

ÍNDICE



ÍNDICE:

1. INTERÉS Y OBJETIVOS.....	12
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Restauración ecológica de áreas salinas.....	16
2.1.1. Salinidad del suelo.....	16
2.1.2. Efecto de la salinidad en el desarrollo de plantas halófitas.....	19
2.1.3. Efecto de la salinidad y la temperatura en la germinación de especies halófitas.....	19
2.2. Técnicas para la jardinería en zonas áridas.....	23
2.2.1. Condiciones para el trasplante y crecimiento vegetal en xerojardinería y paisajismo en clima semiárido.....	23
2.2.2. Elección del material vegetal.....	24
2.2.3. Manejo del riego.....	26
2.2.4. Control de la temperatura.....	28
2.2.5. Manejo de la humedad del aire.....	29
2.2.6. Enriquecimiento del aire con CO ₂	30
2.2.7. Manejo de la intensidad luminosa y el fotoperiodo.....	31
2.2.8. Inoculación con micorrizas.....	31
2.2.9. Manejo de la fertilización.....	32
2.2.10. Empleo de fitoreguladores.....	33
2.3. Características principales de las semillas de plantas angiospermas.....	33
2.3.1. La flor de las angiospermas.....	33
2.3.2. Biología de las semillas.....	34
2.3.3. Morfología exterior.....	34
2.3.4. Estructura básica de las semillas de las angiospermas.....	35

2.3.5. Reservas nutritivas y otras sustancias.....	36
2.3.6. Evolución de la formación de las semillas.....	38
2.3.7. Fecundación y maduración.....	39
2.3.8. Letargo.....	41
2.3.9. Conservación de las semillas.....	47
2.3.10. Recolección y gestión.....	50
2.3.11. Momento idóneo para la recolección.....	51
2.3.12. La prueba del corte.....	52
2.3.13. Recolección de pliegos de herbario y/o material vivo.....	53
2.3.14. Almacenamiento.....	53
2.3.15. Conservación de las accesiones recolectadas en el campo.....	54
2.3.16. Extracción de semillas de los frutos.....	55
2.3.17 Estado fitosanitario del material recogido.....	55
2.3.18. Tratamiento del germoplasma antes de su conservación.....	56
2.3.19. El factor baja temperatura.....	64
2.2.20. La necesidad de nuevas herramientas de conservación.....	65
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	69
3.1. Material vegetal.....	70
3.2. Lugar de recogida del material vegetal.....	75
3.3. Extracción de semillas.....	80
3.3.1. Material utilizado para la extracción de semillas.....	80
3.3.2. Método de extracción.....	80
3.4. Preparación del ensayo.....	82
3.4.1. Material para la germinación.....	82
3.4.2. Soluciones.....	82

3.4.3. Montaje del ensayo en placas Petri.....	83
3.4.4. Montaje del ensayo en macetas troncocónicas.....	84
3.5. Parámetros medidos.....	89
3.6. Análisis estadístico de los datos.....	90
4. RESULTADOS.....	93
4.1. Efectos de la salinidad y la temperatura sobre los parámetros fisiológicos.....	94
4.2. Efectos de la salinidad y distintos regímenes de temperatura sobre la evolución de la germinación.....	94
4.3. Efectos sobre el porcentaje final de germinación.....	98
4.4. Tiempo medio de germinación.....	103
4.5. Efectos sobre los parámetros de crecimiento: Pesos frescos.....	105
4.6. Efectos sobre los parámetros de crecimiento: Pesos secos.....	109
4.7. Variación entre el peso fresco y el peso seco.....	113
5. DISCUSIÓN.....	114
6. COCLUSIONES.....	120
7. BIBLIOGRAFÍA.....	122

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1: Principales tipos de embriones según su posición en el interior de la semilla: 1 a 4) basales; 5) periférico; 6 a 10) axiales; 7 a 10) foliosos. 1) rudimentario; 2) ancho; 3) capitado; 4) lateral; 5) periférico; 6) lineal; 7) espatulado; 8) curvado; 9) plegado; 10) invertido.....35

Figura 2: Localización del Término Municipal de Vícar en la provincia de Almería.....76

Figura 3: Diagrama termoplubiométrico correspondiente a la estación meteorológica del aeropuerto de Almería (Rivas-Martínez & Rivas Sáenz, 1996-2009).....77

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Comportamientos de las semillas ortodoxas durante la conservación a bajas temperaturas, en función del contenido de humedad.....	60
Tabla 2: Datos de temperatura y precipitación correspondientes a la estación meteorológica del aeropuerto de Almería (Rivas-Martínez & Rivas Sáenz, 1996-2009).....	77
Tabla 3: Porcentaje de germinación de <i>Limonium insigne</i> cada 5 días durante el primer ensayo a las diferentes concentraciones salinas.....	94
Tabla 4: Porcentaje de germinación de <i>Limonium insigne</i> cada 5 días durante el segundo ensayo a las diferentes concentraciones salinas.....	95
Tabla 5: Porcentaje de germinación de <i>Limonium insigne</i> cada 5 días durante el tercer ensayo a las diferentes concentraciones salinas.....	96
Tabla 6: Porcentaje de germinación de <i>Limonium insigne</i> cada 5 días durante el cuarto ensayo a las diferentes concentraciones salinas.....	97
Tabla 7: Efecto de la temperatura, la salinidad y el conjunto de ambas en el porcentaje final de germinación de las semillas de <i>Limonium insigne</i> . Donde gl= grados de libertad y F= valor estadístico de contraste.....	102
Tabla 8: Medias para las cuatro repeticiones de los tiempos medios de germinación en semillas de <i>Limonium insigne</i>	104
Tabla 9: Efecto de la temperatura, la salinidad y el conjunto de ambas en el tiempo medio de germinación de las semillas de <i>Limonium insigne</i> . Donde gl= grados de libertad y F= valor estadístico de contraste.....	105
Tabla 10: Efecto de la salinidad en el peso fresco medio total de plantas de <i>Limonium insigne</i> . Donde gl= grados de libertad y F= valor estadístico de contraste.....	107
Tabla 11: Efecto de la salinidad en el peso fresco de la parte aérea de plantas de <i>Limonium insigne</i> . Donde gl= grados de libertad y F= valor estadístico de contraste.....	108
Tabla 12: Efecto de la salinidad en el peso fresco de la parte radical de plantas de <i>Limonium insigne</i> . Donde gl= grados de libertad y F= valor estadístico de contraste.....	109
Tabla 13: Efecto de la salinidad en el peso seco medio total de plantas de <i>Limonium insigne</i> . Donde gl= grados de libertad y F= valor estadístico de contraste.....	111

Tabla 14: Efecto de la salinidad en el peso seco de la parte aérea de plantas de *Limonium insigne*. Donde gl= grados de libertad y F= valor estadístico de contraste.....112

Tabla 15: Diferencia de peso de las plántulas de *Limonium insigne* tras su introducción en secadora a 60 °C durante 24 horas, y relación entre el peso de la parte aérea y el peso de la parte radical.....113

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS:

Fotografía 1: Prueba del corte en un semilla de <i>Pancratium maritimum</i> L.....	53
Fotografía 2: Equipamiento para la deshidratación de BG-SAR: medidor con los valores ambientales de humedad relativa y temperatura (primera fotografía); deshumidificador químico (segunda fotografía); y material almacenado (última fotografía).....	61
Fotografía 3: Diferentes tipos del gel sílice autoindicadores.....	62
Fotografía 4: Tarro con gel de sílice en el fondo.....	63
Fotografía 5: Viales de polipropileno para crioconservación. Se puede apreciar el material vegetal (en este caso yemas vegetativas) embebido en una solución crioprotectora antes de su inmersión en nitrógeno líquido.....	67
Fotografía 6: <i>Limonium insigne</i>	70
Fotografía 7: Detalle de los tallos y ramas de <i>Limonium insigne</i>	71
Fotografía 8: Hojas de <i>Limonium insigne</i>	72
Fotografía 9: Inflorescencia de <i>Limonium insigne</i>	72
Fotografía 10: Detalle de espigas de <i>Limonium insigne</i>	73
Fotografía 11: Flores de <i>Limonium insigne</i>	73
Fotografía 12: Detalle de la flor de <i>Limonium insigne</i>	74
Fotografía 13: Detalle de la semilla de <i>Limonium insigne</i> extraída en laboratorio.....	74
Fotografía 14: Distribución geográfica de <i>Limonium insigne</i> en España (Anthos, 2010).....	75
Fotografía 15: Vista del Cerro de Los Lobos donde fueron recolectadas las plantas de <i>Limonium insigne</i>	78
Fotografía 16: Ladera del Cerro de Los Lobos donde se pueden apreciar plantas de <i>Limonium insigne</i> en flor.....	79
Fotografía 17: Flores de <i>Limonium insigne</i> secándose en laboratorio tras recolección en campo.....	80
Fotografía 18: Detalle de placa Petri con semillas de <i>Limonium insigne</i> extraídas de sus flores.....	81

Fotografía 19: Detalle de semillas de <i>Limonium insigne</i> germinadas.....	84
Fotografía 20: Maceta troncocónica con arena de cuarzo pesada en balanza de precisión.....	85
Fotografía 21: Macetas troncocónicas regadas con la misma solución dispuestas en bandejas.....	86
Fotografía 22: Plantas de <i>Limonium insigne</i> germinadas en arena de cuarzo.....	87
Fotografía 23: Detalle de plantas de <i>Limonium insigne</i> germinadas en arena de cuarzo.....	87
Fotografía 24: Colocación según solución de riego y maceta de plantas de <i>Limonium insigne</i> sobre papel de filtro.....	88
Fotografía 25: Separación de partes aéreas y partes radicales de plantas de <i>Limonium insigne</i>	89

ÍNDICE DE GRÁFICAS:

Gráfica 1: Evolución del porcentaje de germinación de <i>Limonium insigne</i> a temperaturas 20/10 °C y a distintas concentraciones salinas.....	94
Gráfica 2: Evolución del porcentaje de germinación de <i>Limonium insigne</i> a temperaturas 25/15 °C y a distintas concentraciones salinas.....	96
Gráfica 3: Evolución del porcentaje de germinación de <i>Limonium insigne</i> a temperaturas 30/20 °C y a distintas concentraciones salinas.....	97
Gráfica 4: Evolución del porcentaje de germinación de <i>Limonium insigne</i> a temperaturas 35/25 °C y a distintas concentraciones salinas.....	98
Gráfica 5: Representación del porcentaje de germinación total de <i>Limonium insigne</i> para cada concentración salina al final del ensayo correspondiente a las temperaturas de 20/10 °C.....	99
Gráfica 6: Representación del porcentaje de germinación total de <i>Limonium insigne</i> para cada concentración salina al final del ensayo correspondiente a las temperaturas de 25/15 °C.....	100
Gráfica 7: Representación del porcentaje de germinación total de <i>Limonium insigne</i> para cada concentración salina al final del ensayo correspondiente a las temperaturas de 30/20 °C.....	101
Gráfica 8: Representación del porcentaje de germinación total de <i>Limonium insigne</i> para cada concentración salina al final del ensayo correspondiente a las temperaturas de 35/25 °C.....	102
Gráfica 9: Comparativa de los porcentajes de germinación finales de <i>Limonium insigne</i> para cada una de las concentraciones salinas obtenidos en cada uno de los ensayos realizados (20/10 °C, 25/15 °C, 30/20 °C y 35/25 °C).....	103
Gráfica 10: Comparativa de los tiempos medios de germinación de <i>Limonium insigne</i> para cada una de las concentraciones salinas obtenidos en cada uno de los ensayos realizados (20/10 °C, 25/15 °C, 30/20 °C y 35/25 °C).....	104
Gráfica 11: Representación de las medias de los pesos frescos totales de <i>Limonium insigne</i> para cada una de las concentraciones salinas.....	106
Gráfica 12: Representación de las medias de los pesos frescos de la parte aérea de <i>Limonium insigne</i> para cada una de las concentraciones salinas.....	108

