

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL
MEDI NATURAL



Optimización del periodo de almacenamiento de las semillas de cuatro especies dunares.

Trabajo Final de Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

Autora: Anna Deusa Miret

Tutora: Mónica Tereza Boscaiu Neagu

Cotutora: María del Pilar Donat Torres

Cotutor colaborador: Francisco Collado Rosique

Valencia, 24 de Julio de 2018

Resumen:

La Oficina Técnica del Saler gestiona un banco de semillas "activo" destinado al almacenamiento a corto plazo a temperatura ambiente de semillas pertenecientes a especies de interés para los programas de conservación desarrollados en el Parc Natural de l'Albufera. Un tema de gran interés es establecer el tiempo óptimo de almacenamiento para cada especie incluida en el banco. En este trabajo se ha analizado la capacidad de germinación *ex situ* de semillas recogidas en diferentes años en la zona dunar de la playa de El Saler pertenecientes a cuatro especies psamófilas (*Pancratium maritimum*, *Medicago marina*, *Lotus creticus* y *Malcolmia littorea*) mediante diferentes ensayos, sometidas a diferentes condiciones ambientales y tratamientos.

Todas las especies estudiadas han mostrado germinación; la especie *Lotus creticus* ha mostrado una mayor capacidad germinativa, frente a *Malcolmia littorea* y *Pancratium maritimum* que han perdido su capacidad de germinación en los años anteriores a 2003, éste incluido. En el caso de *Medicago marina* no ha perdido la capacidad de germinación en los años anteriores a 2003, pero aún así no ha resultado tan elevada como en el caso de *Lotus creticus*.

Palabras clave: Protocolo de germinación, viabilidad, semillas, *Pancratium maritimum*, *Medicago marina*, *Lotus creticus*, *Malcolmia littorea*.

Summary:

The Technical Office of Saler manages an "active" seed bank for the short-term storage at room temperature of seeds belonging to species of interest for the conservation programs developed in the Albufera Natural Park. A topic of great interest is to establish the optimum storage time for each species included in the Bank. In this work we have analyzed the ability of *ex situ* germination of seeds collected in different years in the dune zone of the beach of El Saler belonging to four psamophyle species (*Pancratium maritimum*, *Medicago marina*, *Lotus creticus* and *Malcolmia littorea*). The germination capacity has been determined through different tests, varying the environmental conditions and the treatments carried out on the seeds.

All the species studied germinated well, but the species *Lotus creticus* has shown a greater germination capacity, compared to *Malcolmia littorea* and *Pancratium maritimum* that have lost their germination capacity in the years before 2003, this included. *Medicago marina* has not lost the ability to germinate in the years before 2003, but it still has not been as high as in the case of *Lotus creticus*.

Keywords: Germination protocol, viability, seeds, *Pancratium maritimum*, *Medicago marina*, *Lotus creticus*, *Malcolmia littorea*.

Autor del TFG/M: Ana Deusa Miret.

Localidad y fecha: Gandía, 24 de Julio de 2018

Tutor Académico: Prof. Dña. Mónica Tereza Boscaiu.

Cotutor: Prof. Dña. María del Pilar Donat Torres.

Cotutor colaborador: D. Francisco Collado Rosique.

Agradecimientos:

A mis tutoras Dña. Mónica Boscaiu y Dña. Pilar Donat y cotutor D. Francisco Collado, por toda la ayuda y apoyo prestados.

Índice

Índice	1
1. Introducción	2
1.1 Objetivos	3
2. Descripción de la zona de recolección de las semillas	3
2.1 Características bioclimáticas	4
3. Descripción de las especies	5
3.1 <i>Malcolmia littorea</i> (L.) W.T.Aiton	5
3.2 <i>Medicago marina</i> L.....	5
3.3 <i>Lotus creticus</i> L.	6
3.4 <i>Pancratium maritimum</i> L.....	6
4. Metodología.....	7
4.1 Ensayos previos	7
4.1.1 <i>Malcolmia littorea</i>	8
4.1.2 <i>Lotus creticus</i>	8
4.1.3 <i>Medicago marina</i>	9
4.1.4 <i>Pancratium maritimum</i>	10
4.2 Tratamiento estadístico	10
4.3 Prueba del tetrazolio	11
5. Resultados y discusión	12
5.1 Elección del tratamiento: Resultados de los tratamientos previos.	12
5.1.1 <i>Malcolmia littorea</i>	12
5.1.2 <i>Lotus creticus</i>	13
5.1.3 <i>Medicago marina</i>	14
5.1.4 <i>Pancratium maritimum</i>	15
5.1.5 Resultados de la afección con moho.....	17
5.2 Resultados de las siembras definitivas.....	19
5.2.1 <i>Malcolmia littorea</i>	19
5.2.2 <i>Lotus creticus</i>	22
5.2.3 <i>Medicago marina</i>	26
5.2.4 <i>Pancratium maritimum</i>	30
5.2.5 Resultados de la prueba del tetrazolio.....	33
6. Conclusiones.....	34
7. Bibliografía	36

1. Introducción

Los ecosistemas dunares son una zona de transición entre las playas arenosas y las dunas litorales interiores; su principal característica es que son similares a lo largo de las costas de toda la península, además de que albergan una fauna y flora específicas y adaptadas a las condiciones en las que viven.

Estos ecosistemas, son complejos y necesarios para la conservación de las costas, y han sido degradados por la actividad humana. Sólo el 40% de la costa española presenta ecosistemas dunares, y de ésta sólo un 55% permanecen en estado natural (Ibero-Rest, 2011).

En 1992, la Comisión Europea promulgó la Directiva 92/43/CEE, conocida como la “Directiva de Hábitats” (European Commission, The Habitats Directive, 2016), sobre conservación de hábitats naturales y seminaturales y flora y fauna autóctona. Las dunas de la playa de El Saler están incluidas dentro de los hábitats Dunas marítimas y continentales, en el subgrupo Dunas marítimas de las costas mediterráneas, y referenciadas como 2210 Dunas fijas de litoral del *Crucianellion maritimae* y 2230 Dunas con céspedes de *Malcomietalia*. Se incluyó también el Parc Natural de l’Albufera dentro del grupo Hábitat costero y vegetación halófila, en el subgrupo Aguas marinas y medios de marea y referenciándolo como 1150 Lagunas costeras; también está incluido dentro de la Red Natura 2000 como zona ZEPA (Zonas de Especial Protección para las Aves) y como LIC (Lugares de Interés Comunitario) (Bartolomé *et al.*, 2005).

En la protección de los ecosistemas dunares un punto central es la conservación de su fauna y flora características. La conservación de especies vegetales en la Comunidad Valenciana (España) se ha llevado a cabo utilizando un enfoque integrado desarrollado a lo largo de varias décadas. La estrategia de conservación incluye componentes *in situ* y *ex situ*, aplicados en una serie de pasos (Ferrer-Gallego *et al.*, 2013). Mientras las actividades *in situ* se centran en la detección de amenazas, evaluación de la situación real en poblaciones naturales, búsqueda de nuevos individuos, entre otros aspectos, la conservación *ex situ* se implementa mediante la conservación del material biológico a través de bancos de germoplasma. El banco de semillas del Parc Natural de l’Albufera comenzó como un vivero simple para la producción del material vegetal necesario para la restauración de la cubierta vegetal pero a lo largo del tiempo, el número de especies almacenadas ha aumentado hasta llegar a más de 170 en la actualidad (Forte Gil *et al.*, 2017), para abordar también la conservación de la diversidad genética local. Como las semillas se utilizan principalmente para producir plantas para el refuerzo de las poblaciones naturales, la preservación no está destinada a periodos prolongados y las semillas se almacenan a temperatura ambiente. Por esta razón, la viabilidad de las semillas se reduce con el tiempo mucho más rápido que un banco de germoplasma a largo plazo, donde las semillas se almacenan a bajas temperaturas. En el caso del Banco del Parque de l’Albufera las recolecciones del material vegetal se repiten anualmente y numerosas accesiones de cada especie se van acumulando en un espacio de almacenamiento limitado. Por este motivo el estudio sistemático de la pérdida de viabilidad de las semillas en diferentes especies es una herramienta importante para eliminar aquellas accesiones que presentan una baja viabilidad y ocupan espacio de almacenamiento.

1.1 Objetivos

El objetivo de este trabajo es la optimización de los protocolos de germinación y estudio de la viabilidad de las semillas de diferentes años pertenecientes a cuatro especies del ecosistema dunar de El Saler, y almacenadas en el banco de semillas. Las semillas almacenadas en el banco de semillas del Parc Natural de l'Albufera, al ser mantenidas a temperatura ambiente tienen muchas veces contaminaciones por hongos. Por este motivo la optimización de los protocolos de germinación consiste en este caso en establecer una metodología idónea, que permita la disminución o eliminación completa de la contaminación fúngica y al mismo tiempo el mantener un elevado porcentaje de germinación. Por otro lado, para la gestión del banco de semillas es fundamental conocer la viabilidad de las colecciones de semillas, estimadas por ensayos de germinación de los lotes de cada uno de los años en los que se han recolectado, ya que éstas pueden perder su poder de germinación o entrar en estado de dormancia.

Las semillas utilizadas han sido de las especies *Pancratium maritimum* L., *Medicago marina* L., *Lotus creticus* L. y *Malcolmia littorea* (L.) W.T.Aiton.

2. Descripción de la zona de recolección de las semillas

El Saler es una playa que está situada dentro del Parc Natural de l'Albufera (Valencia), forma una barrera arenosa que a lo largo de 10 km se extiende al sur de la ciudad de Valencia (Costa, 1980).

Tiene una longitud de aproximadamente 6 km de largo por 1 km de ancho y está poblado de matorrales y pinos mediterráneos (*Pinus halepensis* Mill. y *Pinus pinea* L. sobre todo), se considera un espacio natural complejo compuesto por varios ecosistemas.

El Saler está formado por dos grandes conjuntos dunares que cabe diferenciar:

– El cordón dunar paralelo y cercano al mar, poblado por vegetación herbácea, gramíneas y plantas de porte rastroso típicas de zonas con alta salinidad, escasez de agua y vientos con acción abrasiva. Las especies que podemos encontrar son, entre otras: *Cakile maritima* Scop., *Ammophila arenaria* (L.) Link, *Medicago marina*, *Lotus creticus*, *Malcolmia littorea* y *Pancratium maritimum*.

– Cordón dunar interior, más cercano a la Albufera, de altura inferior al cordón dunar que se encuentra más cercano al mar y una morfología más simétrica. Esta morfología es debida a que este cordón dunar es más antiguo y se ha fijado en él una vegetación densa con un estrato arbóreo (Deusa, 2010).

– Entre los dos conjuntos dunares se encuentra la zona de las malladas; esta zona se caracteriza por tener suelos poco permeables, y es aquí donde las dunas drenan las aguas de las lluvias, que ocurren sobre todo en primavera y otoño, que junto a la proximidad del nivel freático provoca que aparezcan zonas pantanosas y algunas charcas donde crece una vegetación compuesta mayoritariamente por plantas crasas y juncos. Esta zona de malladas

(junto a toda la Dehesa de El Saler) ha sufrido graves procesos de degradación antrópica (www.laalbufera.com, 2009).

2.1 Características bioclimáticas

Según la clasificación de Rivas-Martínez, la zona de estudio tiene un clima mediterráneo pluviestacional-oceánico (Figura 1) y se encuentra dentro del piso termomediterráneo superior semiárido. En el siguiente gráfico se reflejan las características del clima (Globalbioclimatics, 2015).

VALENCIA (ESP VALENCIA) Altitude: 13 m.

