad, concentración, integridad morfológica, integridad acrosómica y de membranas con una serie de pruebas de laboratorio.

Desarrollo de protocolos de congelación de semen de felinos y mustélidos:

Protocolos para *félidos*: Se examinarán diluyentes y métodos de almacenamiento del semen (pajuelas o píldoras), empleando inicialmente semen de gato doméstico, para implementar un protocolo adecuado de congelación de espermatozoides (Hewitt et al., 2002). Para el lince europeo (y el lince ibérico, en los casos en que sea posible) se evaluarán métodos empleados en gato doméstico y felinos silvestres. Se examinará el diluyente PDV-62 congelando en píldoras sobre nieve carbónica, o un diluyente de Tes-Tris (añadiendo el glicerol en una o dos etapas) y congelación en pajuelas sobre vapores de nitrógeno. En la medida de lo posible, se examinará el efecto del añadido

de azúcares (lactosa, rafinosa) sobre la criopreservación. Se evaluará el efecto de curvas de congelación empleando un biocongelador programable. El semen se descongelará y se evaluarán parámetros de calidad seminal para valorar supervivencia a la criopreservación. En el caso del semen conservado en píldoras se evaluará si la presencia o ausencia de glicerol durante la descongelación influye en la calidad del semen criopreservado.

Protocolos para mustélidos: Se han empleado diversas estrategias de criopreservación de semen de mustélidos (Howard et al., 2003) que servirán de base para nuestros ensayos con visión europeo, en los que también se podrá utilizar visión americano, u otros mustélidos, como modelo. Se utilizarán diluyentes tales como Tes-Tris (20% yema de huevo, 4% glicerol), PDV (20% yema, 4% glicerol, 11% lactosa) o BF5F (20% yema, 4% glicerol, 0.5% surfactante). Se evaluará el efecto de otros azúcares como fructosa y rafinosa. El glicerol se añadirá en una o dos fases y el semen se congelará en píldoras (sobre nieve carbónica) o envasado en pajuelas pequeñas. Se congelará también empleando un biocongelador programable.

Efecto de variabilidad genética sobre congelabilidad de semen de ungulados provenientes de poblaciones fragmentadas:

Con el fin de examinar si una baja variabilidad genética individual afecta negativamente a la congelabilidad del semen, se utilizará como modelo semen de ciervo ibérico. La variabilidad genética se examinará analizando 9 loci de microsatélites (Gomendio et al., 2002) en ciervos provenientes de poblaciones naturales. Se obtendrá el semen post-mortem a partir de epidídimos de esos mismos individuos. Para su congelación, las muestras se diluirán a temperatura ambiente en el diluyente comercial Triladyl, se refrigerarán, se envasarán en pajuelas de 0,25 ml (100×10^6 células/0,25ml) y serán congeladas sobre vapores de nitrógeno líquido y almacenadas en el mismo hasta su descongelación y evaluación (Garde et al., 1998b).

Obtención, cultivo y congelación de fibroblastos:

Se obtendrán, mediante biopsia en condiciones estériles, muestras de piel o trozos de oreja y se evaluarán condiciones de transporte al laboratorio (medio de cultivo, temperatura de transporte). Se colocarán trozos de piel u oreja en placa de cultivo y se incubará en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con L-glutamina, con 10% suero fetal bovino y antibióticos a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO₂/aire hasta que desarrollen los fibroblastos en el fondo de la placa y se vuelvan confluyentes. Se realizarán pasajes y se cultivará en idénticas condiciones realizando hasta un máximo de 3 pasajes (Spector et al., 1998). Se conservarán alícuotas de fibroblastos mediante congelación o vitrificación (del primer y tercer pasaje) y se almacenarán en nitrógeno líquido. Se examinará también la posibilidad de congelar directamente pequeños trozos de las muestras de piel (en medio de cultivo con dimetilsulfóxido), el transporte al laboratorio y la viabilidad de las muestras en un posterior cultivo celular.

RESULTADOS ESPERADOS Y CALENDARIO

Primer plazo (a la firma del convenio):

Entrega de memoria con revisión bibliográfica.

Segundo plazo (Enero 2004):

Resultados de los estudios de cultivo de fibroblastos: obtención, condiciones de transporte, cultivo y congelación.

Tercer plazo (Enero 2005):

Resultados parciales sobre congelación de semen de carnívoros: obtención de semen de animales vivos o muertos, evaluación de la supervivencia del semen a protocolos de congelación.

Resultados sobre congelación de semen de ungulados: efecto de la variabilidad genética sobre la congelabilidad del semen proveniente de individuos de poblaciones naturales de ciervo ibérico.