Gráfica 13: Representación de las medias de los pesos frescos de la parte radical de *Limonium insigne* para cada una de las concentraciones salinas.....109

Gráfica 14: Representación de las medias de los pesos secos totales de *Limonium insigne* para cada una de las concentraciones salinas.....110

Gráfica 15: Representación de las medias de los pesos secos de la parte aérea de *Limonium insigne* para cada una de las concentraciones salinas.....111

Gráfica 16: Representación de las medias de los pesos secos de la parte radical de *Limonium insigne* para cada una de las concentraciones salinas.....112

1- INTERÉS Y OBJETIVOS



La Desertificación es la degradación de la tierra en zonas áridas, semiáridas y subhúmedas secas como resultado de diversos factores, tales como las variaciones climáticas y las actividades humanas, según la definición del artículo 1 de la Convención de Naciones Unidas de Lucha contra la Desertificación (ONU, 1994).

En España se observa que toda la mitad sur, a excepción de las cadenas montañosas más elevadas, la meseta norte, la cuenca del Ebro y la costa catalana se encuentran dentro de la categoría de tierras áridas, semiáridas y subhúmedas secas y, por lo tanto, estas áreas son susceptibles de desarrollar el fenómeno de desertificación.

El Almería esto es un problema real puesto que, además de encontrarnos en una de las regiones con menor índice de precipitaciones de toda Europa, se ha generado un crecimiento muy importante en el número de hectáreas dedicadas a la agricultura intensiva gracias al uso de invernaderos. El problema básico en este sentido, radica en las ingentes cantidades de agua que son destinadas a este tipo de actividad, lo cual, favorece el anteriormente nombrado proceso de desertificación. Además, nos encontramos con el problema de la construcción en zonas de riesgo, puesto que toda esta evolución urbanística, por norma general enfocada a fines turísticos, lleva consigo también una elevada demanda de recursos hídricos y un aumento de la erosión del suelo.

Las previsiones estudiadas sobre el cambio climático afirman que dichos problemas se agravarán en el futuro de forma generalizada y, especialmente, en la España de clima mediterráneo seco y semiárido (MARM, 2011).

Uno de los principales causantes de la degradación del suelo es el incremento de la salinidad, tanto del agua como del suelo mismo. Dichas sales tienen su origen en procesos naturales, tales como el deterioro y solución de rocas y, además, por la evapotranspiración de las plantas (Shannon, 1984).

La salinización es un proceso que se produce con relativa facilidad en las zonas áridas (Solé-Benet & Cantón-Castilla, 2005), por lo que Almería es susceptible, si cabe, en mayor medida.

La consecuencia del incremento en la salinidad es la presencia en exceso de iones en el suelo, lo cual tiene unos efectos inmediatos en la absorción y acumulación de los mismos por parte de la planta, produciendo un cambio apreciable de la homeostasis iónica-osmótica del vegetal y de su régimen hídrico. Estos cambios, provocados en el metabolismo de las plantas por acción del estrés salino, varían con las especies, variedades, circunstancias climáticas y nutrición de cultivos (Delgado, 1992).

Es por ello que deben de ser estudiadas aquellas especies vegetales que estén adaptadas a este tipo de condiciones, puesto que son las mejor preparadas para sobrevivir en ambientes donde la salinidad, tanto del suelo como del agua, es un hecho en muchas zonas de nuestras latitudes.

El conocimiento de este tipo de plantas debe inculcarnos un especial interés en el mantenimiento y respeto hacia las mismas, pues son las más capacitadas para menguar el proceso de desertificación. Y nuestra actuación no debería de quedar ahí, sino que, además, sería muy recomendable su uso en restauraciones y en el ajardinamiento de nuestros parques, puesto que son especies adaptadas a las condiciones climáticas y edáficas de nuestras latitudes, lo cual conlleva, entre otras cosas, a una notable disminución en el uso de unos recursos (hídricos sobre todo) que son cada vez más caros de obtener.

El proceso de restauración (Society of Ecological Restoration, 2004) propiamente dicho, es inducido para recuperar las condiciones ambientales de un ecosistema que ha sido perturbado por la acción humana. El objetivo de dicha restauración es generar un sistema con gran diversidad y similar, en cuanto a composición y estructura, al original. Además, el sistema ha de ser sostenible por sí mismo tanto en términos ecológicos como en socioeconómicos.

Este tema es de gran importancia debido a la crisis de recursos naturales en la que nos hallamos inmersos y que anteriormente fue mencionado. El cambio climático es un hecho probado que nos afecta a todos y, gracias a la restauración, se pueden paliar sus efectos con un uso responsable del agua y al aprovechamiento de especies perfectamente adaptadas a nuestra zona, y que pueden cumplir sin problemas su función como ornamentales.

En los saladares de Almería son frecuentes especies como *Sarcocornia spss.*, *Limonium spss.*, *Juncus spss.*, *Tamarix spss.*, etc. Todas estas especies se podrían utilizar tanto en la restauración de espacios naturales que poseen suelos salinos como en el ajardinamiento de zonas urbanas y periurbanas en las que la existencia de dichos suelos no permite, o haría muy difícil, un adecuado crecimiento de otro tipo de especies ornamentales; las cuales, además, en muchos casos requieren de un mantenimiento y volúmenes de recursos hídricos que las convierten en económica y ambientalmente poco viables.

Por todos estos motivos el objetivo de este Trabajo Monográfico es el estudio de la influencia de la salinidad y temperatura en la germinación de la especie *Limonium insigne* (endemismo del sureste peninsular) para su posterior uso tanto en procesos de restauración como de ajardinamiento de áreas salinas y/o zonas verdes en las que el uso del agua para riego sea un factor limitante, ya que, además de ser una especie adaptada a nuestro clima, posee un evidente valor estético a la hora de embellecer parques y zonas de uso lúdico. Además, se procederá al estudio del crecimiento de las plantas en macetas con el fin de estudiar los parámetros fisiológicos de *Limonium insigne* tras su germinación.

Por otro lado, la importancia del estudio de esta planta también radica en la inexistencia de datos acerca de su germinación.

2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



2. 1. Restauración ecológica de áreas salinas

La restauración ecológica es el proceso de alteración intencional de un hábitat para establecer un ecosistema definido, natural e histórico local. El objetivo de este proceso es imitar la estructura, la función, la diversidad y la dinámica del ecosistema original (Jackson *et al.*, 1995).

El proceso de restauración es inducido por el hombre para recuperar las condiciones ambientales de un ecosistema perturbado, cuyo principal objetivo es generar un sistema altamente diverso y similar, en cuanto a composición y estructura, al original. Este sistema debe ser auto sustentable no solo en términos ecológicos, sino también sociales, garantizando así su conservación.

Con el fin de restaurar y preservar las comunidades vegetales presentes en áreas salinas, los estudios biológicos y ambientales son necesarios para entender su estructura y función. La germinación y el establecimiento de las plántulas de las especies vegetales y su integración de estas comunidades son aspectos clave (Martínez-Sánchez *et al.*, 2006).

El conocimiento del éxito de recuperación de la vegetación tras los daños provocados por la mano del hombre, así como la cantidad de especies y su potencial de colonización, son básicos a la hora de realizar una restauración ecológica. Además, también es muy importante el estudio tanto de dispersión como de germinación para conocer la capacidad de establecimiento de las plantas, especialmente en las marismas, al tener dichas plantas un banco de semillas transitorio. Mediante el examen de múltiples factores que suceden después de la dispersión de las semillas, la salinidad y el éxito de la germinación, podemos considerar las condiciones y el medio ambiente para tener éxito en la restauración y hacer predicciones sobre la colonización natural de especies en áreas salinas (Elsley-Quirk *et al.*, 2009).

Las especies halófitas pueden utilizarse como cultivos potenciales que pueden ayudar a la recuperación de los ecosistemas de zonas intermareal y el desarrollo de zonas salinas (Song *et al.*, 2008).

2. 1. 1. Salinidad del suelo.

La salinidad del suelo es el principal problema de las zonas áridas que conduce a la desertificación de la tierra. La calidad del suelo se reduce, limita el crecimiento de los cultivos, limita las producciones agrícolas que conducen al abandono de suelos agrícolas y también supone un riesgo ambiental importante al empeorar la calidad del agua y disminuir la vida silvestre (Amezketta, 2006). A lo largo de los últimos años

estamos asistiendo a un incremento de la salinidad de los suelos y de la temperatura en el conjunto de la Península Ibérica, y especialmente en el sureste ibérico (Caro-Fernández, 1969). En España sobre el 3% de 3,5 millones de hectáreas son tierras de regadío que están afectadas y un 15 % se encuentran gravemente afectadas por la sal (European Commission, 2002; Amezketa, 2006). Las causas que originan la acumulación de las sales en el suelo son diversas, por lo que según sea el proceso seguido y las transformaciones posteriores experimentadas, el suelo salino originado tendrá unas características peculiares, tanto en su composición química como en sus propiedades físicas (Caro-Fernández, 1969).

El cultivo de invernaderos en España, siendo Almería la provincia con mayor superficie de cultivo intensivo bajo plástico, tiene como consecuencia la utilización de ingentes cantidades de agua (en la mayoría de los casos salina) y fertilizantes. El hecho de cultivar reiteradamente en la misma zona con el mismo manejo puede dar lugar a una salinización gradual el suelo. Este proceso de salinización se agrava en regiones áridas y semiáridas debido a que la mayoría de aguas que se utilizan para el riego presentan contenidos elevados de sales solubles (Fernández *et al.*, 1981). La salinidad primaria o natural del suelo se produce en aquellas zonas donde la roca madre es rica en sales y la tasa de evapotranspiración es mayor con respecto a las tasas de precipitaciones sobre todo en zonas áridas y semiáridas (Amezketa, 2006).