Latitude: 39° 29'N Longitude: 0° 23'W
 Temperature observation period.: 1951-1990 (40)
 Rainfall observation period....: 1861-1990 (130)

(C/mm)	Ti	Mi	mi	M'i	m'i	Pi	EPI
Jan.	10.96	15.83	6.08	0.00	0.00	32.3	23.26
Feb.	11.60	19.76	3.19	0.00	0.00	30.3	25.47
Mar.	13.45	19.11	7.74	0.00	0.00	33.9	40.78
Apr.	15.20	18.02	12.18	0.00	0.00	35.2	54.31
May.	18.37	22.95	13.85	0.00	0.00	34.9	85.47
Jun.	21.52	26.15	17.05	0.00	0.00	22.4	114.64
Jul.	24.44	27.65	21.15	0.00	0.00	8.7	146.55
Aug.	24.89	27.03	22.48	0.00	0.00	14.9	141.84
Sep.	22.74	27.54	18.11	0.00	0.00	63.8	106.21
Oct.	18.78	24.75	13.05	0.00	0.00	96.3	69.42
Nov.	14.48	18.50	10.70	0.00	0.00	53.6	38.00
Dec.	11.79	20.34	3.11	0.00	0.00	41.6	25.60
Year	17.35	22.30	12.39	0.00	0.00	468	871.56

BIOCLIMATIC INDICES AND DIAGNOSIS

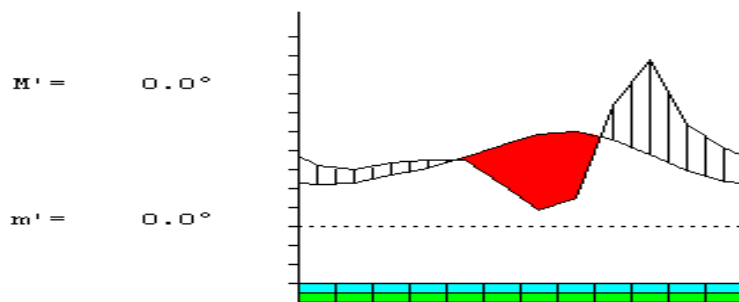
Thermicity index.....(It):	393
Compensated thermicity index.....(Itc):	393
Simple continentality index.....(Ic):	13.9
Diurnality index.....(Id):	17.2
Annual ombrothermic index.....(Io):	2.25
Monthly estival ombrothermic index.....(Ios1):	0.35
Bimonthly estival ombrothermic index.....(Ios2):	0.48
Threemonthly estival ombrothermic index.....(Ios3):	0.65
Fourmonthly estival ombrothermic index.....(Ios4):	0.91
Annual ombro-evaporation index.....(Ioe):	0.54
Annual positive temperature.....(Tp):	2082
Annual negative temperature.....(Tn):	0
Estival temperature.....(Ts):	709
Positive precipitation.....(Pp):	468

N. of Months	P>4T	P:2T-4T	PT-2T	P<T	T<0
	1	7	2	2	0

Latitudinal Belt....: Low eutemperate
 Continentality.....: Oceanic - Low Semihyperoceanic
 Bioclimate.....: MEDITERRANEAN PLUVISEASONAL-OCEANIC
 Bioclimatic belt....: UPPER THERMOMEDITERRANEAN LOW DRY

VALENCIA (ESP VALENCIA) 13 m

P=	468	39° 29'N	0° 23'W	40/130 y.
T=	17.4 °	Ic= 13.9	Tp= 2082	Tn= 0
m=	6.1 °	M= 15.8 °	Itc= 393	Io= 2.2



MEDITERRANEAN PLUVISEASONAL-OCEANIC
UPPER THERMOMEDITERRANEAN LOW DRY

Figura 1. Datos bioclimáticos de la zona de estudio (fuente: Globalbioclimatics, www.globalbioclimatics.org)

3. Descripción de las especies

3.1 *Malcolmia littorea* (L.) W.T.Aiton

Pertenece a la familia de las crucíferas. Su nombre común es alhelí marino, se caracteriza por ser una planta perenne, leñosa en la base y tallos erectos, racimos con 5-20 flores (Figura 2) y semillas ovoides de 0,7-1,2x0,4-0,7 mm (Figura 3) (<http://www.floraiberica.org/>, 5/06/2018)

Esta especie es colonizadora de ecosistemas dunares y es característica de dunas fijas (Pérez, 2015), la época de producción de semillas es en primavera-verano.



Figura 2. *Malcolmia littorea*



Figura 3. Semillas de *Malcolmia littorea*.

3.2 *Medicago marina* L.

Pertenece a la familia de las leguminosas. Su nombre común se trébol marino, se caracteriza por ser una especie perenne, lignificada en la base y con raíz profunda, flores en racimos, de 5 a 15 flores de color amarillo (Figura 4) con semillas reniformes y lisas (Figura 5). (<http://www.floraiberica.org/>, 5/06/2018).

Es una especie dunar, de carácter heliófilo y poco resistente a temperaturas extremas, sobre todo a las heladas (Herranz, 2015), la época de producción de semillas es en primavera-verano.



Figura 4. *Medicago marina* (fuente: flora vascular, <https://www.floravascular.com>)

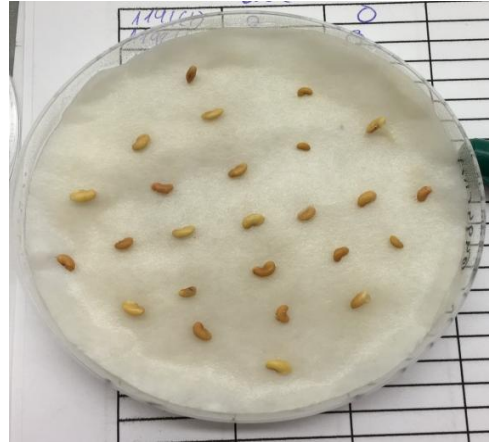


Figura 5. Semillas de *Medicago marina*

3.3 *Lotus creticus* L.

Pertenece a la familia de las leguminosas. Su nombre común es cuernecillo de mar, se caracteriza por ser una hierba perenne, densamente seríceo con tallos ramificados. Las inflorescencias tienen de 2 a 7 flores amarillas y una bráctea con 1-3 foliolos (Figura 6), las semillas son globosas y miden de 1,5 a 1,8 mm (Figura 7) (<http://www.floraiberica.org/>, 5/06/2018).

Esta especie es colonizadora principalmente de dunas móviles o del primer cordón dunar (Olmos, 2014), la época de producción de semillas es en primavera-verano.



Figura 6. *Lotus creticus*

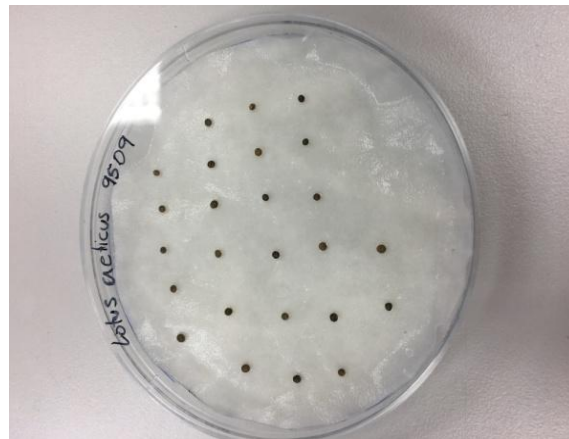


Figura 7. Semillas de *Lotus creticus*

3.4 *Pancratium maritimum* L.

Pertenece a la familia de las amarilidáceas. Su nombre común es azucena de mar; se caracteriza por ser una especie bulbosa con flores blancas, sésiles, de 2 a 9 por planta (Figura 8), tiene pocas semillas en cada lóculo del fruto, miden de 9-15,2x7-9,5 mm, son angulosas, negras, lisas y brillantes con la testa esponjosa (Figura 9) (<http://www.floraiberica.org/>, 5/06/2018).

Es una especie dunar que necesita mucho calor, no soporta la sombra, su fruto es muy ligero y flota en el agua, lo que le permite, cuando hay tempestades, colonizar nuevos ecosistemas (Herranz, 2015); la época de producción de semillas es en primavera-verano.



Figura 8. *Pancratium maritimum*

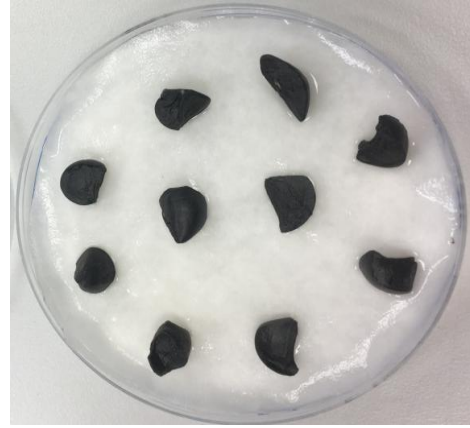


Figura 9. Semillas de *Pancratium maritimum*

4. Metodología

4.1 Ensayos previos

Para establecer unas condiciones de siembra que dieran una germinación aceptable se han realizado diferentes experimentos siguiendo la metodología utilizada en diferentes publicaciones y variando las condiciones para obtener mejores resultados (Bacchetta *et al.*, 2015; Ballestri *et al.*, 2004; Devitis *et al.*, 2014; Rejjili *et al.*, 2009).

Para ello se preparó una cámara de germinación con las siguientes condiciones:

- Temperatura: 20 °C
- Humedad: 65-70%

Las semillas se sembraban en placas petri, que se preparaban con una capa de algodón, dos capas de papel de filtro y 20 mL de agua. Se sembraban 20 o 25 semillas según tratamiento y especie y se realizaban 4 réplicas de cada uno, realizando un conteo diario.

Para efectuar las pruebas previas se han seleccionado semillas de diferentes años para realizar los diferentes tratamientos experimentales, esto es debido a que la disponibilidad de éstas era limitada.

Los tratamientos utilizados, para las diferentes especies, son los siguientes:

4.1.1 *Malcolmia littorea*

<p>- Tratamiento 1 (T1):</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Desinfección con NaClO al 0,5% durante 15 minutos. ○ Imbibición de las semillas 4 horas. ○ Fotoperiodo con 24 horas de oscuridad (Devitis <i>et al.</i>, 2014). ○ 	<p>Tratamiento 3 (T3)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Desinfección con NaClO al 0,5% durante 15 minutos. ○ Sin imbibición de las semillas. ○ Fotoperiodo 24 horas de oscuridad.
<p>- Tratamiento 2 (T2)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Desinfección con NaClO al 0,5% durante 15 minutos. ○ Imbibición de las semillas 4 horas. ○ Fotoperiodo 12 horas. 	<p>- Tratamiento 4 (T4)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Desinfección con NaClO al 1% durante 1 minutos. ○ Imbibición de las semillas 24 horas. ○ Fotoperiodo 24 horas de oscuridad.

4.1.2 *Lotus creticus*

<p>Tratamiento 1 (T1)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Tratamiento con ácido sulfúrico (Reijili <i>et al.</i>, 2009) concentrado durante 30 minutos. ○ Imbibición de las semillas 1 horas. ○ Fotoperiodo con 24 horas de oscuridad. 	<p>Tratamiento 4 (T4)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 30 minutos. ○ Desinfección con NaClO al 1,5% por 15 minutos. ○ Imbibición de las semillas 24 horas. ○ Fotoperiodo con 24 horas de oscuridad.
<p>Tratamiento 2 (T2)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 30 minutos. ○ Imbibición de las semillas 1 hora. ○ Fotoperiodo 12 horas. 	<p>Tratamiento 5 (T5)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 1 hora. ○ Desinfección con NaClO al 2,8% durante 15 minutos. ○ Imbibición de las semillas 24 horas. ○ Fotoperiodo con 24 horas de oscuridad.
<p>Tratamiento 3 (T3)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 5 minutos. ○ Desinfección con NaClO al 1% durante 10 minutos. ○ Imbibición de las semillas 24 horas. ○ Fotoperiodo con 24 horas de oscuridad. 	<p>Tratamiento 6 (T6)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 1 hora. ○ Desinfección con NaClO al 2,1% durante 15 minutos. ○ Imbibición de las semillas 24 horas. ○ Fotoperiodo con 24 horas de oscuridad.

4.1.3 *Medicago marina*

<p>Tratamiento 1 (T1)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Fotoperiodo con 24 horas de oscuridad. 	<p>Tratamiento 6 (T6)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 30 minutos. ○ Desinfección con NaClO al 1,5% durante 15 minutos. ○ Imbibición de las semillas 24 horas. ○ Fotoperiodo con 24 horas de oscuridad.
<p>Tratamiento 2 (T2)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Tratamiento con ácido sulfúrico concentrado (Bacchetta <i>et al.</i>, 2015) durante 30 minutos. ○ Imbibición de las semillas 1 hora (Bacchetta <i>et al.</i>, 2015). ○ Fotoperiodo con 24 horas de oscuridad. 	<p>Tratamiento 7 (T7)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 30 minutos. ○ A los 20mL que se añaden a la placa petri se le añade un 0,5% de captan (ethanethiol, C₉H₈Cl₃NO₂S) ○ Imbibición de las semillas 24 horas. ○ Fotoperiodo con 24 horas de oscuridad.
<p>Tratamiento 3 (T3)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 30 minutos. ○ Imbibición de las semillas 30 minutos. ○ Fotoperiodo con 24 horas de oscuridad. 	<p>Tratamiento 8 (T8)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 30 minutos. ○ Desinfección con NaClO al 2,1% durante 15 minutos. ○ Imbibición de las semillas 24 horas. ○ Fotoperiodo con 24 horas de oscuridad.
<p>Tratamiento 4 (T4)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 30 minutos. ○ Imbibición de las semillas 30 minutos. ○ Fotoperiodo 12 horas 	<p>Tratamiento 9 (T9)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 30 minutos. ○ Desinfección con NaClO al 2,8% durante 15 minutos. ○ Imbibición de las semillas 24 horas. ○ Fotoperiodo con 24 horas de oscuridad.
<p>Tratamiento 5 (T5)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 5 minutos. ○ Desinfección con NaClO al 1% durante 10 minutos. ○ Imbibición de las semillas 24 horas (Bacchetta <i>et al.</i>, 2015). ○ Fotoperiodo con 24 horas de oscuridad. 	<p>Tratamiento 10(T10)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 30 minutos. ○ Desinfección con NaClO al 1,9% durante 15 minutos. ○ Imbibición de las semillas 24 horas. ○ Fotoperiodo con 24 horas de oscuridad.