Cuarto plazo (a la finalización del convenio):

Resultados sobre congelación de semen de carnívoros: evaluación de la supervivencia del semen a nuevos protocolos de congelación.

De cada memoria se entregará una copia encuadernada y otra sin encuadernar, así como una versión en soporte informático.

SEDE DEL BANCO DE GERMOPLASMA

La sede principal del Banco será el Museo Nacional de Ciencias Naturales, que reúne las condiciones idóneas al contar con un Laboratorio de Fisiología, un Laboratorio de Biología Molecular, un Laboratorio de Histología y Servicios Generales. En el Laboratorio de Fisiología se cuenta con los medios necesarios para estudiar protocolos de congelación de semen y cultivo y criopreservación de tejidos viables, y en el Laboratorio de Biología Molecular se puede analizar el grado de variabilidad genética de las poblaciones a conservar.

Podrá haber sedes secundarias en otros laboratorios que realicen el mismo tipo de investigación y tengan un vínculo de colaboración directo con el MNCN.

EQUIPO DE INVESTIGACION

- Dr. Eduardo Roldan Schuth, será el investigador principal del proyecto.

Científico Titular del CSIC en el Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC).
Licenciado en Veterinaria y Doctor en Ciencias Biológicas (ambos por la Univ. de Buenos Aires y homologados por el Ministerio de Educación).
Visiting Scholar en la University of Hawaii (USA) y el AFRC Institute of Animal Physiology and Genetics Research, Cambridge (Gran Bretaña). Senior Research

Scientist en el Babraham Institute, Cambridge (Gran Bretaña). Investigador Contratado en el Depto. de Reproducción Animal y Recursos Zoogenéticos, INIA, Madrid.

Area de especialidad: Biología de la reproducción, principalmente referido a función y crioconservación de gametos de mamíferos.

• Dra. Montserrat Gomendio Kindelán

Investigador Científico del CSIC en el Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC). Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad Complutense de Madrid), Ph.D. (Univ. Cambridge, Gran Bretaña).

Research Fellow, Trinity Hall, University of Cambridge. Research Associate, University of Cambridge (Gran Bretaña).

Area de especialidad: Estrategias reproductoras, biología y evolución de gametos, mecanismos reproductivos en mamíferos.

• Dr Julián Garde López-Brea

Vice-Director del Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (CSIC).

Licenciado en Veterinaria y Doctor en Veterinaria (ambos por la Univ. Complutense de Madrid).

Becario predoctoral en el Depto. de Reproducción Animal y Recursos Zoogenéticos, INIA, Madrid. Becario post-doctoral en el Babraham Institute, Cambridge (G. Bretaña).

Profesor Titular de la Universidad de Castilla-La Mancha.

Area de especialidad: Biología de la reproducción, principalmente referido a función y crioconservación de gametos de mamíferos.

BIBLIOGRAFIA

Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H (2002) New trends in gamete's cryopreservation. *Mol. Cell.Endocr.* **187**, 77-81.

Ballou JD (1992) Potential contribution of cryopreserved germ plasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. *Cryobiology* **29**, 19-25.

Garde JJ, Ortiz N, García A, Gallego L, Landete-Castillejos T, López A (1998a) Post-mortem assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. *Arch Andrology* 41:195-202.

Garde JJ, Ortiz N, García AJ, López A, Gallego L (1998b) Criopreservación post-mortem de material espermático e inseminación artificial en el ciervo ibérico. *Arch Zootec* 47: 351-356.

Gomendio M, Malo A, Rey I, Garde JJ, Soler AJ, Roldan ERS (2002) Variabilidad genética en poblaciones cinegéticas de ciervo ibérico: sus efectos sobre la calidad de la cornamenta y la calidad reproductiva de los machos. *IX Congreso Nacional y VI Iberoamericano de Etología, Madrid, 17-20 Septiembre 2002.*