El origen primario de las sales solubles existentes en los suelos es la descomposición de las rocas, ya que el suelo mismo se define como el resultado de la evolución natural de una roca bajo la influencia de factores físicos, químicos y biológicos. Las rocas madres, mediante procesos de descomposición química, hidrólisis, hidratación, solución, oxidación, carbonatación, etc., pueden liberar sales solubles. Estas sales están constituidas principalmente por aniones cloruro, sulfato y en casos especiales por nitrato y borato, y los cationes sodio, calcio, magnesio y potasio. Sin embargo, en raras ocasiones solamente las transformaciones sufridas por la roca madre, originan "in situ" un suelo salino. Existen una serie de procesos de transporte y acumulación de sales de índole geográfica y geoquímica que conducen, en períodos más o menos prolongados, a la salinización de determinadas áreas (Caro-Fernández, 1969).

Los suelos salinos tienden a aumentar su salinidad y los potenciales hídricos son más negativos en verano que en otras estaciones (Ungar, 1987; Vicente *et al.*, 2007). El incremento de la salinidad en el suelo en verano está relacionado con un aumento en el contenido de cloruros (Cl⁻), sodio (Na⁺), sulfatos (SO₄⁻²), calcio (Ca²⁺), magnesio (Mg²⁺) y potasio (K⁺). Sin embargo, los porcentajes relativos de Ca²⁺ y K⁺ disminuyen cuando la salinidad aumenta dando lugar a un desequilibrio a favor de los cationes más tóxicos como Na⁺ y Mg²⁺ (Álvarez-Rogel *et al.*, 2000; Álvarez-Rogel *et al.*, 2006; Vicente, 2007).

La acumulación de altas concentraciones de aniones cloruro (Cl^-) y cationes de sodio (Na^+) en los vegetales provoca una serie de alteraciones bioquímicas y fisiológicas que desembocan en la inhibición del crecimiento de éstas (Martínez-Sánchez *et al.*, 2008). El estrés que sufre la planta debido a las altas concentraciones salinas interrumpe la homeostasis en el potencial hídrico y en la distribución de iones. Esta interrupción de la homeostasis se produce tanto a nivel celular como en el resto de la planta. Los cambios drásticos de iones y agua producidos en la homeostasis de la planta conduce al daño molecular, detención del crecimiento e incluso la muerte (Zhu, 2001). También tiende a acumularse en los tejidos aminoácidos y amidas, perjudicando al metabolismo de las proteínas y aumentando la hidrólisis de las ya existentes, lo que se traduce en una acumulación de diamidas tóxicas. Las grandes concentraciones de sodio son tomadas por el vegetal a través de las raíces, produciendo así daños nutritivos que repercuten en la absorción de estos. Esto es debido a que disminuye la absorción del agua por las raíces del vegetal y a fenómenos de antagonismo y sinergismo en la absorción y transporte de iones (Delgado, 1992).

La gran diversidad de especies vegetales que soportan condiciones de estrés salino hace que existan numerosos estudios que analizan las implicaciones de la salinidad sobre el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales (Navidoo, 1994; Shannon & Grieve, 1999; Khan *et al.*, 2000; Zhu, 2001; Redondo-Gómez *et al.*, 2004; Vicente *et al.*, 2004; De Pascale *et al.*, 2005; Khan & Qaiser, 2006; Vicente *et al.*, 2007; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2008; Al-Sherif, 2009; Elsey-Quirk, 2009; Guma *et al.*, 2010; Nedjimi, 2009; Pangua *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010).

Muchos estudios están dedicados a determinar las condiciones óptimas de germinación para cada especie pudiendo facilitar la gestión de su crecimiento en zonas de suelos salinos (Greenwood & MacFarlane, 2006). La germinación de las especies que crecen en estas zonas está influenciada por la combinación de varios factores ambientales, entre los que se encuentran la salinidad del suelo, la temperatura y la luz, siendo los de mayor influencia en la selección del momento más apropiado para que se lleve a cabo este proceso, permitiendo a las plantas responder a las variaciones estacionales según las condiciones exteriores (Ekstam *et al.*, 1999, Khan *et al.*, 2000; Kellogg *et al.*, 2003; Greenwood & MacFarlane, 2006). De hecho, algunas semillas halófitas tienen la propiedad de mantenerse viables durante periodos de altas concentraciones salinas hasta que dichas concentraciones disminuyen por la lavado del agua de la lluvia, favoreciendo entonces la germinación (Zia & Khan, 2004). Esto permite a las plantas completar la etapa crítica de su ciclo de vida durante el tiempo en el cual es estrés salino está reducido (Badger & Ungar, 1989).

La mayoría de los estudios que se realizan para determinar los efectos de la salinidad llegan a un mismo término, a saber, la salinidad provoca una disminución en el crecimiento de la planta, de la raíz y de las hojas provocando también una reducción

de su transpiración y fotosíntesis (Khan *et al.*, 2000; Zhu, 2001; Redondo-Gómez *et al.*, 2004; Vicente *et al.*, 2004; Vicente *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2008; Guma *et al.*, 2010; Pangua *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). Además la salinidad del suelo se ha considerado tradicionalmente como uno de los factores físicos más importantes en la zonación de plantas de los saladares (Egan & Ungar, 2000; Vicente *et al.*, 2007).

2. 1. 2. Efecto de la salinidad en el desarrollo de plantas halófitas.

Se sabe que las plantas halófitas muestran tolerancia a la salinidad porque, al tomar agua, mantienen bajo el potencial osmótico a través de la acumulación de iones inorgánicos (Bradley & Morris, 1991). Otra de las características de este tipo de plantas es que tienen la capacidad de mantener las diásporas (unidades de dispersión) viables durante largos periodos de exposición a hiper-salinidad, e iniciar la germinación cuando la salinidad disminuye (Chapman, 1960; Wei *et al.*, 2008; Woodel, 1985); lo cual también es muy interesante en el tema que nos ocupa, puesto que el uso de agua se vería considerablemente reducido.

De hecho, Keiffer & Ungar (1997) demostraron que, cuando se producía un aumento de los recursos hídricos y, por tanto, una disminución de la salinidad en el suelo, se genera un alto porcentaje en la germinación; hecho que suele coincidir con el final del invierno y el principio de la primavera, época en la que, en zonas con lluvias invernales, se lava el suelo.

Por otro lado, distintos estudios ponen de manifiesto que las semillas de plantas halófitas se comportan de manera parecida frente a la salinidad: se retrasa el comienzo de la germinación, la germinación se reduce y algunas semillas permanecen dormidas debido a los bajos potenciales de agua en altos niveles salinos (Rubio-Casal *et al.*, 2003; Tobe *et al.*, 2001).

2. 1. 3. Efecto de la salinidad y la temperatura en la germinación de especies halófitas.

Nos encontramos con gran cantidad de estudios centrados en los efectos de la salinidad sobre la germinación de las semillas (Gulzar & Khan, 2001; Pangua *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2008) que nos informan de que un aumento de la salinidad conlleva una disminución de la germinación. Normalmente, la germinación de especies halófitas en el campo está controlada por varios factores ambientales, a saber, la luz (Gutterman, 1992; Huang & Gutterman, 1999), la temperatura (Badger & Ungar, 1989) y la salinidad (Pujol *et al.*, 2000). Sin embargo, existe una gran variedad en cuanto a

tolerancia a la salinidad de las semillas de las especies halófitas durante su germinación (Khan *et al.*, 2002; Ungar, 1996).

La germinación es uno de los procesos más críticos en el ciclo de vida de los halófitos (Ungar, 1995), y varios son los factores que influyen directamente en la misma, entre los que la salinidad del suelo y la temperatura son los de mayor influencia, determinando el éxito posterior del crecimiento de la planta (Delgado & Sánchez-Raya, 2007); y es por ello que centraremos el estudio de *Limonium insigne* en la germinación de sus semillas a diferentes niveles de salinidad y diferentes intervalos de temperatura tanto diurna como nocturna.

La germinación es el proceso que se inicia con la toma de agua por la semilla seca (imbibición) y termina cuando una parte de ésta (eje embrionario en dicotiledóneas o radícula en monocotiledóneas y gimnospermas) atraviesa las estructuras envolventes que la rodean (emergencia) (Azcón-Bieto & Talón, 2008).

Font Quer (2001) define la germinación en los espermatófitos, como el fenómeno en el que embrión contenido en la semilla recobra su actividad vital, amortiguada durante más o menos tiempo. La absorción del agua y una temperatura adecuada la provocan. El embrión y el tejido de nutrición embeben el agua y se hinchan; actúan las enzimas y movilizan las reservas; la plúmula despierta de nuevo a la vida y reviven los meristemos.

La germinación es un proceso complejo durante el cual la semilla debe rápidamente recuperar el estado físico de la maduración de secado, reanudando la actividad del metabolismo, completando todos los procesos esenciales para permitir que surja el embrión. Tras el inicio de la imbibición de la semilla seca se restablece el metabolismo, restituye la integridad química y estructural de las células requiriendo la co-participación de eventos sintéticos y de protección. (Nonogaki *et al.*, 2010).

La salinidad junto con el fuego, las heladas y la sequía son uno de los factores de estrés más estudiados (Álvarez-Rogel *et al.*, 2000; Egan & Ungar, 2000; Khan *et al.*, 2000; Zhu, 2001; Redondo-Gómez *et al.*, 2004; Vicente *et al.*, 2004; Álvarez-Rogel *et al.*, 2006; Vicente *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2008; Guma *et al.*, 2010; Pangua *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). En la germinación de la semilla los factores que influyen son el agua, la temperatura, la luz y la salinidad, que interactúan en el interfaz del suelo (Khan *et al.*, 2000).

Las semillas de zonas salinas están influenciadas por la salinidad durante el momento de dispersión y la fase de germinación. Para la mayoría de especies anuales salinas la germinación de las semillas está más afectada por la salinidad que por la temperatura, el fotoperiodo y la humedad del suelo (Noe & Zeller, 2000; Elsey-Quirk *et al.*, 2009).

La salinidad puede reducir o retrasar la germinación de las semillas. Una alta concentración de sales en el suelo impide la germinación, y las semillas sólo germinan cuando las condiciones de temperatura y edáficas son favorables (Song *et al.*, 2008). De hecho, estudios experimentados por Álvarez-Rogel *et al.* (2000); Egan & Ungar (2000); Khan *et al.* (2000); Zhu (2001); Redondo-Gómez *et al.* (2004); Vicente *et al.* (2004); Álvarez-Rogel *et al.* (2006); Vicente *et al.* (2007); Song *et al.* (2008); Guma *et al.* (2010); Pangua *et al.* (2009) y Li *et al.* (2010) informan que las semillas de las especies halófitas tienen su óptimo de germinación cuando se reduce el estrés salino. La germinación de especies halófitas, en condiciones hipersalinas, toleran concentraciones salinas de 200 Mm hasta 1720 Mm de cloruro sódico, como *Salicornia bigelovii*, *Salicornia europea*, *Salicornia stricta*, *Cressa cretica*, *Suaeda moquinii* y *Arthrocnemum indicum*. La semilla de *Salicornia rubra* podría ser clasificada como la más tolerante a la salinidad durante la germinación (Khan *et al.*, 2000).