4.1.4 *Pancratium maritimum*

<p>Tratamiento 1 (T1)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Desinfección con NaClO al 0,5% (Benvenuti, 2016) durante 15 minutos. ○ Imbibición 3 horas. ○ Fotoperiodo con 24 horas de oscuridad (Bacchetta <i>et al.</i>, 2015). 	<p>Tratamiento 7 (T7)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Desinfección con NaClO al 2,8% durante 30 minutos. ○ Imbibición 48 horas. ○ Fotoperiodo con 12 horas de oscuridad.
<p>Tratamiento 2 (T2)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Desinfección con NaClO al 1% durante 15 minutos. ○ Imbibición 24 horas. ○ Fotoperiodo con 12 horas de oscuridad (Ballestri <i>et al.</i>, 2004). ○ 	<p>Tratamiento 8(T8)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Desinfección con NaClO al 1,9% durante 30 minutos. ○ Imbibición 24 horas. ○ Fotoperiodo con 12 horas de oscuridad.
<p>Tratamiento 3 (T3)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Desinfección con NaClO al 1,5% durante 15 minutos. ○ Imbibición 24 horas. ○ Fotoperiodo con 12 horas de oscuridad. 	<p>Tratamiento 9 (T9)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Desinfección con NaClO al 1,9% durante 30 minutos. ○ Imbibición 48 horas. ○ Fotoperiodo con 12 horas de oscuridad.
<p>Tratamiento 4 (T4)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Desinfección con NaClO al 2,1% durante 15 minutos. ○ Imbibición 24 horas. ○ Fotoperiodo con 12 horas de oscuridad. 	<p>Tratamiento 10 (T10)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Desinfección con NaClO al 1,9% durante 30 minutos. ○ Imbibición 72horas. ○ Fotoperiodo con 12 horas de oscuridad.
<p>Tratamiento 5 (T5)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Desinfección con NaClO al 2,8% durante 15 minutos. ○ Imbibición 24 horas. ○ Fotoperiodo con 12 horas de oscuridad. 	<p>Tratamiento 11 (T11)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Desinfección con NaClO al 1,9%, más mojante al 0,1% durante 30 minutos. ○ Imbibición 48 horas. ○ Fotoperiodo con 12 horas de oscuridad.
<p>Tratamiento 6 (T6)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Desinfección con NaClO al 2,8% durante 30 minutos. ○ Imbibición 24 horas. ○ Fotoperiodo con 12 horas de oscuridad. 	

4.2 Tratamiento estadístico

Se han realizado diferentes pruebas estadísticas, mediante los programas informáticos Statgraphics Centurión XVII y Microsoft Excel. La significación estadística de las diferencias entre los porcentajes de germinación de semillas de la misma especie recolectadas en diferentes años se ha comprobado mediante ANOVA de un factor. Para las pruebas post-hoc se ha empleado el test de Tukey.

Se ha comprobado también si existe alguna relación estadística entre el total de germinación y los años de germinación mediante un análisis de varianza y rectas de regresión para cada especie.

4.3 Prueba del tetrazolio

Debido a que las semillas de los años más antiguos de *Pancratium maritimum* han presentado germinación nula, se ha comprobado la viabilidad de diferentes años, mediante una prueba con tetrazolio (Gallo *et al*, 2015) (cloruro de 2, 3, 5 – trifenil – 2H – tetrazolio de los laboratorios Alfa Aesar).

En los embriones de las semillas, la prueba del tetrazolio diferencia los tejidos vivos de los muertos sobre la base de la actividad de enzimas deshidrogenasas (enzimas de la respiración). Cuando las semillas son hidratadas, la actividad de las deshidrogenasas se incrementa, por lo que la solución de tetrazolio, en un principio incolora, se reduce a formazán y tiñe las semillas viables de rojo, quedando las muertas sin colorear. Que una semilla sea viable, nos indica que es capaz de germinar (Ruiz, 2009).

Las pautas a realizar en esta prueba se recogen en la normativa ISTA (ISTA, 2014), pero debido a que esta resulta muy laboriosa y no es el objetivo principal de este trabajo, solo se han cogido 20 semillas de cada muestra.

Para realizar la prueba se ha realizado una disolución al 1% de tetrazolio con agua destilada y se ha seleccionado una muestra de 20 semillas correspondientes a los años 2003, 2009 y 2012; se han elegido estos años ya que las semillas recogidas en 2003 han tenido germinación nula, las recogidas en 2009 han tenido germinación media y las semillas recogidas en 2012 han tenido germinación cercana al 100%.

Las 20 semillas de cada año se han dejado embebiendo en tres vasos de precipitado durante 24 h a 30 °C en oscuridad, después se han separado en dos lotes de 10 semillas para realizar la tinción de dos formas diferentes.

Para realizar la prueba en el primer lote, se han cortado las semillas transversalmente, dejando la radícula a uno de los lados, de forma que el embrión quedara al descubierto (Figura 10).

Se han preparado 3 placas petri con dos discos de filtro y se han añadido 20 mL de la disolución de tetrazolio, las semillas se han colocado de forma que el lado en el que se ha realizado el corte transversal, por donde queda expuesto el embrión, quede en contacto directo con la disolución (Figura 11), las placas se han mantenido a 30 °C en oscuridad durante 1 hora (Figura 13); pasado ese tiempo se ha realizado la comprobación de la viabilidad de las semillas (Grupo de innovación educativa en Biodiversidad y Biología vegetal, 2015).



Figura 10. Semillas de *P. maritimum* cortadas transversalmente, con el embrión a la vista

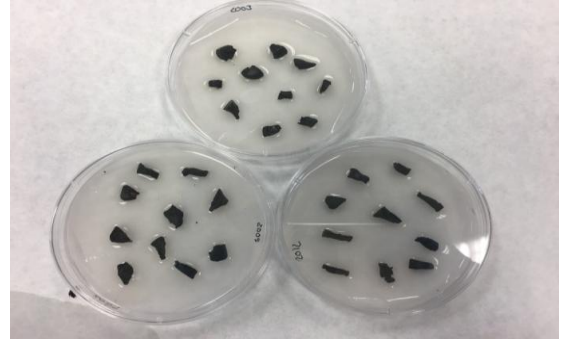


Figura 11. Semillas colocadas en placa petri con el embrión en contacto con el tetrazolio

Para realizar la prueba en el segundo lote de semillas, se ha raspado la corteza de éstas hasta llegar al tegmen, pero sin dañarlo, y se han sumergido directamente en la disolución de tetrazolio que previamente se ha separado en 3 vasos de precipitado (Figura 12). Los vasos de precipitado se han mantenido durante 20 h en oscuridad a 30 °C, pasado ese tiempo se ha comprobado las semillas que se habían teñido y las que no.

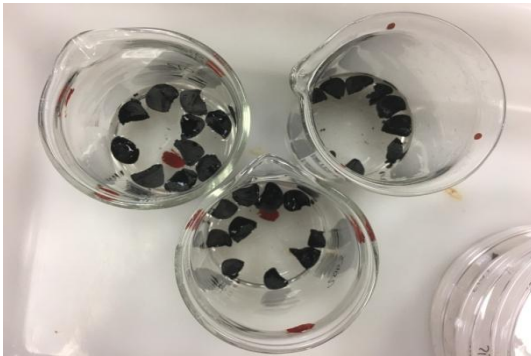


Figura 12. Semillas de *P. maritimum* en la disolución de tetrazolio



Figura 13. Semillas de *P. maritimum* en estufa a 30 °C

5. Resultados y discusión

5.1 Elección del tratamiento: Resultados de los tratamientos previos.

5.1.1 *Malcolmia littorea*

Para la especie *Malcolmia littorea* se han realizado 4 tratamientos diferentes (Tabla 1), siendo el que mejor resultados de germinación ha mostrado el tratamiento 4 (T4), con un 96% de germinación, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 1. Tratamientos previos efectuados a *Malcolmia littorea*

Tratamiento	Fotoperiodo	Desinfección	Imbibición
T1	24 h oscuridad	NaClO 0,5% 15 min	4 h
T2	12/12	NaClO 0,5% 15 min	4 h
T3	24 h oscuridad	NaClO 0,5% 15 min	0
T4	24 h oscuridad	NaClO 1% 15 min	24 h

Tabla 2. Resultados de los tratamientos previos efectuados a *M. littorea*

Malcolmia littorea	
Tratamiento	Germinación %
T1	38
T2	0
T3	46
T4	96

5.1.2 *Lotus creticus*

Para la especie *Lotus creticus* se han realizado 6 tratamientos diferentes, siendo el que mejor germinación arrojaba el tratamiento 5 (T5) (Tabla 3).

Los resultados se valoran teniendo en cuenta los años a los que pertenecen las semillas, con esta consideración los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T6 presentaban una baja germinación (Tabla 4).

Tabla 3. Tratamientos previos efectuados a *Lotus creticus*

Tratamientos	Fotoperiodo	Escarificación	Desinfección	Imbibición
T1	24 h oscuridad	H2SO4 concentrado 30 min		1 h
T2	12/12	H2SO4 concentrado 30 min		1 h
T3	24 h oscuridad	H2SO4 concentrado 5 min	NaClO 1% 10 min	24 h
T4	24 h oscuridad	H2SO4 concentrado 30 min	NaClO 1,5% 15 min	24 h
T5	24 h oscuridad	H2SO4 concentrado 1 hora	NaClO 2,8% 15 min	24 h
T6	24 h oscuridad	H2SO4 concentrado 1 hora	NaClO 2,1% 15 min	24 h

Todos los lotes de semillas de esta especie mostraban contaminación con diferentes mohos, en la tabla 4 se muestra también la relación existente entre los tratamientos aplicados, la germinación, y la aparición de moho.

Tal y como se observa en la Tabla 4, es el T5 el que mejores resultados ha mostrado con un 88% de semillas germinadas y en el que ha habido una aparición de moho más tardía a los 17 días.

Tabla 4. Resultados de los tratamientos previos aplicados a *L. creticus*

Lotus creticus		
Tratamiento	Germinación	Día aparición moho
T1	36	6
T2	36	5
T3	20	5
T4	68	5
T5	88	17
T6	65	10

5.1.3 *Medicago marina*

Para la especie *Medicago marina* se han realizado 10 tratamientos previos como se puede observar en la Tabla 5, de todos los tratamientos el que mejor resultados de germinación ha dado ha sido el tratamiento 10 (T10).

Tratamiento con desinfección con captan

Los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5 y T6 presentaban una aparición de moho temprana, antes de los 8 días, aparte de una baja germinación $\leq 50\%$; por ello, para el tratamiento 7, se decidió usar captan con una concentración del 0.5‰, aplicado en el papel de filtro junto al agua destilada; en este ensayo no germinó ninguna semilla, y el día 12 apareció moho, por lo que para los tratamietos siguientes (T8, T9 y T10) se decidió variar la concentración de lejía, aumentándola, hasta encontrar una germinación aceptable (Tabla 6).

Tabla 5. Tratamientos previos efectuados a *Medicago marina*

Tratamientos	Fotoperiodo	mL H2O	escarificación	Desinfección	Imbibición
T1	24 h oscuridad	20		0	0
T2	24 h oscuridad	20	H ₂ SO ₄ concentrado 30 min		0 1 h
T3	24 h oscuridad	20	H ₂ SO ₄ concentrado 30 min		0 30 min
T4	12/12	20	H ₂ SO ₄ concentrado 30 min		0 30 min
T5	24 h oscuridad	20	H ₂ SO ₄ concentrado 5 min	NaClO 1% 10 min	24 h
T5	24 h oscuridad	20	H ₂ O ₄ concentrado 5 min	NaClO 1% 10 min	24 h
T5	24 h oscuridad	20	H ₂ SO ₄ concentrado 5 min	NaClO 1% 10 min	24 h
T6	24 h oscuridad	20	H ₂ SO ₄ concentrado 30 min	NaClO 1,5% 15 min	24 h
T7	24 h oscuridad	20 ml Captan 0,5‰	H ₂ SO ₄ concentrado 30 min	Captan 0,5‰	24 h
T8	24 h oscuridad	20	H ₂ SO ₄ concentrado 30 min	NaClO 2,1% 15 min	24 h
T9	24 h oscuridad	20	H ₂ SO ₄ concentrado 30 min	NaClO 2,8% 15 min	24 h
T10	24 h oscuridad	20	H₂SO₄ concentrado 30 min	NaClO 1,9% 30 min	24 h

Tabla 6. Resultados de los tratamientos previos aplicados a *M. marina*

Medicago marina		
Tratamiento	Germinación	Día aparición moho
T1	0	4
T2	50	4
T3	40	6
T4	15	6
T5	32	6
T6	25	4
T7	0	12
T8	40	5
T9	30	6
T10	100	20

5.1.4 *Pancratium maritimum*

Los tratamientos de desinfección aplicados a esta especie fueron de difícil aplicación y poco efectivos debido a que las semillas de *Pancratium maritimum* son extremadamente ligeras a causa de su parénquima aerífero (Grassi, 2005), esto unido a que la especie tardaba como mínimo 5 días desde que se sembraba hasta que germinaba la primera semilla (véase en el apartado siguiente), ha sido la especie que más laboriosa ha resultado a la hora de encontrar un tratamiento que diera una germinación adecuada.