- Hewitt DA, England GCW, Beekman SPA (2002) Cryopreservation of gametes and embryos of Canidae and Felidae. En: *Cryobanking the Genetic Resource*. Watson PF, Holt WV, eds. Taylor & Francis, London, pp. 361-389.
- Howard JG, Marinari PE, Wildt DE (2003) Black-footed ferret: model for assisted reproductive technologies contributing to *in situ* conservation. En: *Reproductive Science and Integrated Conservation*. Holt WV, Pickard AR, Rodger JC, Wildt DE, eds. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 249-266.
- Leibo SP, Songsasen N (2002) Cryopreservation of gametes and embryos. *Theriogenology* **57**, 303-326.
- Medeiro CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL (2002) Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology* **57**, 327-344.
- Loskutoff NM (1998) Biology, technology and strategy of genetic resource banking in conservation programs for wildlife. En: *Gametes: Development and Function*. Lauria A, Gandolfi F, Enne G, Gianaroli L, eds. Serono Symposia, Roma, pp. 275-286.
- Roldan ERS (1996) Preparación de los espermatozoides para la fecundación en mamíferos. En: *Nuevas Técnicas de Reproducción Asistida Aplicadas a la Producción Animal*. Garde JJ, Gallego L, eds. Universidad de Castilla-La Mancha, Cuenca, pp. 11-29.
- Roldan ERS, Soler AJ, Crespo C, Malo AF, Espeso G, Gomendio M, Garde J (2002) Semen cryopreservation in endangered gazelles. En: *Proceedings of the 9th International Symposium on Spermatology*. van der horst G et al., eds. Monduzzi Editore, Bologna, pp. 139-142.
- Roldan ERS, Gomendio M (1992) Morphological, functional and biochemical changes underlying the preparation and selection of fertilising spermatozoa in vivo. *Anim. Reprod. Sci.* **28**, 69-78.
- Roldan ERS, Roldan RR, Delhon GA, Merani MS, von Lawzewitsch I (1984) Utilización de la fecundación in vitro interespecífica en la evaluación de la fertilidad del semen bovino congelado en 'pastillas'. *Rev. Med. Vet.* **65**, 116-134.
- Spector DL, Goldman, RD, Leinwand LA (eds.) (1998) *Cells. A laboratory manual. Vol 1: Culture and biochemical analysis of cells*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Watson PF (1995) Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thaw function. *Reprod. Dev. Fert.* **7**, 871-891.
- Watson PF (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* **60-61**, 481-492.
- Wildt DE (1990) Potential applications of IVF technology for species conservation. En: *Fertilization in Mammals*. Bavister, BD, Cummins JM, Roldan ERS, eds. Serono Symposia, Norwell, MA, pp. 349-364.

- Wildt DE (1992) Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. *Anim. Reprod. Sci.* **28**, 247-257.
- Wildt DE (1995) Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. *Reprod. Fert. Dev.* **7**, 811-824.
- Wildt DE (1997) Genome resource banking. Impact on biotic conservation and society. En: *Reproductive Tissue Banking*. Academic Press, New York, pp. 399-439.
- Wildt DE, Wemmer C (1999) Sex and wildlife: the role of reproductive science in conservation. *Biodiv. Conserv.* **8**, 965-976.

ANEXO 2

PRESUPUESTO

Aportaciones del CSIC Total: 130.000 euros

La valoración económica de las aportaciones del CSIC se ha realizado mediante (a) cuantificación económica del tiempo de dedicación de personal investigador y (b) estimación del coste económico por el uso de instalaciones.

El personal participante incluye a: Eduardo Roldán Schuth (MNCN), Montserrat Gomendio Kindelan (CSIC), y Julián Garde López-Brea (Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, IREC).

El uso de instalaciones incluye el espacio y los equipos de los Laboratorios de Fisiología, Biología Molecular, e Histología, Servicios Generales, y áreas comunes de almacenamiento del MNCN.

Aportaciones del MIMAM Total: 130.000 euros

- Gastos de personal eventual

Contratación por 26 meses de un Titulado Superior con dedicación a tiempo completo para realizar trabajo de laboratorio consistente en la recolección, evaluación y criopreservación de muestras de germoplasma y cultivo de tejidos.

Titulado superior (37.5 h/semana): 30.000 euros/año x 26 meses = 65.000 euros

Total Gastos de Personal..... 65.000 euros

- Gastos de pequeño equipo

Adquisición de:

1 Tanque de conservación de muestras con base y alarma: 3.500 euros

1 Tanque de transporte de muestras: 2.000 euros

Sub-total 5.500 euros

- Gastos de funcionamiento

Fungible:

Reactivos generales de laboratorio, material de vidrio y plástico desechable, material para congelación de semen, nitrógeno líquido.

Sub-total: 25.000 euros

Dietas:

Viajes para obtención de muestras, reuniones de coordinación, asistencia a reunión nacional o internacional, viajes para adquisición de tecnología.

Sub-total: 22.150 euros

Total Equipo y Gastos de Funcionamiento..... 52.650 euros

• Costes indirectos (sobre Equipo y Gastos de Funcionamiento)
(costes indirectos: 19% de 65.000 € = 12.350 €)
Total Costes Indirectos..... 12.350 euros

TOTAL APORTACION MIMAM..... 130.000 EUROS