La presencia de condiciones hipersalinas en el sustrato durante los meses estivales, determinados por el mayor poder evaporativo del aire cálido, y/o el enterramiento de las semillas por movimientos de arena o actividad de la fauna, puede dar lugar a que estos ambientes sean inapropiados temporalmente para la germinación y normal desarrollo de las plántulas, como han puesto de manifiesto Ungar (1977), Khan & Ungar (1997) y Khan & Gulzar (2003). Sin embargo, la recuperación del poder germinativo en especies tales como *Arthrocnemum macrostachyum*, *Senecio auricula* y *Lepidium cardamine* cuando sus semillas fueron transferidas desde condiciones hipersalinas (NaCl al 4% durante 6 meses) a agua destilada, indica que se trata de una inhibición reversible de naturaleza osmótica (Ungar, 1982; Woodel, 1985; Keiffer & Ungar, 1997) y que las semillas tendrán potencialidad para germinar en su hábitat natural cuando disminuya la salinidad del sustrato, fenómeno que, en ambientes mediterráneos viene determinado habitualmente por las lluvias otoñales e invernales.

Las semillas de las especies halófitas tienen la capacidad de mantener la viabilidad de la germinación durante largos periodos de tiempo cuando están expuestas a condiciones hipersalinas. La germinación de las especies halófitas comienzan cuando se reduce el estrés salino (Gul & Weber, 1999; Khan *et al.*, 2000). Sin embargo, la capacidad de recuperación germinativa difiere de unas especies halófitas a otras tras estar sometidas a dicho estrés salino. Esta variación en la respuesta de la recuperación puede ser debido a la diferencia en el régimen de la temperatura a la que se exponen las semillas, como es el caso de las siguientes especies *Arthrocnemum indicum*, *Haloxylon recurvum*, *Suaeda fruticosa*, *Zygophyllum simplex* y *Triglochin marítima* (Khan *et al.*, 2000). Las semillas retrasan su germinación a baja temperatura pero, incrementando la temperatura, las semillas incrementan la germinación sustancialmente. Estas semillas germinan más rápido con altas temperaturas siendo la germinación máxima ya sea en condiciones salinas o no salinas. Este patrón lo siguen especies como *Limonium stocksii*, cuya mayor germinación bajo condiciones salinas se dio en un intervalo de

temperaturas de 20-30 °C, correspondiendo la mínima temperatura a horas de oscuridad y la máxima a horas de luz (Zia & Khan, 2004).

Por otro lado, estudios realizados en *Arthrocnemum macrostachyum*, *Senecio auricula* y *Lepidium cardamine* por Herranz *et al.* (2004) demostraron que los efectos negativos de la salinidad se manifestaron antes a temperaturas altas.

También es necesario comentar que la baja o nula germinación a temperaturas muy altas (25 °C) observada en algunas especies (por ejemplo, *Centaurea citricolor*, *Linaria hirta*, *Diploaxis ilorcitana*, *Antirrhinum subbaeticum*, *Armeria villosa* subsp. *alcaracensis*, *Moricandia moricandioides*, *Sisymbrium austriacum* subsp. *hispanicum*, *Iberis pectinata*, etc.) apunta hacia una incapacidad para germinar durante los meses de verano aun cuando se produzcan tormentas ocasionales, estrategia adaptativa para evitar la muerte de plántulas como consecuencia de la sequía subsiguiente a un período de humedad estival transitoria (Thompson, 1986).

Todo esto nos viene a indicar que, por norma general y dependiendo de la especie, el incremento de temperatura no favorece la germinación de las semillas de especies halófitas en medios salinos. Así por ejemplo, estudios realizados por Herranz *et al.* (2002) demuestran que taxones tales como *Centaurea citricolor*, *Moricandia moricandioides* subsp. *moricandioides*, *Diploaxis harra* subsp. *lagascana*, *Sisymbrium austriacum* subsp. *hispanicum* y *Linaria hirta* alcanzaron la germinación más alta a temperaturas muy bajas (sometidas a una temperatura constante de 5 °C durante un mes) y/o bajas (10 °C), disminuyendo sensiblemente a partir de 10 °C.

También hay que tener en cuenta que los estudios de germinación realizados en laboratorio en los que se aplican soluciones con distintas concentraciones de cloruro sódico a semillas de especies halófitas, no pueden tomarse como valores completamente extrapolables al campo. Esto es debido a que, en saladares y zonas próximas al ámbito marino, estas plantas obtienen en muchas ocasiones como único recurso hídrico el agua procedente del mar. Tal y como estudiaron Zia & Khan (2008) en *Limonium stocksii*, los experimentos realizados con agua de mar son más representativos, ya que posee cationes como Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺ y Sr²⁺, y aniones tales como Cl⁻, SO₄⁻, Br⁻, F⁻, HCO₃⁻ y H₃BO₃. El resultado de dicho estudio fue que las germinaciones se producían en mayor proporción en agua con NaCl que en agua de mar. Además, las semillas no germinaban a conductividades eléctricas mayores de 30 dS/m en agua de mar y a partir de los 50dS/m en soluciones de NaCl.

2. 2. Técnicas para la jardinería en zonas áridas.

En el diseño y ejecución de proyectos de jardinería y paisajismo en zonas semiáridas es imprescindible evitar, o al menos aliviar, el efecto negativo de las frecuentes situaciones de estrés abiótico durante los procesos de implantación y mantenimiento de las plantas empleadas (Martínez-Sánchez *et al.*, 2008).

Los aspectos a los que es vital prestar atención son la elección apropiada del material vegetal, los métodos de producción y preacondicionamiento en vivero para obtener una plántula que tolere adecuadamente el trasplante y las primeras fases de crecimiento tras él.

Una de las tendencias recientes en jardinería y paisajismo bajo condiciones semiáridas es el uso de diseños con muy bajos o nulos requerimientos de riego, para lo que es necesario utilizar plantas ornamentales adaptadas al déficit hídrico. Algunas administraciones (municipios, confederaciones hidrográficas, etc.) restringen el uso de agua para proyectos de jardinería y paisajismo.

Muchas especies autóctonas son una buena alternativa a especies ornamentales usadas tradicionalmente en climas semiáridos, debido a su buena resistencia a plagas, enfermedades, elevada tolerancia a la salinidad, alta eficiencia en el uso del agua y pautas de crecimiento bien adaptadas a las condiciones edafoclimáticas existentes en estas zonas.

2. 2. 1. Condiciones para el trasplante y crecimiento vegetal en xerojardinería y paisajismo en clima semiárido.

La mayoría de los entornos naturales o naturalizados en zonas con clima semiárido, incluyendo xerojardines y actuaciones de paisajismo urbano y periurbano, están casi continuamente en situación subóptima respecto a uno o más parámetros medioambientales, como disponibilidad de agua, temperatura, humedad ambiental, salinidad del suelo o disponibilidad de nutrientes (Martínez-Sánchez *et al.*, 2008).

Por este motivo, cuando se trasplanta a estos entornos la planta producida en vivero (principalmente si el manejo de las técnicas de cultivo y el control del microclima no han sido los adecuados en esta fase para acondicionar convenientemente a la plántula para tolerar las condiciones adversas del trasplante) existe un periodo estresante de transición que es crítico para su crecimiento y supervivencia.

Los paisajes y xeropaisajes en climas semiáridos frecuentemente requerirán, para desplegar su potencial estético, aplicaciones adicionales de agua, lo cual no siempre es posible (económica, técnica y administrativamente), lo que hace imprescindible la adecuada elección y producción de plantas capaces de reiniciar rápidamente su crecimiento tras el trasplante si se quieren evitar elevadas tasas de mortalidad durante la fase de implantación.

Por otro lado, hay que tener presente que las condiciones de elevada salinidad afectan al crecimiento y supervivencia, principalmente de las plántulas recién trasplantadas, de muchas especies ornamentales usadas en paisajismo y jardinería (Ramoliya & Pandey, 2003). Sin embargo, cierto grado de salinidad es incluso estimulante para la germinación y el crecimiento de las plántulas de otras especies, como *Lotus creticus* (Sánchez-Blanco *et al.*, 1998) y *Protea obtusifolia* (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2000).

En las actuaciones de paisajismo y jardinería en zonas cercanas a la costa otro factor abiótico, como la exposición a aerosoles marinos (con sal, surfactantes y otros contaminantes), puede afectar al crecimiento y supervivencia de muchas especies ornamentales. El grado de adaptación a los aerosoles marinos puede variar notablemente entre especies del mismo género (Martínez-Sánchez *et al.*, 2008).

2. 2. 2. Elección del material vegetal.

Las características morfológicas de las plantas, su comportamiento desde un punto de vista nutricional y su capacidad de respuesta fisiológica a las distintas condiciones de estrés abiótico, van a ser determinantes tanto para su adaptación a las distintas técnicas y métodos de preacondicionamiento en vivero como para su comportamiento después del trasplante, condicionando su establecimiento en campo y su supervivencia.

Por tanto, es necesario establecer criterios de elección que nos permitan seleccionar el material vegetal adecuado para cada situación. Para ello, es ineludible conocer los mecanismos de respuesta a los factores medioambientales de las distintas especies ornamentales potencialmente útiles.

Para seguir mejorando los proyectos de xerojardinería y paisajismo en climas áridos existe una gran necesidad de encontrar plantas ornamentales que presenten elevada tolerancia a condiciones adversas, principalmente a la falta de agua y a la salinidad, siendo capaces de crecer y mantener cierto valor estético en dichas condiciones.

No obstante, cada vez más se imponen ciertas restricciones, y el uso de especies exóticas está más cuestionado (Kotzen, 2004). Por tanto, la demanda de nuevas y variadas plantas ornamentales nativas cada vez es mayor, iniciándose en la última década programas para desarrollar, mediante selección e hibridación, plantas bien adaptadas a diferentes condiciones climáticas (Bartual, 2000; Ault, 2003).

El uso de especies con pocos requerimientos hídricos es de gran importancia para mejorar la conservación del agua en xerojardines y paisajismo; sin embargo, la elección adecuada de material vegetal se ve dificultada por la escasa información sobre las necesidades hídricas de las diferentes especies.

Es bien conocido que algunas especies silvestres tienen un notable mayor grado de tolerancia a la salinidad que especies cultivadas próximas desde el punto de vista taxonómico; como ocurre entre especies silvestres y cultivadas de *Limonium* (Morales *et al.*, 2001). Así, la salinidad no afecta a la calidad ornamental de *Limonium pectinatum*, cuya producción de varas florales es igual en plantas control y en plantas cultivadas en condiciones salinas (200 mM de NaCl); mientras que las plantas de *Limonium tifolium* y *Limonium capsicum* reducen el número de varas florales así como la altura y peso fresco de éstas respecto de las plantas control, bajo estrés salino.