Para esta especie se han aplicado 11 tratamientos, en este caso no se ha aplicado ningún tipo de escarificación puesto que las semillas de esta especie presentan una testa esponjosa, pero sí que se aplicaba un tratamiento de desinfección con lejía a diferentes concentraciones, y se variaban los tiempos de imbibición (Tabla 7).

De todos los tratamientos aplicados el que mejor germinación ha presentado ha sido el tratamiento 11 (T11); para preparar la disolución se le añadía un agente mojante a la lejía, que disminuye la tensión superficial permitiendo un mejor contacto superficial de la semilla con la solución desinfectante (Ruiz, 2000) (Tabla 8).

Tabla 7. Tratamientos efectuados a *Pancretium maritimum*

Tratamiento	Fotoperiodo	Desinfección	Imbibición
T1	24h oscuridad	NaClO 0,5% 15 minutos	3 h
T2	12/12	NaClO 1% 15 min	24 h
T3	12/12	NaClO 1,5% 15 min	24 h
T4	12/12	NaClO 2,1% 15 min	24 h
T5	12/12	NaClO 2,8% 15min	24 h
T6	12/12	NaClO 2,8% 30 min	24 h
T7	12/12	NaClO 2,8% 30 min	48 h
T8	12/12	NaClO 1,9% 30 min	24 h
T9	12/12	NaClO 1,9% 30 min	48 h
T10	12/12	NaClO 1,9% 30 min	72 h
T11	12/12	NaClO 1,9% + mojanete 0,1% 30 min	48 h

Como se observa en la Tabla 8, el tratamiento 11 ha mostrado una germinación más elevada, con un 73% del total de las semillas germinadas, y una aparición de moho más tardía a los 30 días.

Tabla 8. Resultados de los tratamientos previos aplicados a *M. marina*

Panicum maritimum		
Tratamiento	Germinación	Día aparición moho
T1	25	10
T2	90	8
T3	50	10
T4	28	10
T5	18	11
T6	18	11
T7	48	11
T8	38	10
T9	28	11
T10	40	12
T11	73	30

5.1.5 Resultados de la afección con moho.

Tal y como se ha explicado anteriormente, para comprobar la relación entre la germinación y la aparición de moho, se ha realizado una prueba estadística ANOVA mediante el programa informático Statgraphics para las especies *Medicago marina* y *Lotus creticus*.

La Tabla 9 muestra el total de semillas germinadas durante 1 mes (columna germinación) y el total de las semillas en las que ha aparecido moho (columna Moho). Se sembraron 100 semillas de cada año para cada especie, repartidas en 4 placas petri (25 semillas por placa).

Tabla 9. Semillas germinadas y semillas en las que ha aparecido moho en las especies *Lotus creticus* y *Medicago marina*

Lotus creticus			Medicago marina		
Años	Germinación	Moho	Años	Germinación	Moho
1991	49	12	1991	29	49
1994	49	3	1994	21	56
1997	27	38	1998	18	15
2000	70	25	2000	30	12
2003	56	19	2003	12	87
2006	52	9	2007	54	12
2009	71	21	2009	71	13
2012	83	2	2012	51	24
2015	98	0	2015	64	10
2016	83	5	2016	50	50

Análisis de varianza:

Tabla 10. Análisis de varianza respecto a la germinación y moho de *Lotus creticus* y *Medicago marina*

Análisis de Varianza Lotus creticus					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0,000323337	1	0,000323337	12,18	0,0082
Residuo	0,000212386	8	2,65483E-05		
Total (Corr.)	5,36E-04	9			

Análisis de Varianza Medicago marina					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0,00265937	1	0,00265937	11,81	0,0089
Residuo	0,00180182	8	0,000225227		
Total (Corr.)	0,00446119	9			

5.1.5.1 Resultados para *Lotus creticus*.

También se calculan los siguientes datos:

Coeficiente de Correlación = 0,776886 R-cuadrada = 60,3553 %

Puesto que el valor-P en la tabla de varianza (Tabla 10) es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre la germinación y la existencia de moho.

El estadístico R-Cuadrado indica que el modelo ajustado (Figura 14) explica 60,3553% de la variabilidad en Germinación. El coeficiente de correlación es igual a 0,772083, indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables.

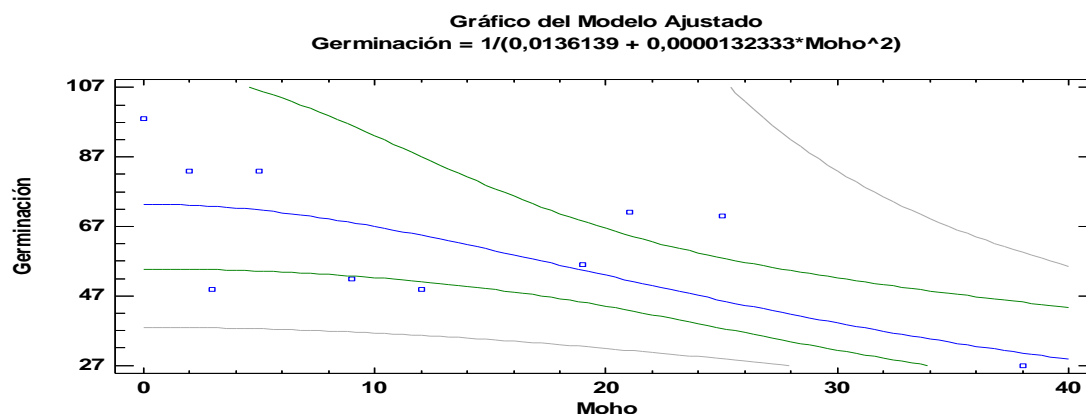


Figura 14. Gráfico de regresión de *Lotus creticus*

5.1.5.2 Resultados para *Medicago marina*

Se calculan también los siguientes datos

Coeficiente de Correlación = -0,935893 R-cuadrada = 87,5896 %

Puesto que el valor-P en la tabla de varianza es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre la germinación y la aparición de moho (Tabla 10).

El estadístico R-Cuadrado indica que el modelo ajustado (Figura 15) explica 87,5896 % de la variabilidad en Germinación. El coeficiente de correlación es igual a -0,935893, indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables.

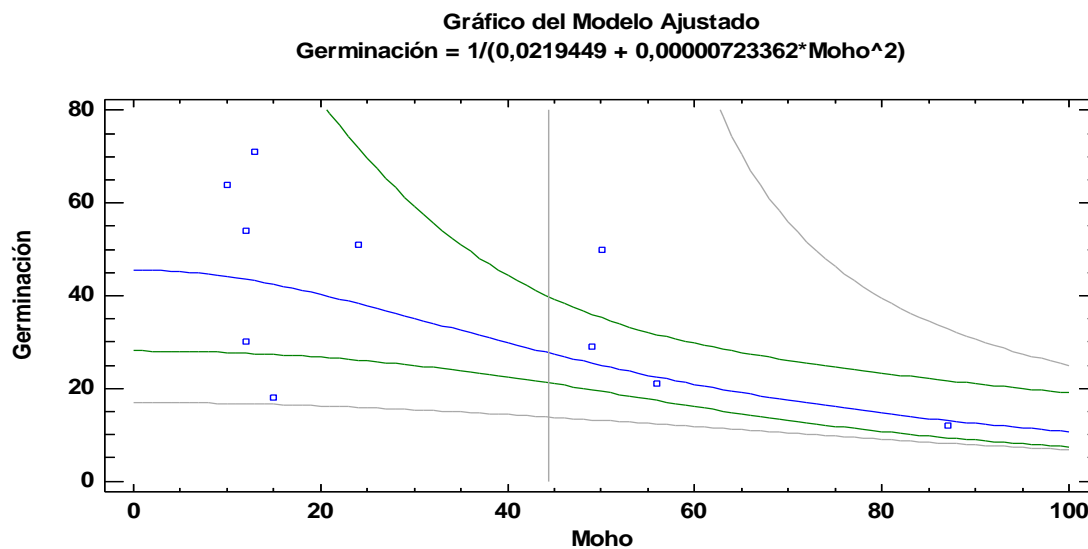


Figura 15. Gráfico de regresión de *Medicago marina*

Como conclusión se puede afirmar que en estas especies y para estos años, sí que hay una relación entre la aparición de diferentes tipos de moho, y la disminución en el índice germinación, por lo que se repitió el experimento aumentando la concentración de lejía.

5.2 Resultados de las siembras definitivas

5.2.1 *Malcolmia littorea*

Aplicando el protocolo de germinación T4 (Tabla 11), que resultó ser el más eficaz, las semillas de *Malcolmia littorea* mostraron germinación solamente a partir del año 2007, germinaron los años 2007, 2009, 2012, 2015 y 2016 mientras que los años 1991, 1997, 2000 y 2003 mostraron una germinación nula.

Como puede observarse en la Figura 16, las semillas recogidas en el año 2012 mostraron una germinación elevada, similar a las recogidas en el año 2016 y superior a las recogidas en el año 2015.

Los años en los que las semillas han germinado, han presentado un porcentaje de germinación superior al 50%.

Tabla 11. Condiciones definitivas de germinación de *Malcolmia littorea*

Fotoperiodo	Temperatura	Humedad	mL H2O	Desinfección	Imbibición
24h oscuridad	20 °C	70%	20	NaClO 1% 15 min	24 h

En el gráfico siguiente (Figura 16) se muestra una evolución de la germinación de las semillas por días, en él se representan solamente las semillas de los años que han germinado.

El ensayo duró 30 días, como puede verse tanto las semillas de 2016 como las semillas de 2012 tienen una velocidad de germinación elevada. Todas las semillas comienzan a germinar a partir del día 1.

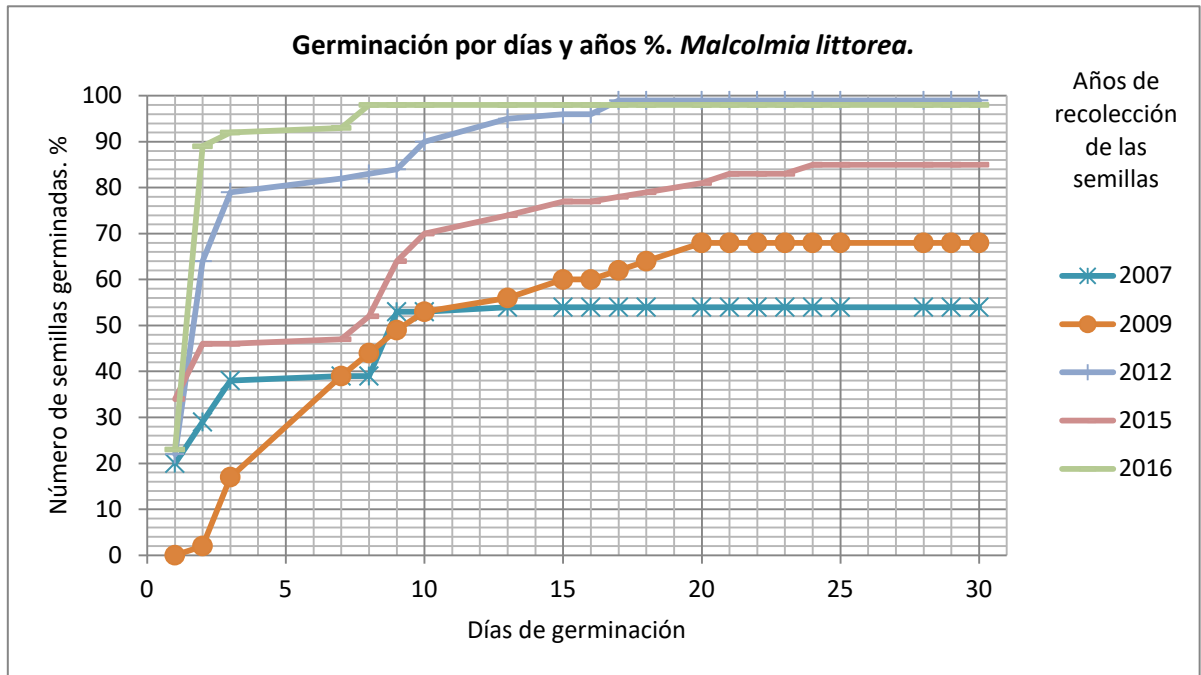


Figura 16. Evolución por días de la germinación de *Malcolmia littorea* con tratamiento T4

Cálculo de TMG

Se ha calculado la velocidad media de germinación TMG (Al Hassan *et al.*, 2014), tal y como se observa en el gráfico anterior, las semillas que han tenido un tiempo medio de germinación menor (han germinado antes) son las pertenecientes a los años 2016 y 2012 (Tabla 12).

Tabla 12. Tiempo medio de germinación de *Malcolmia littorea*

Año	TMG
1991	0
1997	0
2000	0
2003	0
2007	0,278
2009	0,294
2012	0,172
2015	0,282
2016	0,082

Promedio de germinación por placas y años

En el gráfico siguiente (Figura 17) se muestra un promedio de germinación por placa de todos los años de estudio y desviación estándar.

Tras realizar una comparación simple con ANOVA, se obtuvo un valor-P menor de 0,05; por lo que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los años de germinación.

En el gráfico se representan también las barras de error estimadas a partir de la desviación estándar, y las letras que indican diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% obtenidas mediante la prueba de Múltiples Rangos de Statgraphics Centurion XVII (García, 2017).

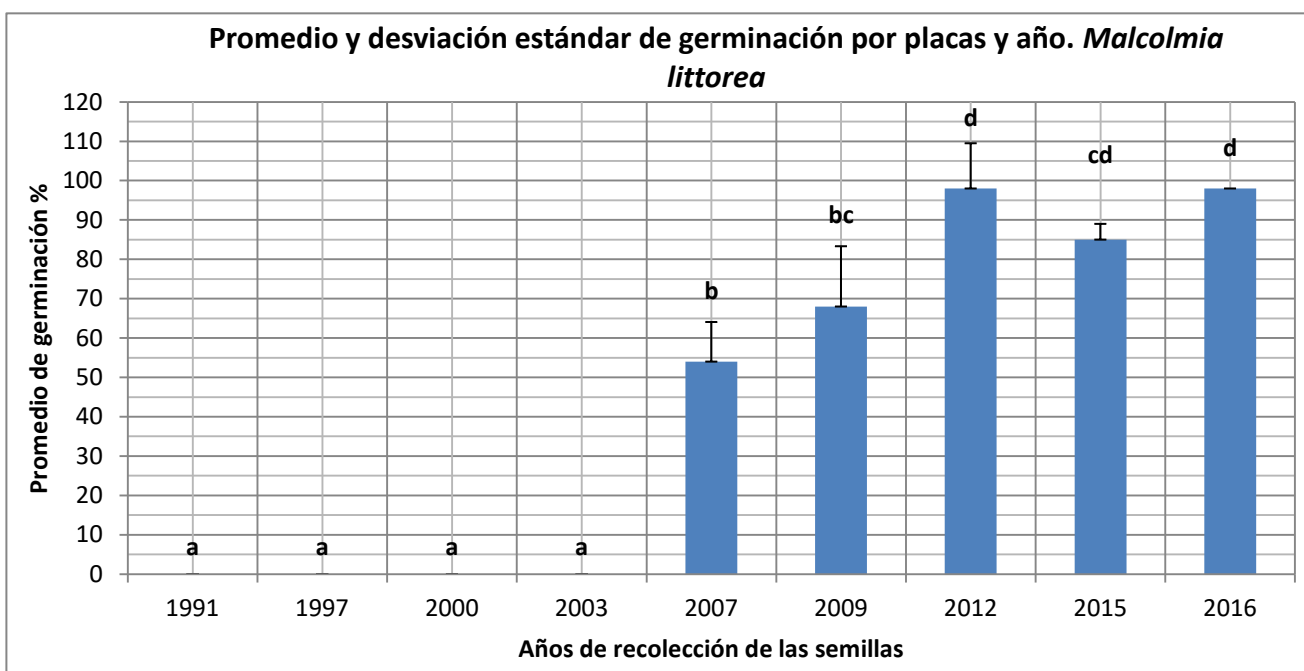


Figura 17. Promedio y desviación estándar de germinación por placas y años. *M. littorea*

Relación entre la germinación y los años de recolección

Se ha calculado si existe relación entre la germinación de las semillas y los años de recolección mediante una regresión simple con el programa Statgraphics, que ha arrojado los siguientes resultados (Tabla 13).

Tabla 13. Análisis de varianza entre la germinación y los años de *Malcolmia littorea*

Análisis de Varianza					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	3332,33	1	3332,33	152,84	0
Residuo	741,312	34	21,8033		
Total (Corr.)	4073,64	35			

Puesto que el valor-P en la tabla es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre Total germinación y años recolección con un nivel de confianza del 95,0%.

Se calculan también los siguientes datos:

Coeficiente de Correlación = 0,904446

R-cuadrado = 81,8022%

El estadístico R-Cuadrado indica que el modelo ajustado explica 81,8022% de la variabilidad en Total germinación. El coeficiente de correlación es igual a 0,904446, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

Mediante este cálculo se confirma que existe una relación entre los años de recolección de las semillas y la germinación, de forma que cuando más antiguo es el año de recolección, menor es la germinación.

5.2.2 *Lotus creticus*

Aplicando el protocolo de germinación T5 (Tabla 14) las semillas de *Lotus creticus* mostraron germinación en todos los años en los que se realizó el ensayo.

Todas las semillas que han germinado, han presentado un porcentaje de germinación superior al 50% excepto los años 1994 y 1997 donde han germinado un 45% y un 36% de las semillas (Tabla 15).

Tabla 13. Condiciones definitivas de germinación de *Lotus creticus*

Fotoperiodo	Temperatura	Humedad	mL H2O	Escarificación	Desinfección	Imbibición
24 h oscuridad	20 °C	70%	20	H2SO4 30-60 min	NaClO 2,1% 15 min	24 h

En el gráfico siguiente (Figura 18) se muestra una evolución de la germinación de las semillas por día.

El ensayo duró 30 días, aunque en este experimento a velocidad de germinación fue elevada en todos los años, y el día 10 dejaron de germinar. Todas las semillas comienzan a germinar a partir del día 1.

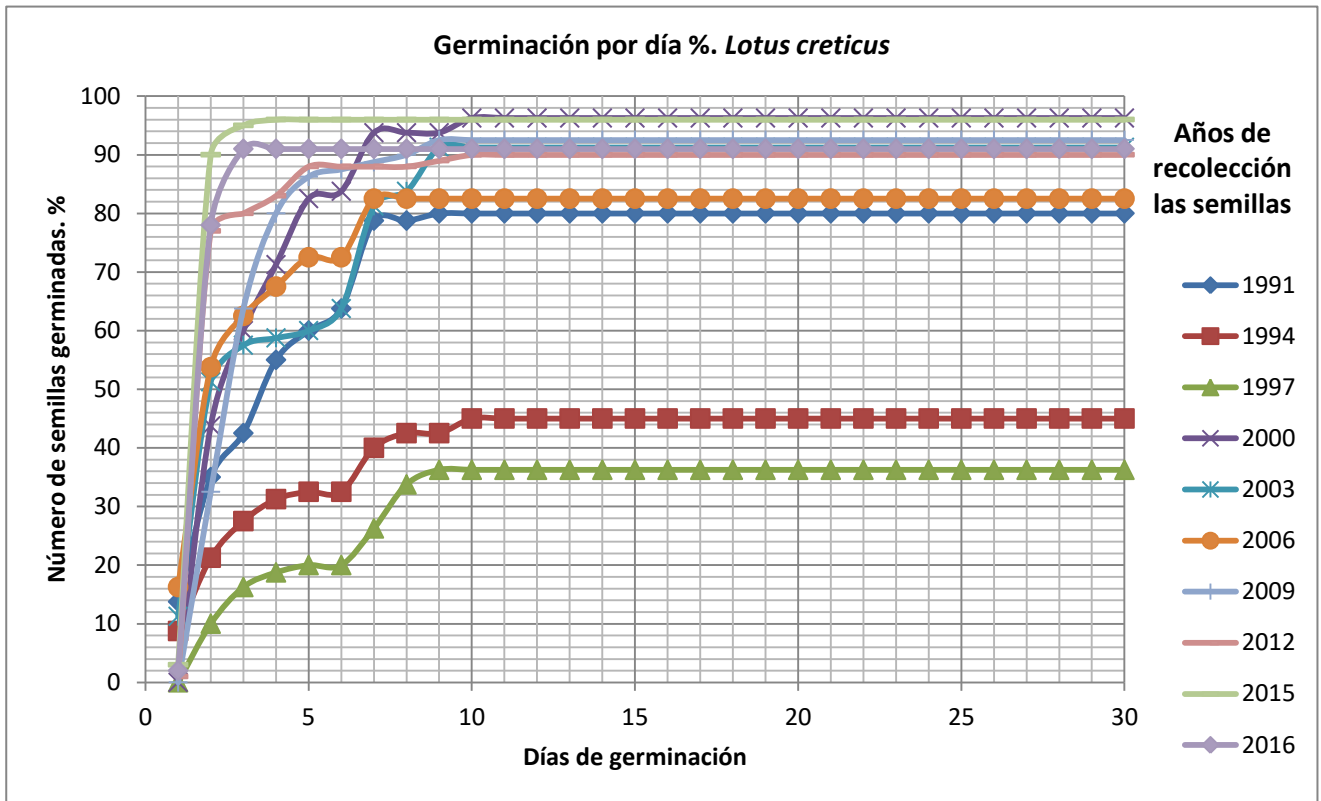


Figura 18. Evolución por días de la germinación de *Lotus creticus* con tratamiento T5

Cálculo de TMG

Se ha calculado la velocidad media de germinación TMG, tal y como se observa en el gráfico anterior, las semillas que han tenido un tiempo medio de germinación menor son las pertenecientes a los años 2016 y 2015 (Tabla 15).

Tabla 14. Tiempo medio de germinación de *Lotus creticus*

Año	TMG
1991	0,125
1994	0,244
1997	0,276
2000	0,114
2003	0,110
2006	0,097
2009	0,108
2012	0,111
2015	0,042
2016	0,033

Promedio de germinación por placas y año

En el gráfico siguiente (Figura 19) se muestra un promedio de germinación por placa de todos los años de estudio y desviación estándar.

Tras realizar una comparación simple con ANOVA, se obtuvo un valor-P menor de 0,05; por lo que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los años de germinación.

En el gráfico se representan también las barras de error estimadas a partir de la desviación estándar, y las letras que indican diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% obtenidas mediante la prueba de Múltiples Rangos de Statgraphics Centurion XVII.

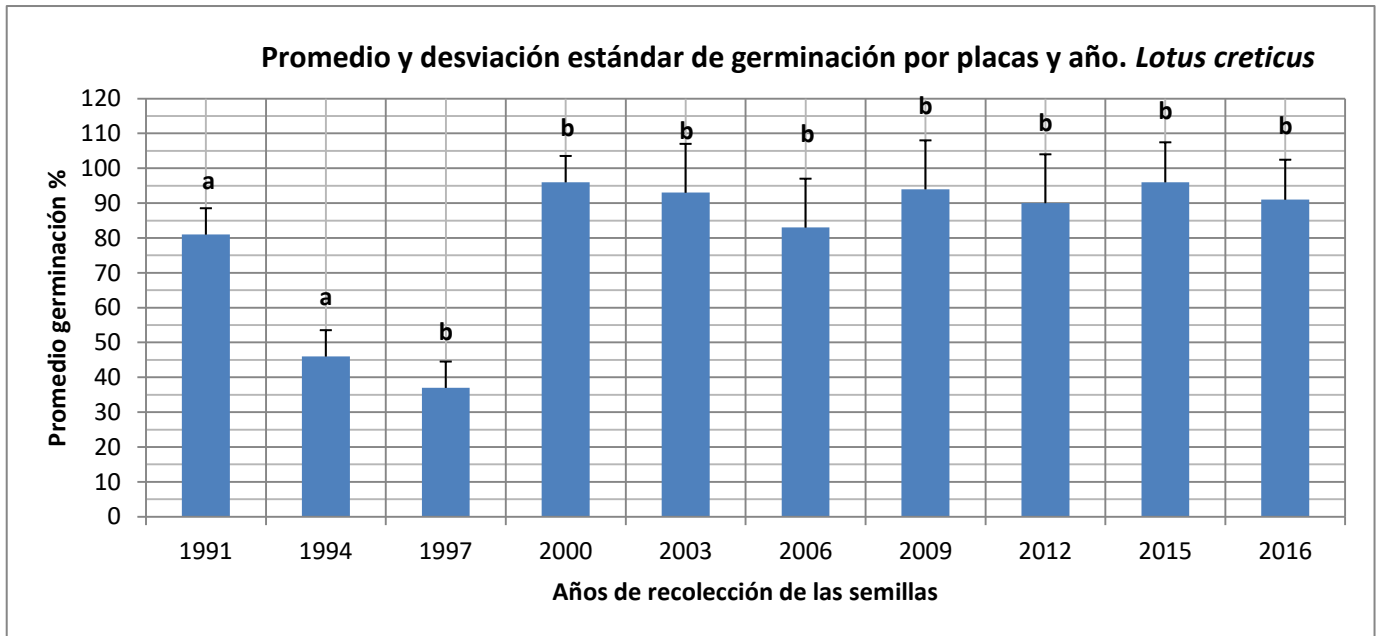


Figura 19. Promedio y desviación estándar de germinación por placas y años. *L. creticus*

Relación entre la germinación y los años de recolección

Se ha calculado si existe relación entre la germinación de las semillas y los años de recolección mediante una regresión simple con el programa Statgraphics, que ha arrojado los siguientes resultados (Tabla 16).