Otro factor que usualmente influye en el crecimiento y floración de las especies ornamentales es la iluminación, tal y como muestran Fausey *et al.* (2005) para *Achillea millefolium*, *Gaura lindheimeri* y *Lavandula angustifolia*. La tolerancia a elevadas intensidades lumínicas durante la producción en vivero y durante el posterior periodo de establecimiento en campo puede, en algunas ocasiones, variar notablemente entre especies emparentadas taxonómicamente (Heiskanen, 2004).

Además del tipo de iluminación, también la longitud del fotoperiodo puede afectar al crecimiento de forma considerable. Adams & Langton (2005) demostraron que los fotoperiodos largos normalmente promueven un incremento de biomasa en gran número de especies ornamentales que, de forma natural, crecen en condiciones de día corto.

En algunas zonas semiáridas, con temperaturas extremas, puede darse una elevada tasa de mortalidad debido a fríos intensos durante el primer invierno tras el trasplante. Meyer & Cunliffe (2004), muestran el porcentaje de supervivencia para estas condiciones de varias especies herbáceas ornamentales, apreciando diferencias importantes entre especies y entre distintos genotipos del género *Miscanthus*.

2. 2. 3. Manejo del riego.

El adecuado manejo del riego es de primordial importancia para la producción de plantas de alta calidad destinadas a ser trasplantadas en condiciones edafoclimáticas adversas.

La aplicación de tratamientos de precondicionamiento al estrés hídrico, durante las últimas semanas o durante todo el periodo de vivero, mediante el uso de riego deficitario, es una técnica frecuentemente usada para endurecer la planta antes del trasplante, aunque puede provocar el incremento de inhibidores endógenos y sobre endurecimiento si es demasiado severo y prolongado, produciéndose una excesiva ralentización del crecimiento, tanto aéreo como radical, e incluso la muerte de la planta (Liptay *et al.*, 1998).

En un buen número de trabajos recientes se ha determinado cómo el riego deficitario durante la producción viverística afecta a algunos aspectos morfológicos y fisiológicos de especies ornamentales de interés para xerojardinería, revegetación y paisajismo, como *Argyranthemum coronopifolium* (De Herralde *et al.*, 1998), *Limonium cossonianum* (Franco *et al.*, 2002 b), *Nerium oleander* (Bañón *et al.*, 2003 a) y *Rosmarinus officinalis* (Sánchez-Blanco *et al.*, 2004).

Frecuentemente, el riego deficitario reduce distintos parámetros de crecimiento de la parte aérea (altura, longitud de los tallos, área foliar, pesos fresco y seco, y volumen de raíces), tal y como ha sido observado en diversas especies: *Lotus creticus* (Franco *et al.*, 2001; Bañón *et al.*, 2004), *Rosmarinus officinalis* (Sánchez-Blanco *et al.*, 2004) y *Myrtus communis* (Bañón *et al.*, 2002). La proporción parte aérea/sistema radical, uno de los parámetros que más influye en el comportamiento de la planta tras el trasplante, se ve reducido normalmente por el riego deficitario.

Igualmente, el riego deficitario durante la fase de vivero puede incrementar el porcentaje de raíces gruesas y disminuir el de medias y finas, como se ha determinado en plántulas de *Myrtus communis* y *Nerium oleander* (Bañón *et al.*, 2002; Bañón *et al.*, 2005). En estos casos, el volumen radical se vio proporcionalmente más reducido que su peso seco, dando como resultado un aumento de la densidad de las raíces bajo riego deficitario.

También, cierto grado de endurecimiento de las raíces es de enorme interés para producir plántulas mejor adaptadas al trasplante en condiciones de estrés hídrico.

Así, un incremento en el porcentaje de raíces de coloración marrón en las plántulas sometidas a tratamientos con riego deficitario ha sido descrito en *Lotus creticus* (Franco *et al.*, 2001) y *Limonium cossonianum* (Franco *et al.*, 2002 b). El cambio de color desde blanco a marrón está asociado con la suberización de la

exodermis, y puede reflejar un proceso de metacutinización, que es un proceso de lignificación y suberización parcial que conlleva un estado de reposo de la raíz que le confiere cierta protección frente a circunstancias medioambientales adversas (por ejemplo la falta de agua en la rizosfera), siendo capaz el sistema radical de continuar activamente su crecimiento cuando cesan dichas circunstancias (Bloomfield *et al.*, 1996).

En esta línea, el riego deficitario produjo plántulas de *Lotus creticus* con mayor densidad de tricomas y mayor número de vasos xilemáticos en tallos y raíces, lo que indujo una serie de adaptaciones fisiológicas desarrollando ajustes osmóticos, lo que permitió a la plántula una considerable capacidad de adaptación a las condiciones adversas de su establecimiento en campo (Franco *et al.*, 2002 a; Bañón *et al.*, 2004).

Los cambios mencionados permiten a la planta mantener una elevada tasa de asimilación neta de CO₂, posibilitando una mayor supervivencia en condiciones de sequía (Vilagrosa *et al.*, 2003). También, plantas de *Phillyrea angustifolia* regadas a un 40% de capacidad de campo durante todo el periodo de producción de vivero, presentaron mayor densidad estomática y mayor eficiencia en el uso del agua, mostrando una capacidad superior para superar el shock post-trasplante (Fernández *et al.*, 2004).

El riego deficitario de las plántulas durante su producción en vivero suele tener un efecto muy favorable en el incremento de su porcentaje de supervivencia y de su crecimiento tras el trasplante en condiciones adversas de calor y falta de agua. Dicho incremento en supervivencia ha sido descrito para *Prosopis glandulosa* (Bainbridge *et al.*, 2001) y *Nerium oleander* (Bañón *et al.*, 2005).

Del mismo modo, en distintas experiencias con *Lotus creticus* (Franco *et al.*, 2001; 2002 a) y *Limonium cossonianum* (Franco *et al.*, 2002 b) se ha comprobado que las plantas que previamente han sido sometidas a cierto grado de estrés hídrico durante su crecimiento en vivero, muestran un crecimiento radical mayor y más rápido tras el trasplante en condiciones semiáridas, especialmente cuando la humedad del suelo es escasa (Franco *et al.*, 1999).

En algunos casos, este potencial adaptativo se mantiene durante bastante tiempo y, tras largos periodos de sequía, una ligera lluvia reactiva el crecimiento radical más rápidamente en aquellas plantas que han sido precondicionadas en vivero (Franco *et al.*, 2002 b).

Respecto a la parte aérea, se ha observado tras el trasplante un mayor crecimiento de los tallos y una cobertura más densa del suelo en las plantas de *Lotus creticus* previamente estresadas, y un desarrollo mayor y más compacto con presencia de varas florales más largas en las plantas de *Limonium cossonianum* sometidas, igualmente, a riego deficitario previo en el vivero; comprobando que, cuanto más

adversas, en cuanto a la falta de agua, son las condiciones del trasplante, se hace más evidente el efecto positivo del endurecimiento previo durante la producción viverística (Franco *et al.*, 2001).

El empleo de riego deficitario, además de suponer una técnica adecuada de acondicionamiento de las plántulas para el trasplante, también debe contemplarse desde el punto de vista de que puede suponer una reducción notable en el empleo de recursos hídricos en el vivero sin afectar (o incluso mejorando) las características de las plántulas producidas (Bergeron *et al.*, 2004).

Además de la cantidad de agua, el método de riego puede influir decisivamente en la producción de plántulas de buena calidad. La sustitución del riego por aspersión, aún muy utilizado en algunos viveros de producción de plantas para jardinería, por métodos de subirrigación, puede mejorar las características del sistema radical de la plántula (Franco & Leskovar, 2002), su potencial hídrico (Leskovar, 1998) y su estado nutricional (Biernbaum & Versluys, 1998; Franco & Leskovar, 2002), produciendo plántulas de mejor calidad para xerojardinería y paisajismo, al mismo tiempo que puede suponer una disminución importante del impacto medioambiental, al reducirse la lixiviación de nutrientes y agroquímicos (Bilderback, 2002; Yeager & Henley, 2004), sobre todo cuando se emplean sistemas de recirculación (Harris *et al.*, 1997).

2. 2. 4. Control de la temperatura.

El manejo adecuado del régimen de temperaturas durante la producción de plántulas ornamentales en vivero, puede modificar positivamente su comportamiento tras el trasplante.

Los efectos directos de la temperatura sobre las pautas de crecimiento de las plantas son ampliamente conocidas, pero cómo afecta dicho régimen térmico previo en el crecimiento de las plantas tras su trasplante bajo nuevas condiciones medioambientales ha sido poco estudiado (Martínez-Sánchez *et al.*, 2008).

A este respecto, Van Den Driessche (1991 a; 1991 b) realizó un estudio sobre *Picea glauca*, *Pinus contorta* y *Pseudotsuga menziesii*, comprobando que, al final del periodo de vivero, las plantas producidas utilizando bajas temperaturas presentaban menor altura y menores valores para las proporciones altura/diámetro de tallo y parte aérea/sistema radical.

De forma similar, se ha comprobado que un régimen de temperaturas nocturnas bajas en vivero no calefactado, hace disminuir la longitud de los tallos y la relación parte aérea/sistema radical, y hace aumentar el porcentaje de raíces metacutinizadas en plantas de *Lotus creticus* (Franco *et al.*, 2001).

La eficiencia fotoquímica también puede verse reducida por las bajas temperaturas en el vivero, incrementándose la concentración foliar de antocianinas, tal y como han observado Close *et al.* (2004) durante la producción de plantas de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus nitens*. La concentración foliar de antocianinas, por otro lado, podría utilizarse como un indicador de endurecimiento relacionado con la tolerancia a temperaturas adversas tras el trasplante.

El empleo de temperaturas bajas durante la producción viverística, aunque es una técnica menos efectiva que el uso del riego deficitario, contribuye a producir plántulas que presentan mayores tasas de supervivencia y de crecimiento relativo tanto de la parte aérea como del sistema radical (Van Den Driessche, 1991 a; Franco *et al.*, 2001).

2. 2. 5. Manejo de la humedad del aire.

La influencia de la humedad ambiental durante la producción de plantas ornamentales para jardinería, en su acondicionamiento para mejorar su tolerancia a circunstancias adversas de trasplante, no ha sido muy estudiada.

Sin embargo, Bañón *et al.* (2003 b), trabajando con *Rhamnus alaternus*, han concluido que el mantenimiento de una baja humedad del aire y el empleo de riego deficitario en el vivero reducen el crecimiento y la tasa de fotosíntesis de la plántula obtenida, incrementando su supervivencia durante el periodo de implantación.

En un trabajo paralelo, Bañón *et al.* (2003 a), han determinado que en *Olea europea* var. *sylvestris*, el efecto combinado de riego deficitario y baja humedad ambiental durante la producción en vivero ha hecho incrementar el porcentaje de supervivencia hasta un 63% frente a un 0% de las plantas control.