Tabla 15. Análisis de varianza entre la germinación y los años de *Lotus creticus*

Análisis de Varianza						
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	
Modelo	3,84E+07	1	3,84E+07	9,52	0,015	
Residuo	3,23E+07	8	4,03E+06			
Total (Corr.)	7,06E+07	9				

Puesto que el valor-P en la tabla es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre Total germinación y años recolección con un nivel de confianza del 95,0%.

Se calculan también los siguientes datos:

Coeficiente de Correlación = 0,776886

R-cuadrado = 60,3553 %

El estadístico R-Cuadrado indica que el modelo ajustado (Figura 20) explica 54,3351% de la variabilidad en Total germinación. El coeficiente de correlación es igual a 0,737123, indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables.

Mediante este cálculo se confirma que existe una relación entre los años de recolección de las semillas y la germinación, de forma que cuando más antiguo es el año de recolección, menor es la germinación.

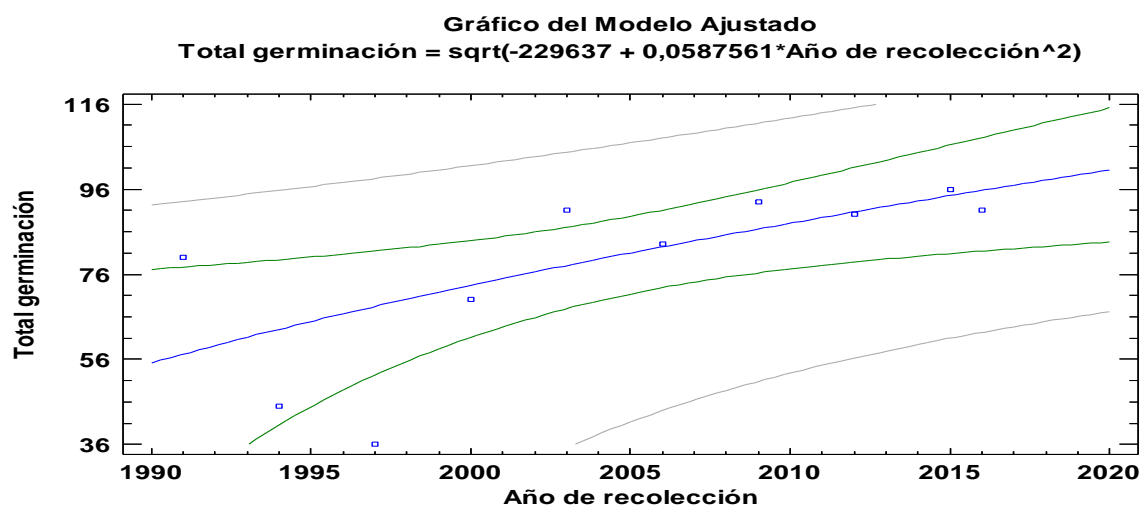


Figura 20. Regresión simple entre Total de germinación de cada año y los años de recolección de las semillas de *Lotus creticus*

5.2.3 *Medicago marina*

Aplicando el protocolo de germinación T10 las semillas de *Medicago marina* mostraron germinación en todos los años en los que se realizó el ensayo.

Como puede observarse en la Figura 21, las semillas recogidas a partir del año 2009 ha mostrado una elevada germinación superior al 80%, mientras que las recogidas en los años 1991, 1994 y 1998 mostraron una germinación <50%, siendo de la 1991 superior a las dos posteriores.

Tabla 17. Condiciones definitivas de germinación de *Medicago marina*

Fotoperiodo mL H ₂ O	Humedad	escarificación	Desinfección	Imbibición
24 h	20	70% H ₂ SO ₄ concentrado 30 min	NaClO 1,9% 30 min	24 h

En el gráfico siguiente se muestra una evolución de la germinación de las semillas por días (Figura 21).

El ensayo duró 30 días, aunque en este experimento la velocidad de germinación fue elevada en todos los años, y el día 15 dejaron de germinar. Todas las semillas comienzan a germinar a partir del día 1 excepto las semillas de 1994 que lo hacen a partir del día 7.

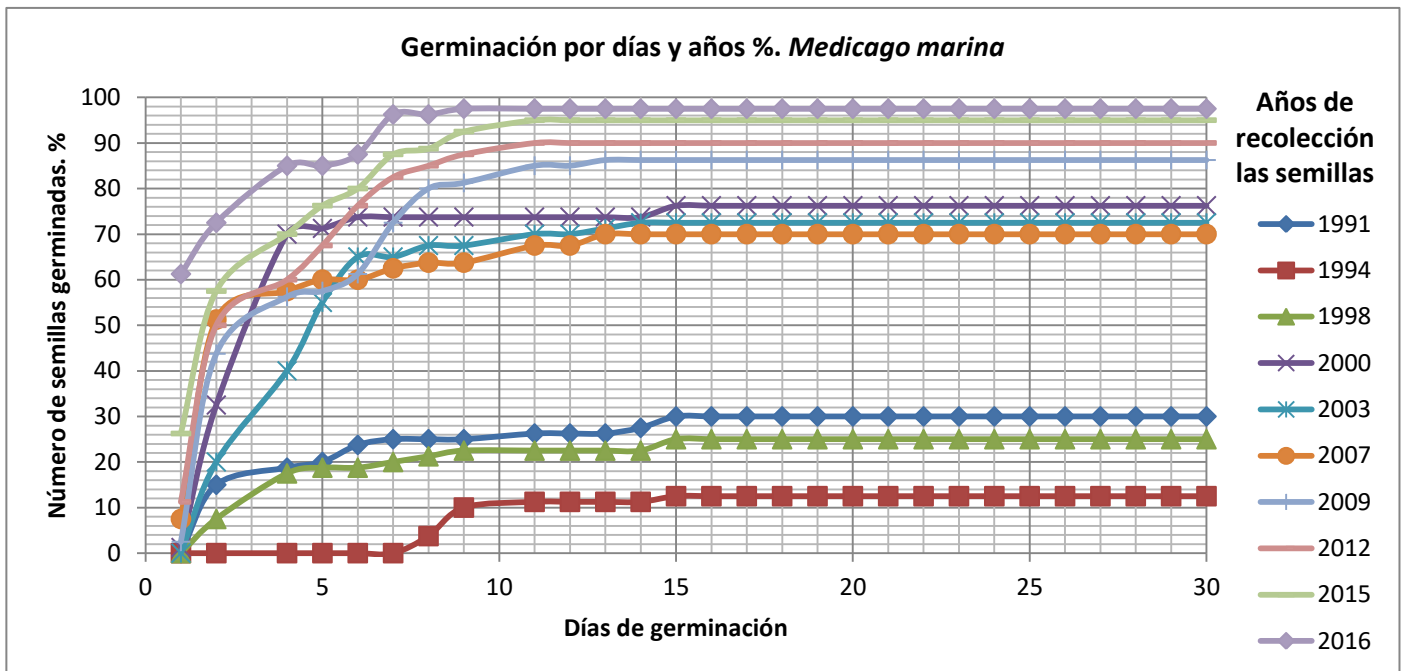


Figura 21. Evolución por días de la germinación de *Medicago marina* con tratamiento T10

Cálculo de TMG

Se ha calculado la velocidad media de germinación TMG, tal y como se observa en el gráfico anterior, las semillas que han tenido un tiempo medio de germinación menor son las pertenecientes a los años 2016 y 2015, mientras que las semillas de 1994 han tenido una velocidad media de germinación más elevada (Tabla 18).

Tabla 18. Tiempo medio de germinación de *Medicago marina*

Año	TMG
1991	0,433
1994	1,040
1998	0,520
2000	0,170
2003	0,166
2007	0,157
2009	0,128
2012	0,100
2015	0,095
2016	0,082

Promedio de germinación por placas y años

En el gráfico siguiente (figura 22) se muestra un promedio de germinación por placa de todos los años de estudio y desviación estándar

Tras realizar una comparación simple con ANOVA, se obtuvo un valor-P menor de 0,05; por lo que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los años de germinación

En el gráfico se representan también las barras de error estimadas a partir de la desviación estándar, y las letras que indican diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% obtenidas mediante la prueba de Múltiples Rangos de Statgraphics Centurion XVII.

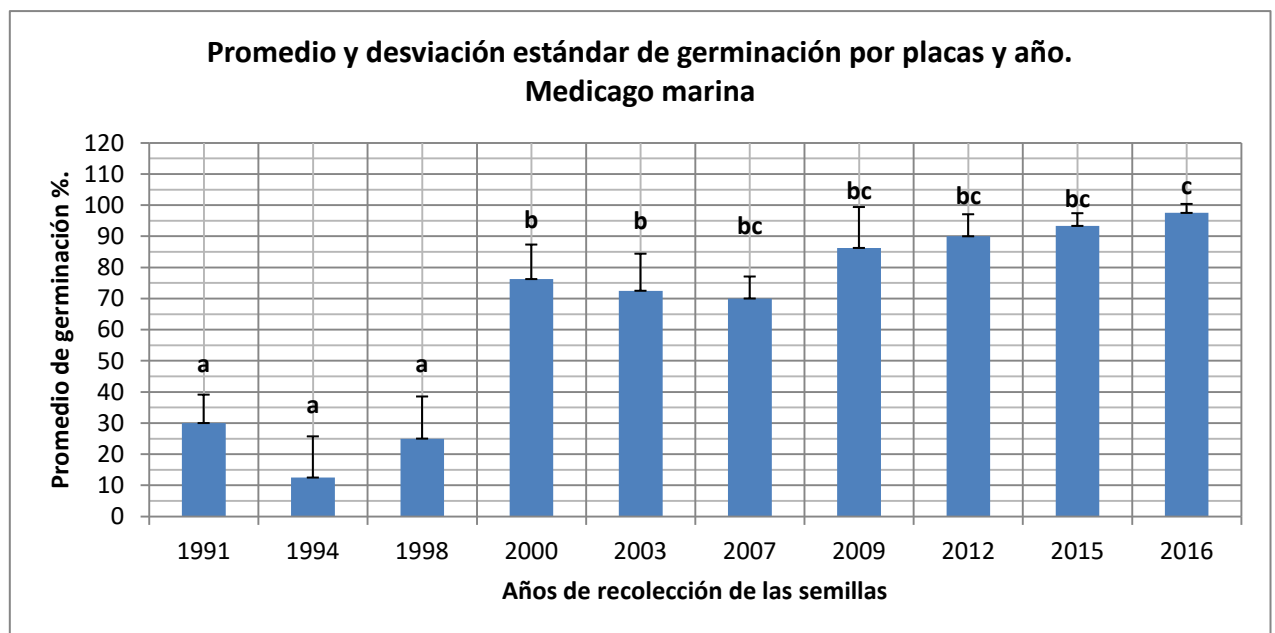


Figura 22. Promedio y desviación estándar de germinación por placas y años. *L. creticus*

Relación entre la germinación y los años de recolección

Se ha calculado si existe relación entre la germinación de las semillas y los años de recolección mediante una regresión simple con el programa Statgraphics, que ha arrojado los siguientes resultados (Tabla 19).

Tabla 6. Análisis de varianza entre la germinación y los años de *Medicago marina*

Análisis de Varianza						
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	
Modelo	4,02E+07	1	4,02E+07	56,46	0,0001	
Residuo	5,69E+06	8	711157			
Total (Corr.)	4,58E+07	9				

Puesto que el valor-P en la tabla es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre Total germinación y años recolección con un nivel de confianza del 95,0%.