En estudios similares, dicho efecto combinado también ha incrementado el porcentaje de supervivencia de las plántulas tras el trasplante en condiciones de déficit hídrico y elevada temperatura, siendo éste un 68% frente a un 7% en las plantas control, para *Nerium oleander* (Bañón *et al.*, 2005), y un 37% frente a un 0% en las plantas control, para *Myrtus communis* (Bañón *et al.*, 2002). Este comportamiento es atribuible a cambios morfológicos, tanto de la parte aérea de la plántula (menor tamaño y menor área foliar), como de las raíces (más cortas, gruesas y densas y menos ramificadas), y de la relación parte aérea/parte radical (que se reduce alrededor del 60% en ambas especies), y a cambios fisiológicos, como el desarrollo del ajuste osmótico, la eficiencia de la regulación estomática y un mayor flujo de asimilados hacia las raíces.

Como se demuestra en estos estudios, el uso combinado de baja humedad del aire y de riego deficitario provoca en las plántulas cierto grado de endurecimiento

durante su producción en vivero. Este efecto parece el resultado de la combinación de tres importantes mecanismos de aclimatación a la sequía y el calor, tal y como establecieron Martínez-Sánchez *et al.* (2008):

- 1- Reducción del crecimiento, acompañado de una redistribución de asimilados a favor de las raíces frente a la parte aérea, lo que reduce la transpiración y favorece el desarrollo de un sistema radical mayor y más eficiente a la absorción hídrica.
- 2- Ajuste osmótico foliar, posibilitando el mantenimiento de la turgencia foliar incluso cuando la disponibilidad de agua en el suelo disminuye por ausencia de riego.
- 3- Una regulación estomática más eficiente, evitando pérdidas de importantes cantidades de agua por transpiración cuando los recursos hídricos presentes en el suelo son escasos.

2. 2. 6. Enriquecimiento del aire con CO₂.

El empleo de una atmósfera enriquecida con CO₂ durante la producción en vivero se presenta como una técnica prometedora para incrementar la productividad y obtener plántulas con valores bajos de la relación parte aérea/sistema radical, que sean capaces de tolerar adecuadamente las condiciones estresantes del trasplante en ecosistemas mediterráneos, en general, y en actuaciones de xerojardinería y paisajismo, en particular, tal y como queda reflejado en diversos estudios (Wullschleger *et al.*, 2002; Biel *et al.*, 2004; Cortés *et al.*, 2004).

De esta manera, trabajos realizados por Cortés *et al.* (2004) demostraron que plántulas de *Quercus cerroides* y *Quercus ilex* incrementaban alrededor del 60% su biomasa total en respuesta al enriquecimiento con CO₂ hasta valores entre 500 y 700 ppm; siendo dicho incremento debido, fundamentalmente, al aumento de la biomasa radical.

Por otro lado, Biel *et al.* (2004) analizaron el efecto combinado del riego deficitario y enriquecimiento con CO₂ en *Pinus nigra* para lograr producir en el vivero plántulas vigorosas y endurecidas que se comportasen bien tras el trasplante, comprobando que el enriquecimiento con CO₂ incrementa la biomasa total, la biomasa foliar y el área foliar de las plántulas, mientras que el riego deficitario hace disminuir la biomasa de tallos y hojas y el área foliar, pero no encontraron evidencias de interacción entre ambos factores.

2. 2. 7. Manejo de la intensidad luminosa y el fotoperiodo.

Aunque la respuesta a la intensidad luminosa varía notablemente entre especies (Heiskanen, 2004), usualmente afecta al crecimiento y floración de las plantas ornamentales de uso en jardinería, tal y como observan Fausey *et al.* (2005) en *Achillea millefolium*, *Gaura lindheimeri* y *Lavandula angustifolia*.

Por otro lado, el tipo de iluminación y la ampliación del fotoperiodo pueden afectar al crecimiento de las plántulas tal y como han puesto de manifiesto Richardson-Calfee *et al.* (2001) en un estudio con *Campirnus caroliniana*, *Fagus grandifolia* y *Gymnocladus dioicus*, en el que tratamiento con fotoperiodo largo normalmente promueve un incremento en la biomasa.

2. 2. 8. Inoculación con micorrizas.

El empleo de micorrizas en la producción en vivero de plantas forestales es una práctica habitual, existiendo amplia documentación científica y técnica al respecto. No ocurre lo mismo, excepto para algunas especies arbóreas, para la producción de plantas ornamentales, sobre la que existe mucho menos número de trabajos publicados.

De una forma u otra, es ampliamente conocido que el rápido desarrollo de un sistema radical funcional es esencial para el buen establecimiento tras el trasplante de muchas especies ornamentales, principalmente de las leñosas, y particularmente en condiciones edafoclimáticas adversas, en las que un sistema radical convenientemente micorrizado presenta una mayor capacidad de absorción de agua y nutrientes (Goicoechea *et al.*, 2004; Iglesias *et al.*, 2004; Sánchez-Blanco *et al.*, 2004).

El efecto positivo de la micorrización en vivero sobre la tolerancia de las plantas al estrés hídrico ha sido estudiado en especies silvestres de creciente interés para xerojardinería y paisajismo, comprobándose que el grado de respuesta de la planta micorrizada depende de la especie de hongo utilizada, de la interacción entre planta y hongo (Sánchez-Blanco *et al.*, 2004) y de la intensidad del estrés hídrico (Savé *et al.*, 1994).

La micorrización también puede influir de forma sustancial en la nutrición de la planta, tal y como demuestran los estudios realizados por Carpio *et al.* (2005), en el que se observó una mayor absorción de nutrientes en plantas de *Ipomocea carnea* subsp. *fistulosa* inoculados con micorrizas respecto a las no inoculadas.

No obstante, otros estudios no han encontrado ningún beneficio en la inoculación de la plántula con micorriza en vivero sobre el comportamiento de la planta tras el trasplante respecto al de la planta no inoculada (Gilman, 2001; Linderman & Davis, 2003; Martin *et al.*, 2003).

Hay que decir que Carpio *et al.* (2003), sin embargo, estudiaron el efecto de la micorrización en vivero sobre el crecimiento y la supervivencia tras el trasplante de diversas plantas ornamentales (*Acacia greggii*, *Chilopsis linearis*, *Diospyros virginiana*, *Platanus occidentalis*, *Ipomoea carnea* y *Plumbago auriculata*), encontrando un efecto positivo de la inoculación con micorrizas sobre el crecimiento de las plántulas de todas las especies durante la fase de vivero.

2. 2. 9. Manejo de la fertilización.

Una de las formas más eficaces de controlar el crecimiento de las plántulas durante su producción en el vivero es moderando su fertilización; debido a esto, se han realizado numerosos estudios para evaluar la correlación entre el manejo de la fertilización en el vivero y el comportamiento posterior de la planta tras su trasplante en xerojardinería y paisajismo con mínimo mantenimiento, poniéndose de manifiesto que la aplicación de una fertilización apropiada es vital para su supervivencia y crecimiento tras ser trasplantada en condiciones adversas, en las que la competencia por el agua y los nutrientes es muy intensa (Martin & Ruter, 1996; Rikala *et al.*, 2004).

Para establecer la fertilización adecuada para producir plántulas de buena calidad hay que tener un conocimiento suficiente del comportamiento de cada especie durante su producción en vivero.

Así por ejemplo, Rikala *et al.* (2004) observaron que, mejorando el estado nutricional de plántulas en el vivero, puede mejorarse el crecimiento de los tallos y de la biomasa radical, especialmente en suelos nutritivamente pobres.

Las respuestas a la fertilización a veces varían para plantas taxonómicamente próximas, tal y como Close & Beadle (2004) observaron en plántulas de *Eucalyptus globulus*. En este caso, en el momento del trasplante, se comprobó una mayor concentración foliar de nitrógeno y fósforo en plántulas de *Eucalyptus globulus* que de *Eucalyptus nitens*, producidas en viveros al mismo tiempo y con el mismo régimen de fertilización.

2. 2. 10. Empleo de fitorreguladores.

Los fitorreguladores han sido ampliamente utilizados, principalmente para manipular la forma, el tamaño, la floración y la tolerancia al estrés abiótico de plantas ornamentales (Ruter, 1994; Bañón *et al.*, 2001 b).

El paclobutrazol (PBZ) es un retardante del crecimiento del grupo de los triazoles, y es uno de los fitorreguladores más empleados en viverística ornamental. Puede inducir tolerancia al estrés hídrico e incrementar el uso eficiente del agua, tanto en plántulas como en plantas adultas (Van den Driesche, 1996; Watson, 2001).

Esta tolerancia al estrés hídrico inducida por el PBZ ha sido relacionada con una disminución de la transpiración, de la altura de la planta, de la biomasa y del área foliar, y con un incremento de la resistencia estomática en plántulas de *Phillyrea angustifolia* producidas en vivero (Fernández *et al.*, 2004), que vieron aumentado su porcentaje de supervivencia tras el trasplante en condiciones semiáridas (Bañón *et al.*, 2001 b).

El cloruro de clormecuat (CCC) también ha sido utilizado para reducir la parte aérea de la plántula, tal y como describen Bañón *et al.* (2001 a) para *Nerium oleander*. Plántulas de esta especie producidas en vivero y tratadas con CCC manifestaron una reducción del peso seco de la parte aérea y una coloración más oscura de ésta.

Por tanto, hay que tener presente que diferentes fitorreguladores pueden provocar efectos muy distintos en plantas ornamentales.

2.3 Características principales de las semillas de plantas angiospermas.

Puesto que *Limonium insigne* forma parte del extenso grupo de las angiospermas, a continuación se hará una explicación de las principales características que lo representan, tal y como refleja Besnier-Romero (1989), centrándonos principalmente en la biología y morfología de las semillas, así como en lo relativo a su recolección, almacenamiento y conservación.

2. 3. 1. La flor de las angiospermas.

La flor completa o hermafrodita de las angiospermas consta de dos componentes principales: los órganos vegetativos, que son el receptáculo y las envolturas florales

(cáliz y corola) y los órganos reproductivos, constituidos por los estambres con sus anteras llenas de granos de polen y el pistilo con sus óvulos dentro del ovario.

La morfología floral es muy variada y en numerosas familias las flores presentan transformaciones que afectan tanto a las envolturas florales como a los órganos sexuales.

2. 3. 2. Biología de las semillas.

Las semillas son unidades de diseminación y reproducción sexual de las plantas superiores, procedentes del desarrollo de los óvulos de sus flores. Están compuestas de uno o varios embriones, reservas nutritivas y una o varias capas protectoras originadas a partir de los tegumentos del óvulo, del ovario, de los tejidos, de otras partes de la flor e, incluso, de la inflorescencia.

Existen dos tipos de semillas que no se ajustan estrictamente a esta definición: las semillas agamospérmicas y las semillas de embrión indiferenciado.

Las semillas agamospérmicas no proceden de una fecundación sexual. Morfológica y anatómicamente no son diferenciables de las semillas normales pero su constitución genética es muy distinta, pues sólo poseen los cromosomas de la planta madre.

Por otro lado, existen numerosas semillas cuyos embriones están poco o nada diferenciados, esto es frecuente en las orquidáceas, en especies parásitas como las de las familias de las cuscutáceas y orobancáceas y algunas otras familias poco difundidas. La germinación de estas semillas sólo tiene éxito en medios nutritivos, naturales o artificiales, ricos en nutrientes minerales, azúcares, aminoácidos y vitaminas o en sustratos donde puedan entrar en simbiosis con determinados hongos.

2. 3. 3. Morfología exterior.

La morfología exterior de las semillas es extremadamente variable, influyendo tres factores importantes: familia botánica a la que pertenecen las plantas donde se producen estas semillas, tipos de las cubiertas exteriores y tamaño y forma.

En las familias botánicas poco difundidas la morfología es poco variable, pero en grandes familias compuestas de numerosos géneros y especies y sometidas a muy diversas presiones adaptativas, las diferencias de morfología exterior pueden ser muy grandes. En plantas cultivadas o aprovechadas por sus granos se agudiza esta diferenciación, ya que la presión selectiva del hombre ejerce una influencia considerable.

2. 3. 4. Estructura básica de las semillas de las angiospermas.

La estructura básica de la semilla de las angiospermas consta de cuatro componentes:

- a) El embrión: procede del cigoto formado por la unión de la oosfera con una de las células generativas del tubo polínico. Normalmente el embrión es diploide y existe siempre en las semillas viables. El tamaño y la posición del embrión dentro de la semilla son muy variables. Estos caracteres pueden tener valor clasificatorio e identificativo, especialmente en semillas de plantas ornamentales y silvestres, poco conocidas por su aspecto exterior.

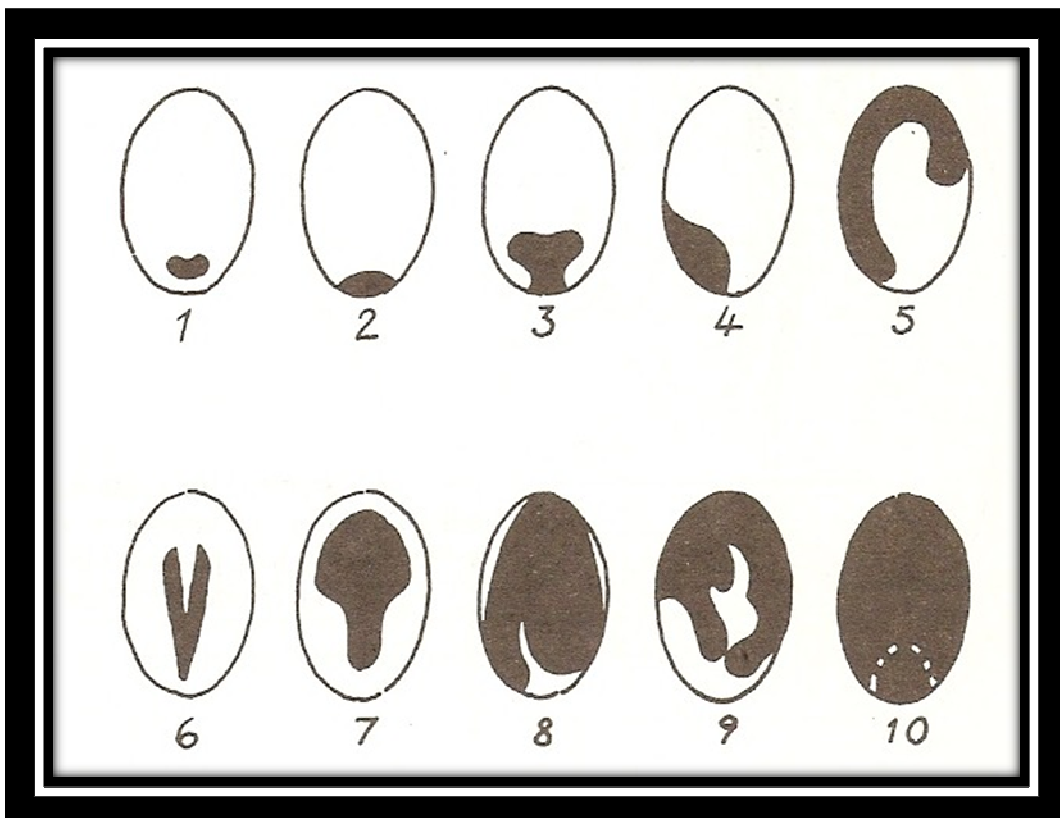


Figura 1: Principales tipos de embriónes según su posición en el interior de la semilla: 1 a 4) basales; 5) periférico; 6 a 10) axiales; 7 a 10) foliosos. 1) rudimentario; 2) ancho; 3) capitado; 4) lateral; 5) periférico; 6) lineal; 7) espatulado; 8) curvado; 9) plegado; 10) invertido (Besnier-Romero, 1989).

- b) El endospermo: procede de la unión de los núcleos polares con la segunda célula generativa del tubo polínico. El endospermo es triploide o poliploide y acumula la mayor parte de las reservas nutritivas en casi todos los casos en los que los cotiledones no lo hacen. Procede del saco embrionario, donde está inmerso el cigoto, rodeando casi totalmente al embrión.
- c) El perispermo: procede del desarrollo de la nucela; es diploide y tiene la misma constitución genética que la planta madre. Generalmente el perispermo queda reducido o es reabsorbido poco después de iniciar su desarrollo, pero en algunas especies es anatómicamente identificable y, en otras, forma la principal reserva de sustancias nutritivas.
- d) Las cubiertas: constan de dos partes bien diferenciadas; una es la testa, que procede del desarrollo de los tegumentos del óvulo y que, salvo raros casos, existe siempre, siendo diploide y de origen materno. Constituye la protección exterior de las semillas. La otra parte está constituida por las cubiertas exteriores, que proceden de orígenes muy diversos y que faltan en las semillas que lo son en pleno sentido botánico. Muy frecuentemente las cubiertas exteriores proceden de las partes florales e incluyen algunas partes de la inflorescencia. Así por ejemplo:
- La unidad estructural cuyas cubiertas exteriores proceden del desarrollo del ovario se denomina fruto. Numerosas semillas son frutos secos cuya cubierta exterior procede, total o parcialmente, del ovario
 - Las núculas de las poligonáceas así como las semillas de muchos tréboles tanto silvestres como cultivados están cubiertas por el cáliz de la flor.
 - Los glomérulos del género *Beta* son frutos compuestos, cuya cubierta exterior suberosa proviene de la fusión de los receptáculos de varias flores o del receptáculo de una sola flor, en el caso de semilla monogermen genética.

2. 3. 5. Reservas nutritivas y otras sustancias.

Las semillas contienen suficientes reservas nutritivas, si están bien maduras, para la formación normal de la plántula hasta que ésta es capaz de subvenir a sus necesidades por medio de la fotosíntesis y la absorción de nutrientes del suelo. No todos

los componentes que pueden ser identificados en las semillas en un análisis químico o bioquímico pueden considerarse reservas nutritivas a efectos del proceso de germinación. Determinadas estructuras, como las cubiertas exteriores (lema y pálea) de las semillas de gramíneas no contribuyen en nada a la formación de la nueva plántula, no sólo por estar formadas por materiales difícilmente degradables (lignina, celulosas) o por compuestos químicos que no intervienen en el metabolismo del grano en germinación (sílice), sino por la inexistencia de conexiones vasculares o de otro tipo entre estas partes y el embrión en crecimiento. Lo mismo sucede con la testa de las leguminosas, crucíferas y otras semillas y con los componentes de las cubiertas exteriores; éstos juegan, en la germinación, otro papel distinto el proporcionar sustancias nutritivas al embrión, esos componentes pueden tener valor nutricional o industrial.

Los tres grandes componentes de sustancias acumuladas en las semillas son:

- a) Los hidratos de carbono: constituyen la reserva más común en las semillas y, de ellos, el almidón es la forma en que aparece con más frecuencia.
- b) Las proteínas: son mucho más variadas que las sustancias hidrocarbonadas. Las proteínas están compuestas por aminoácidos, cuyo número es limitado y tienen una importancia decisiva en la nutrición humana y animal.
- c) Los lípidos: cuyo almacenamiento en las semillas no es tan general como el de las sustancias hidrocarbonadas y nitrogenadas puesto que los lípidos sustituyen al almidón como fuente de energía. Por ello, junto a las semillas oleaginosas se encuentran otras con bajos contenidos en lípidos, como las semillas de las gramíneas y del guisante, donde sólo se alcanza el 1%.

De tal manera que las semillas pueden clasificarse en tres grandes grupos:

- Semillas amiláceas, son las que contienen más del 50% de hidratos de carbono, generalmente almidón: cereales, habas, guisante, dátil.
- Semillas proteaginosas son las que contienen más del 35% de proteínas: soja, algodón.
- Semillas oleaginosas son las que contienen más del 35% de lípidos: lino, cacahuete, colza, ricino, palma aceitera.

Además de los elementos anteriormente nombrados, hay que decir que el contenido de elementos minerales en las semillas, tanto en macro como en micronutrientes es satisfactorio y equilibrado para el normal crecimiento de la plántula durante un tiempo considerable.

2. 3. 6. Evolución de la formación de las semillas.

Las plantas superiores (Fanerógamas, Espermásfitas o Embriobiontas) comprenden dos grupos o divisiones claramente distintos: gimnospermas (pinófitas) y angiospermas (magnoliófitas). Estos grupos difieren en cierto número de características vegetativas y reproductivas de las que interesa destacar las referentes a la fecundación y a la formación de las semillas. *Limonium insigne* pertenece al grupo o división de las angiospermas, por ello, sólo trataremos este grupo.

La aparición de las angiospermas se produce como consecuencia de la existencia de dos fenómenos simultáneos que afectan directamente a la formación de las semillas: la protección de los óvulos por tejidos independientes del gametófito femenino y la doble fecundación inmediata a la polinización y seguida de la acumulación de reservas nutritivas y la formación de un endospermo triploide. La evolución de las semillas desde las Preespermásfitas hasta las angiospermas:

- Una reducción general del tamaño de los óvulos y un retraso continuo en la acumulación de reservas nutritivas, haciéndola depender de la realización de la fecundación, lo que se traduce en una mayor eficacia energética y en un aumento relativo del número de diásporas fértiles.
- Una protección cada vez mayor del óvulo por tejidos extraños que lo defienden de las inclemencias y los depredadores, con una reducción simultánea del espesor de los tegumentos.
- Un más rápido mecanismo biológico y bioquímico que disminuye el tiempo transcurrido entre polinización y fecundación y entre ésta y el comienzo de la diferenciación del embrión al reducirse y, luego, suprimirse la fase de división celular libre.
- Una reducción continúa del número de los cotiledones.
- Aparición y posterior aumento, en profundidad, del letargo.