Se calculan también los siguientes datos:

Coefficiente de Correlación = -0,935893

R-cuadrada = 87,5896 %

El estadístico R-Cuadrado indica que el modelo ajustado (Figura 23) explica 87,5896% de la variabilidad en Número de semillas germinadas. El coeficiente de correlación es igual a -0,935893, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

Mediante este cálculo se confirma que existe una relación entre los años de recolección de las semillas y la germinación, de forma que cuando más antiguo es el año de recolección, menor es la germinación.

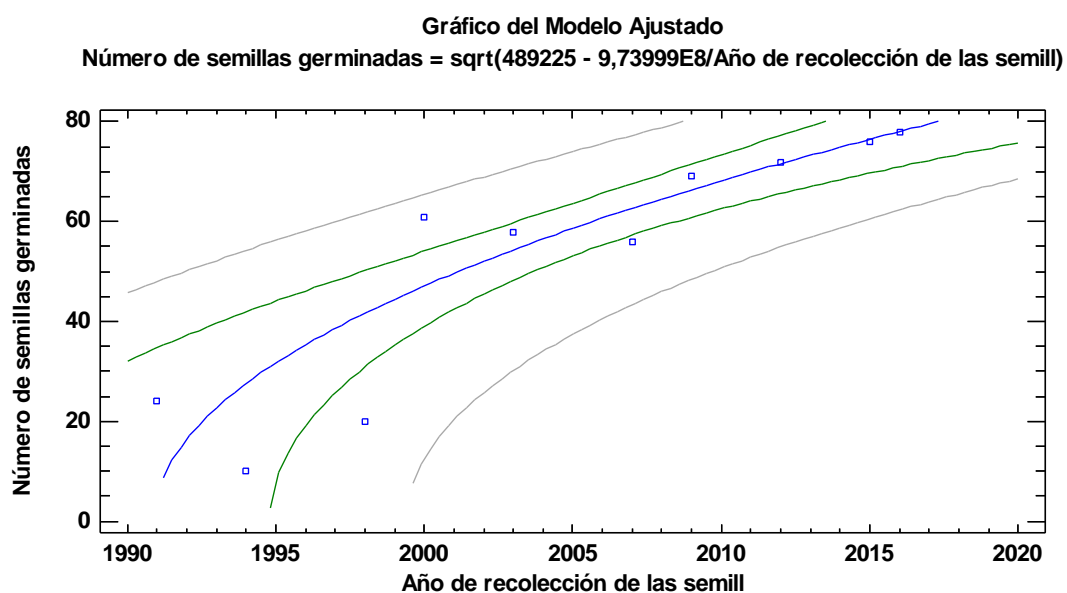


Figura 23. Regresión simple entre Total de germinación de cada año y los años de recolección de las semillas de *Medicago marina*

5.2.4 *Pancratium maritimum*

Aplicando el protocolo de germinación T11 (Tabla 20) las semillas de *Pancratium maritimum* mostraron germinación en los años 2007, 2009, 2012, 2015 y 2016, mientras que en el resto de años la germinación fue nula.

Como puede observarse en la Figura 25, las semillas recogidas en el año 2012 son las que mayor porcentaje de germinación han mostrado, superior incluso a las semillas de 2016.

Tabla 20. Condiciones definitivas de germinación de *Pancratium maritimum*

Fotoperiodo	Temperatura	Humedad	MI H2O	Desinfección	Imbibición
12/12	20 °C	70%	20	NaClO 1,9% + mojanete 0,1% 30 min	48 h

En el gráfico siguiente se muestra una evolución de la germinación de las semillas por días.

Debido a que las semillas tenían una velocidad de germinación lenta, el experimento ha durado 50 días, a partir del día 40 la germinación se detuvo, las semillas comenzaron a germinar a partir del día 4 (Figura 24).

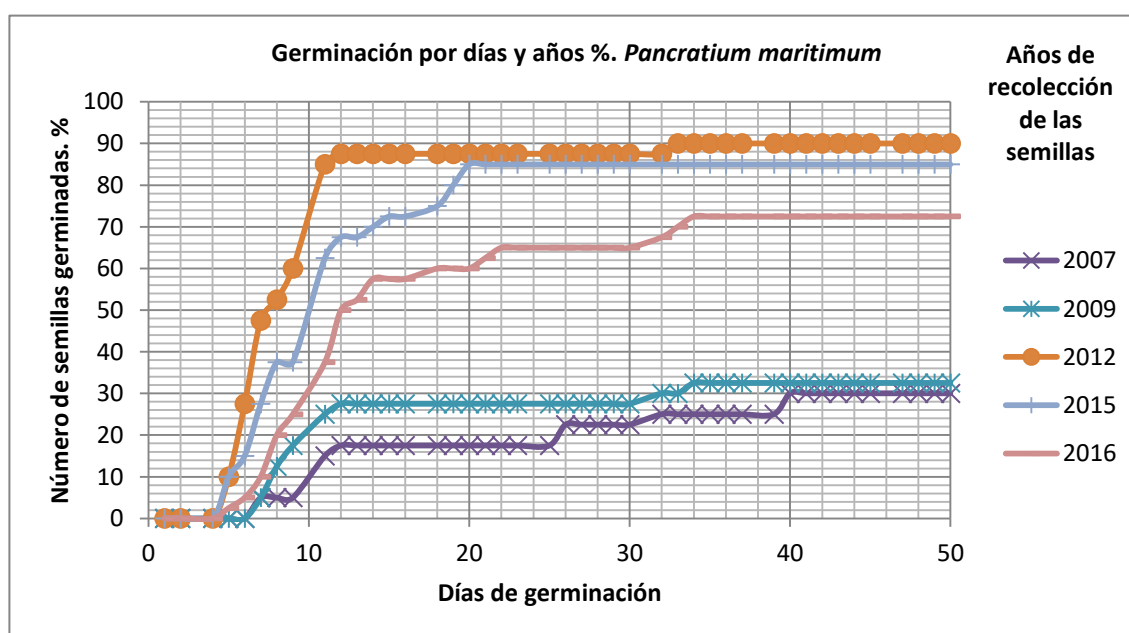


Figura 24. Evolución por días de la germinación de *Pancratium maritimum* con tratamiento T11

Cálculo de TMG

Se ha calculado la velocidad media de germinación TMG, tal y como se observa en el gráfico anterior, las semillas que han tenido un tiempo medio de germinación menor son las pertenecientes al año 2012 y 2015, mientras que las semillas de 2007 y 2009 han tenido una velocidad media de germinación más elevada (Tabla 21).

Tabla 21. Tiempo medio de germinación de *Pancratium maritimum*

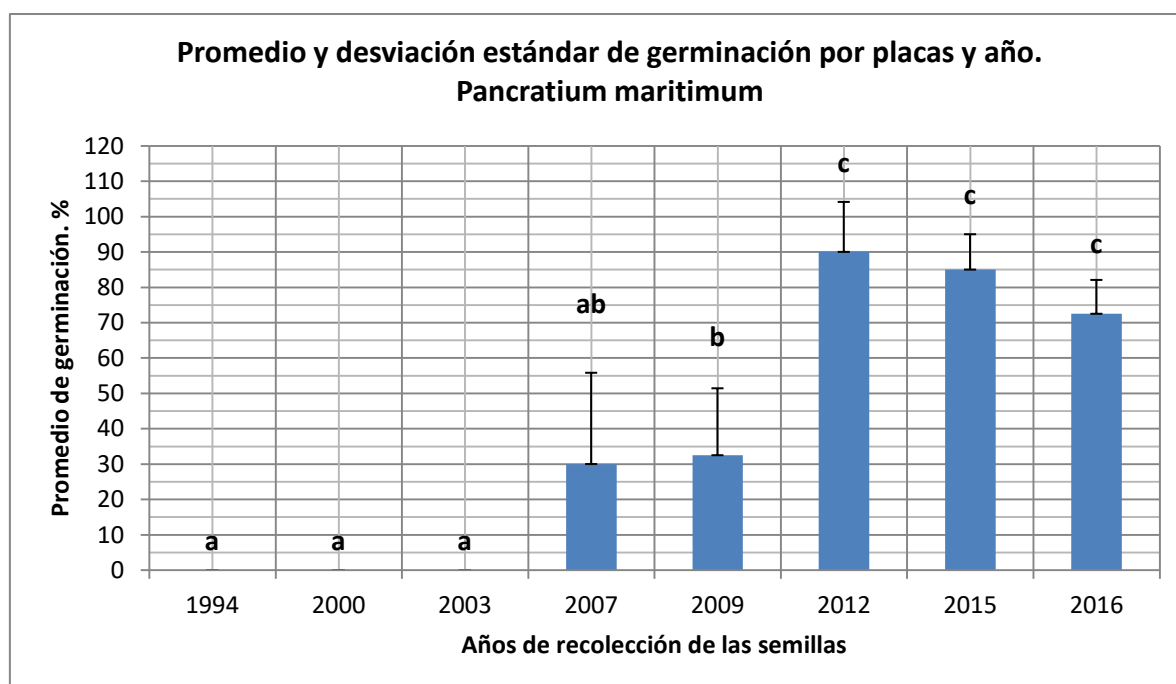
Años	TMG
1994	0
2000	0
2003	0
2007	1,33
2009	1,05
2012	0,37
2015	0,24
2016	0,47

Promedio de germinación por placas y años

En el gráfico siguiente (Figura 25) se muestra un promedio de germinación por placa de todos los años de estudio y desviación estándar

Tras realizar una comparación simple con ANOVA, se obtuvo un valor-P menor de 0,05; por lo que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los años de germinación

En el gráfico se representan también las barras de error estimadas a partir de la desviación estándar, y las letras que indican diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% obtenidas mediante la prueba de Múltiples Rangos de Statgraphics Centurion XVII.

Figura 25. Promedio y desviación estándar de germinación por placas y años. *P. maritimum*

Relación entre la germinación y los años de recolección

Se ha calculado si existe relación entre la germinación de las semillas y los años de recolección mediante una regresión simple con el programa Statgraphics, que ha arrojado los siguientes resultados (Tabla 22).

Tabla 22. Análisis de varianza entre la germinación y los años de *Pancratium maritimum*

Análisis de Varianza					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	107,706	1	107,706	35,35	0,001
Residuo	18,2806	6	3,04677		
Total (Corr.)	125,987	7			

Puesto que el valor-P en la tabla es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre Total germinación y años recolección con un nivel de confianza del 95,0%.

Se calculan también los siguientes datos:

Coefficiente de Correlación = 0,924608 R-cuadrado = 85,49 %

El estadístico R-Cuadrado indica que el modelo ajustado (Figura 26) explica 85,49% de la variabilidad en T Germ %. El coeficiente de correlación es igual a 0,924608, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

Mediante este cálculo se confirma que existe una relación entre los años de recolección de las semillas y la germinación, de forma que cuando más antiguo es el año de recolección, menor es la germinación.

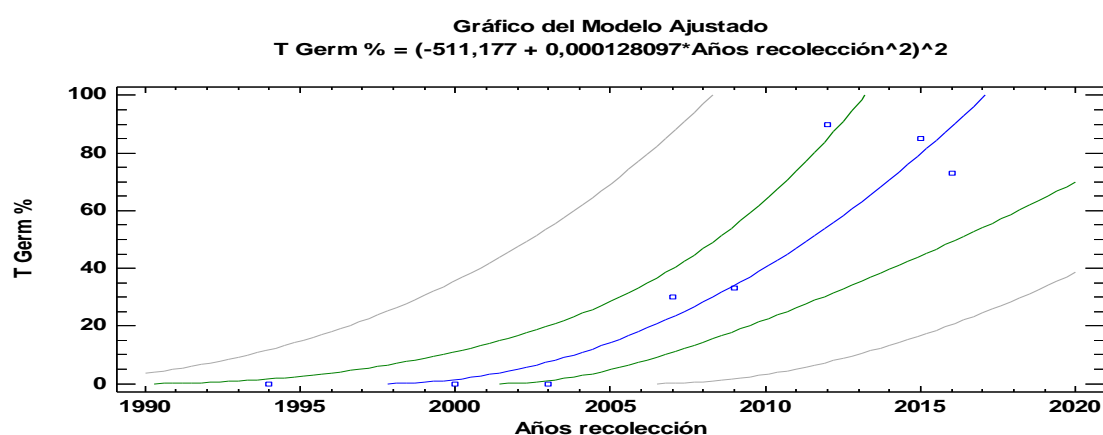


Figura 26. Regresión simple entre Total de germinación de cada año y los años de recolección de las semillas de *Pancratium maritimum*

5.2.5 Resultados de la prueba del tetrazolio

La prueba del tetrazolio resulta una herramienta muy útil para determinar la viabilidad de las semillas, aunque en este trabajo no se hizo tal y como determina la normativa ISTA se buscó bibliografía al respecto y además se ratificó su utilidad en una consulta realizada a los viveros de El Saler, sería interesante realizar la prueba a priori, antes de realizar los ensayos de germinación para determinar qué años de semillas son viables y cuáles no, aunque como inconvenientes presenta que es un material tóxico, por lo que su uso en un parque natural debería ser limitado. Por otro lado, la correcta evaluación de la viabilidad puede resultar subjetiva al estar basada en la tinción de los tejidos vivos, dependiendo en gran medida de la persona que lo analiza, su experiencia y su percepción del color (Caballero *et al.*, 2009).

En el conteo de las semillas de *Pancratium maritimum* tras la aplicación del tetrazolio, se pudieron observar los siguientes resultados:

Respecto al lote 1: Se puede observar que las semillas del año 2003 no se han teñido, las semillas de 2009 se han teñido toda excepto 2 y las semillas de 2012 se han teñido todas excepto 1, esto confirmaría los resultados obtenidos en las pruebas de germinación de esta especie de los años en los que la germinación ha sido nula, que el embrión en las semillas de 2003 no se tiñe, por tanto no tiene respiración y no está vivo (Figura 27).

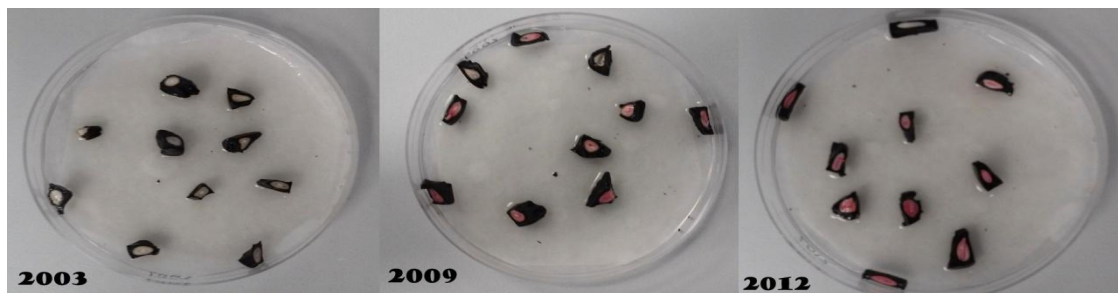


Figura 27. Resultados de la prueba de tetrazolio en lote 1

Respecto al lote 2: En cuanto a las semillas de 2012 y 2009 se tiñeron todas menos 2, y de las del año 2003 sólo se tiñeron 2 semillas (Figura 28).

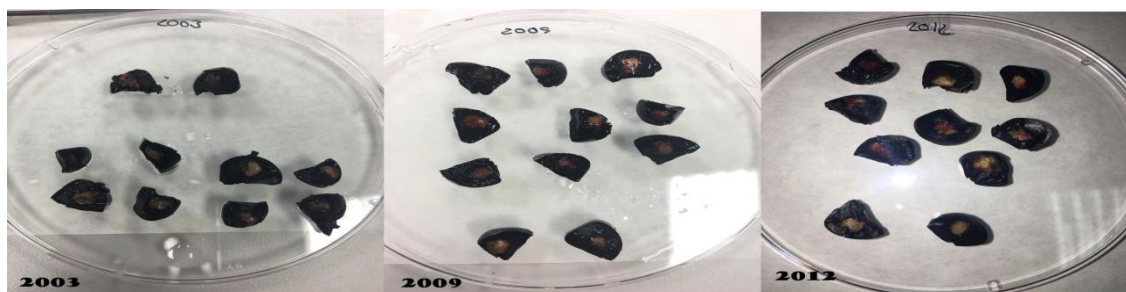


Figura 28. Resultados de la prueba de tetrazolio en lote 2

6. Conclusiones

Este trabajo realizado tiene una gran utilidad para la gestión del Banco de semillas del Parc Natural de l'Albufera, así como para otros bancos de semillas a corto plazo. El mantenimiento de unas colecciones de semillas viables es fundamental para optimizar el espacio de almacenamiento de los bancos de germoplasma.

Los resultados obtenidos indican un comportamiento muy diferente de las cuatro especies estudiadas. *Lotus creticus* es la especie que mejor mantiene la capacidad de germinación ya que las semillas más antiguas del banco, recolectadas en 1991 germinan en un 80%. La variación entre los porcentajes de germinación de las semillas recolectadas en diferentes años no se debe a la antigüedad de las semillas, sino a otros tipos de factores, como por ejemplo podrían ser las temperaturas medias mensuales, la cantidad de precipitación y los niveles de déficit hídrico en el periodo de floración, que nos proponemos estudiar en una ampliación de este trabajo.

En segundo lugar se sitúa *Medicago marina*, cuyas semillas recogidas en 1991 aún germinan en un 30%. Sin embargo, en esta especie la capacidad germinativa disminuye drásticamente en las colecciones previas al año 2000. Las semillas recogidas en 2003 y años anteriores de *Malcomia littorea* y *Pancratium maritimum* han perdido por completo la capacidad de germinación. En la primera de esta dos especies la disminución es notable a partir del lote de 2007, cuando germinan solamente la mitad de las semillas, mientras que en *Pancratium* la capacidad de germinación se mantiene muy poco tiempo (ya las semillas de 2009 germinan solamente en un 30%).

Como alternativa a los ensayos de germinación se puede utilizar el ensayo de tetrazolio, que no requiere un periodo tan largo de observación, pero presenta el inconveniente de la toxicidad y es más laborioso, al necesitarse la eliminación parcial de la cubierta seminal. Por este motivo se recomienda el estudio de la capacidad germinativa a través de ensayos de germinación.

Además de indicar el tiempo idóneo de almacenamiento de las semillas de las cuatro especies, el estudio realizado permite la elaboración de unos protocolos óptimos de germinación para cada una de ellas.

Para *Lotus creticus* se recomienda un pretratamiento realizando primero una escarificación con ácido sulfúrico concentrado durante 1 hora, una desinfección con lejía durante 15 minutos a una concentración de 2,8% y la imbibición durante 24 horas, se recomienda también la germinación en condiciones de 24 horas de oscuridad a 20 °C con una humedad del 70%, en placa petri con 20 mL de agua destilada y papel de filtro.

Para *Medicago marina* se recomienda una escarificación con ácido sulfúrico concentrado durante 30 minutos, una desinfección con lejía durante 30 minutos con una concentración de 1,9% y una imbibición de 24 horas, se recomienda también la germinación en condiciones de

24 horas de oscuridad a 20 °C con una humedad del 70%, en placa petri con 20 mL de agua destilada y papel de filtro.

Para *Malcolmia littorea* se recomienda una desinfección con lejía durante 15 minutos con una concentración de 1% y una imbibición de 24 horas, se recomienda también la germinación en condiciones de 24 horas de oscuridad a 20 °C con una humedad del 70%, en placa petri con 20 mL de agua destilada y papel de filtro.

Para *Pancratium maritimum* se recomienda preparar una disolución para desinfectar las semillas con lejía al 1,9% más un agente mojante al 0,1% y sumergirlas durante 30 minutos, después se recomienda embeber las semillas durante 24 horas, se recomienda también la germinación con un fotoperiodo de 12 h a 20 °C con una humedad del 70%, en placa petri con 20 mL de agua destilada y papel de filtro.

7. Bibliografía

- Al Hassan M, Pacurar A, Gaspar A, Vicente O, Boscaiu M. (2014) Growth and reproductive success under saline conditions of three *Plantago* species with different levels of stress tolerance. *Not Bot Horti Agrobo.* 42: 180–186.
- Balestri, E., & Cinelli, F. (2004). Germination and early-seedling establishment capacity of *Pancratium maritimum* L. (Amaryllidaceae) on coastal dunes in the north-western Mediterranean. *Journal of Coastal Research*, 761-770.
- Ballesteros D, Meloni F, Bacchetta G (Eds.).(2015). *Manual para la propagación de plantas autóctonas mediterráneas seleccionadas*. Ecoplantmed, ENPI, CBC-MED.
- Bartolomé, C., Álvarez, J., Vaquero, J., Costa, M., Casermerio, M.A., Giraldo, J., & Zamora, J. (2005). *Los tipos de Hábitat de Interés Comunitario de España*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 13-14.
- Benvenuti, S. (2016). Seed ecology of Mediterranean hind dune wildflowers. *Ecological Engineering* 91, 282-293.
- Caballero García, M., & Guerrero, C. (2009, June). Estudio para la evaluación digitalizada del test de viabilidad al tetrazolio en semillas forestales sometidas a distintos niveles de desecación. *Congresos Forestales*.
- Costa, M., & Mansanet, J. M. (1980). Los ecosistemas dunares levantinos: la Dehesa de la Albufera de Valencia. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 37 (2), 277-299.
- De Vitis, M., Seal, C. E., Ulian, T., Pritchard, H. W., Magrini, S., Fabrini, G., & Mattana, E. (2014). Rapid adaptation of seed germination requirements of the threatened Mediterranean species *Malcolmia littorea* (Brassicaceae) and implications for its reintroduction. *South African Journal of Botany* 94:46-50.
- Deusa Miret, A. (2011). *Relación entre la distribución de algunas especies halófilas y el banco de semillas del suelo en una mallada de la Devesa del Saler*. Universitat Politècnica de València (TFC).
- European Commission. (08 de 06 de 2016). The Habitats Directive. Recuperado de <http://ec.europa.eu/environment/nature/legislation/habitatsdirective> el 05 de 07 de 2018.
- Ferrer-Gallego, P. P., Ferrando, I., Gago, C., & Laguna, E. (2013). *Manual para la conservación de germoplasma y el cultivo de la flora valenciana amenazada* CITMA-Generalitat Valenciana, Valencia.
- Gallo, C., França-Neto, J. B., Arango, M., Gonzalez, S., Francomano, V., Carracedo, C., & Craviotto, R. (2015) *Validación de la Prueba de Tetrazolio como Método de Vigor para semillas de Glycine max*. INTA EEA.
- García, M. A. E. (2017). *Tolerancia al estrés hídrico y salino en la especie invasora Cortaderia selloana*. Universitat Politècnica de València (TFG).
- Gil, J. A.F., Yabor, L., Nadal, A. B., Collado, F., Ferrer-Gallego, P., Vicente, O., & Boscaiu, M. (2017). A methodological approach for testing the viability of seeds stored in short-term Seed Banks. *Notulae Scientia Biologicae*, 9(4):563-570.
- Grassi, F., Cazzaniga, E., Minuto, L., Peccenini, S., Barberis, G., & Basso, B. (2005). Evaluation of biodiversity and conservation strategies in *Pancratium maritimum* L. for the Northern Tyrrhenian Sea. *Biodiversity & Conservation*, 14(9):2159-2160.

- Grupo de innovación educativa en Biodiversidad y Biología vegetal. UPM [Universidad Politécnica de Madrid]. (2015-11-15) *Práctica de viabilidad de las semillas* [Archivo de vídeo]. Recuperado de https://www.youtube.com/watch?v=x3H_JKjJ4FE el 08-06-2018
- Herranz, G. L. (2015). La vegetació al Gorg de Creixell. *Recull de treballs*, 16:278-279.
- Ibero-Rest. Restauración ecológica (2011). *IberoRest*. Recuperado el 10/06 /2018, de Ibero-Rest: <http://ibero-rest.com>
- Olmos, J. M. B., Durà, V. B., Rosique, F. C., Crespo, R. M. M., Caballer, A. M., Trenor, A. Q. & Matarredona, A. V. (2014). Restauración de los hábitats dunares de la Devesa de l'Albufera de valencia. En: *Evaluación ambiental integral de ecosistemas degradados de Iberoamérica: experiencias positivas y buenas prácticas*, 9-132. RED CYTED 411RT0430
- Parcs naturals de la Comunitat Valenciana. (2009). Parc Natural de l'Albufera. Recuperado de <http://www.albufera.com/> el 05/07/2018.
- Pérez Arcoiza, A. (2015). *Restauración ecológica de sistemas dunares: Biología de semillas y desarrollo de protocolos de cultivo*. Universidad de Oviedo (TFM)
- Rejili, M., Vadel, A. M., Guetet, A., Mahdhi, M., Lachiheb, B., Ferchichi, A., & Mars, M. (2010). Influence of temperature and salinity on the germination of *Lotus creticus* (L.) from the arid land of Tunisia. *African journal of ecology*, 48:2, 329-337.
- Rivas-Martínez, S. & Armaiz, C. (1984). Bioclimatología y vegetación en la Península Ibérica. "*Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques*", 131:2-4, 110-120.
- Ruiz, M. A. (2009). El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: cebadilla chaqueña. *EEA INTA Anguil Argentina* 77: 5-7.
- Ruiz, R., & Bertha, J. (2000). *Efecto del BAP y 2, 4-D en la inducción de organogénesis indirecta in vitro de Anthurium andraeanum L.* Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano (Tesis)