Está admitido que la separación entre monocotiledóneas (Liliópsideas) y dicotiledóneas (Magnoliópsidas) se produjo en las Preangiospermas y que la evolución de estas dos ramas es independiente.

2. 3. 7. Fecundación y maduración.

El proceso de formación de la semilla de las angiospermas consta de tres fases principales: fecundación, desarrollo del óvulo y maduración.

1º) Fecundación:

Es la llegada de los granos de polen al estigma de la flor. Asegura, en general, la fecundación y la formación de la semilla; pero existen casos en que dicha llegada no da lugar a fecundación (incompatibilidad), y otros en los que la semilla se forma sin que esta fecundación tenga lugar (agamospermia).

Antes de la fecundación, los óvulos son alimentados por medio de haces vasculares que provienen del ovario. Una vez realizada la fecundación, las transformaciones que tienen lugar en el ovario y en el óvulo hacen que los elementos del xilema de los haces vasculares que nutren a los óvulos en desarrollo sean muy escasos. Todos los nutrientes que llegan a la semilla en formación lo hacen a través del floema. Estos nutrientes proceden de todas las zonas fotosintéticamente activas de las plantas y también de reservas en las raíces.

El floema lleva grandes cantidades de azúcares, sobre todo de sacarosa, así como aminoácidos y aminos. De estos compuestos nitrogenados, la serina, alanina y glicina proceden de la síntesis efectuada en las hojas mientras que la asparagina, glutamina, homoserina y otros parecen haber sido sintetizados en las raíces y haberse transferido del xilema al floema a su paso por tallos y hojas.

2º) Desarrollo del óvulo:

Comporta la realización de dos procesos importantes: diferenciación orgánica de la semilla y acumulación de reservas.

Al existir inicialmente dos núcleos en el saco embrionario, es claro que existen dos cadenas diferentes de procesos bioquímicos, una en el embrión y otra en el endospermo, que se desarrollan con cierta independencia. Esta independencia, que conduce a la formación de tejidos muy distintos, no es obstáculo para que los procesos metabólicos fundamentales desarrollados en ambas cadenas sean semejantes ni para la

existencia de una mutua interacción, de tal manera que las hormonas o enzimas sintetizadas en un lugar ejerzan su efecto en otro.

De tal manera que, una vez efectuada la doble fecundación, existen en el saco embrionario dos núcleos funcionales: el núcleo diploide del cigoto y el núcleo triploide del endospermo.

En el primer caso se observa que el cigoto se divide transversalmente en dos células:

- a) Por un lado la célula basal, que es la más próxima al micrópilo, da origen al suspensor, que puede ser monocelular o pluricelular y que es el órgano que mantiene sujeto al embrión dentro del saco embrionario, lo empuja hacia su interior y le aporta nutrientes.
- b) Y, por otro lado, la célula apical, que se divide y se convierte primeramente en un proembrión sin diferenciar y, más tarde, cuando comienzan las primeras diferenciaciones, en un embrión globular.

En lo que al endospermo se refiere, el núcleo triploide del saco embrionario se divide antes que el cigoto. Esta división se efectúa de dos maneras diferentes.

- a) En un primer tipo, el núcleo del endospermo sufre una serie de divisiones libres, sin que se formen paredes celulares (endospermo nuclear). Una vez que se han formado numerosos núcleos libres, se empiezan a producir paredes celulares, comenzando por la región del micrópilo, hasta que todo el saco embrionario se convierte en una masa de células. Este desarrollo total no tiene lugar en todos los casos, pues la parte más alejada del micrópilo no forma paredes celulares y, en determinadas especies, todo el endospermo permanece en estado líquido, con núcleos libres. Este endospermo líquido suele reabsorberse en la mayoría de las especies, pero en otras sigue líquido hasta la maduración de la semilla.
- b) En el segundo tipo de desarrollo el endospermo comienza a formar células desde el primer momento (endospermo celular).

En las semillas llamadas endospérmicas el endospermo constituye la principal reserva de nutrientes; en las demás, el endospermo es reabsorbido en mayor o menor grado cediendo sus nutrientes al embrión.

3º) Maduración:

El momento de la fecundación del óvulo, que desencadena su desarrollo, está determinado por la fusión de los núcleos del tubo polínico con los del saco embrionario; sin embargo, el final de la maduración no está claro.

Fisiológicamente, el proceso de desarrollo del óvulo fecundado termina cuando el embrión está totalmente diferenciado y ha alcanzado su tamaño normal, dispone de reservas que han completado su desarrollo bioquímico y es capaz de germinar en cuanto desaparezcan las causas que le imponen un letargo.

En las plantas anuales, sobre todo en las de floración concentrada, la madurez de las semillas está ligada a la senescencia y subsiguiente muerte de las plantas. En muchas plantas perennes tal madurez coincide con el comienzo de la fase de reposo de la planta. Estos fenómenos no son generales, pues en las plantas anuales de floración escalonada existen frutos y semillas maduras mientras la planta sigue vegetando y floreciendo activamente. En muchas plantas perennes las semillas alcanzan su madurez en fase de vegetación activa de la planta.

La madurez es un fenómeno autónomo de naturaleza endógena. Este fenómeno no es totalmente independiente del desarrollo de la planta madre, ya que de este desarrollo depende el aporte de agua y nutrientes cuya alteración afectaría a la madurez de las semillas.

El comienzo del período de maduración puede ser fijado en el momento en que la semilla alcanza su peso fresco máximo. Ese momento coincide con la fase de máxima expansión celular y contenidos máximos en ácidos nucleicos. A partir de entonces se inicia la desecación y disminuyen drásticamente los contenidos en hormonas. La síntesis de sustancias de reserva varía su intensidad según especies.

2. 3. 8. Letargo.

La mayoría de las semillas de plantas cultivadas, maduras, secas y sanas, germinan rápida y uniformemente cuando se siembran en suelo húmedo y mullido y en época apropiada. Pero si estas semillas se hacen germinar antes de la época normal de siembra siguiente a la cosecha es frecuente la aparición de anomalías que se manifiesta en la obtención de porcentajes de germinación inferiores a los normales.

Se denomina letargo al fenómeno por el cual una semilla viable no germina cuando se coloca en un sustrato húmedo, aireado y a temperatura suficiente para sostener los procesos metabólicos que conducen a la germinación.

El letargo es una fase de la vida de la semilla, después de la maduración, en la cual su desarrollo se encuentra detenido por factores estructurales o fisiológicos dependientes de la propia semilla. A la fase de letargo se contraponen la de reposo, en el que el desarrollo se encuentra detenido por la inexistencia de factores ambientales favorables a la germinación. Es importante comprender que los factores ambientales favorables para la germinación y, por lo tanto, para la interrupción del reposo son los tres siguientes: agua, oxígeno y una temperatura adecuada. Cualquier otro factor que parezca favorecer la germinación no interrumpe el reposo; lo que hace es romper el letargo.

El letargo también es la condición general y primitiva de las semillas tras su maduración; mientras que, el estado de reposo, es una condición derivada de la acción del hombre, resultante de su almacenamiento en seco y de la selección inconsciente que durante muchos años (a veces muchos siglos), con la finalidad de seleccionar semillas para sembrarlas en la época oportuna, que germinen rápidamente, uniformemente y que aseguren su subsistencia.

Un ejemplo clásico del mecanismo adaptativo implícito en el fenómeno del letargo se encuentra en las necesidades de frío que tienen las semillas de numerosas plantas silvestres anuales de primavera o verano. En un clima mediterráneo-continental, las semillas caídas al suelo se hidratan con las lluvias otoñales. Si estas semillas no estuviesen aletargadas, un otoño suave permitiría su germinación total y a la subsiguiente venida del invierno, las fuertes heladas destruirían las plántulas nacidas, eliminando la totalidad de la población. En cambio, el letargo impide tal germinación otoñal total y, aunque mueren algunas plántulas nacidas, la mayoría de las semillas hidratadas no germinan y pasan por varios períodos durante los cuales se encuentran sometidas a bajas temperaturas, lo que va haciendo desaparecer la situación de letargo. Ello permite que en la germinación y el subsiguiente desarrollo de las plántulas, en un ambiente favorable, cuando llega la primavera.

Los distintos tipos de letargo pueden agruparse en dos grandes categorías según dependan de factores atribuibles a las cubiertas que rodean al embrión o a factores existentes en el propio embrión.

a) Letargo extraembrional:

El letargo extraembrional se debe a dos causas principales: existencia de barreras físicas y presencia de inhibidores químicos en las cubiertas. Las barreras físicas impiden la imbibición del agua, el aporte de oxígeno, la expansión del embrión, el escape de inhibidores contenidos en éste y también filtran la luz que llega al embrión.

b) Letargo embrional:

En el que podemos distinguir:

1- Inmadurez morfológica del embrión:

Consiste en que el embrión no ha completado su crecimiento y desarrollo durante la época en la que la semilla se dispersa o se recoge. Las semillas han de pasar cierto tiempo sometidas a un conjunto de condiciones ambientales que hacen que el embrión alcance su tamaño normal, si ya estaba morfológicamente completo, o bien que se diferencie en sus órganos constitutivos. Una vez completada esta fase, las semillas pueden germinar inmediatamente o por el contrario, pueden entrar en letargo fisiológico.

2- Inhibición fisiológica:

En la cual el embrión se encuentra totalmente desarrollado y la semilla se hidrata cuando se encuentra en sustrato húmedo, pero no germina a causa de desequilibrios fisiológicos o bioquímicos. Este letargo puede ser de varios tipos. En unos casos es completo o doble; en el que no crece ni la radícula ni el epicótilo. Y en otros casos es incompleto o simple, de modo que solamente está aletargada una parte del eje embrionario, normalmente el epicótilo. En los casos de letargo completo puede suceder que la intensidad del letargo de una de las partes del eje embrionario sea mayor que la de la otra parte. Esto se pone de manifiesto porque la intensidad de los tratamientos para romper el letargo, como la exposición a bajas temperaturas, es diferente para cada una de las dos partes. Generalmente, la radícula está menos aletargada que el epicótilo.

Por último, hacer mención del letargo secundario, el cual, aparece en las semillas en reposo como consecuencia y en respuesta de condiciones ambientales especiales. Una relación de los factores que han provocado letargo secundario en diversas especies, es la siguiente:

- Temperaturas superiores o inferiores al máximo y al mínimo del ámbito de germinación normal de la especie.
- Oscuridad.
- Exceso de luz blanca y rojo-lejana (750 nm).
- Falta de oxígeno o exceso de dióxido de carbono.
- Escasez o exceso de agua.
- Inhibidores químicos: ácido abscísico, cumarina, etc.
- Desecación de la semilla hidratada.

2. 3. 8. 1. Factores del letargo.

Las causas del letargo son la presencia de estados o concentraciones desfavorables de: temperaturas, humedad, oxígeno, luz, inhibidores químicos, sustancias hormonales y compuestos oxidantes.

Efecto de las temperaturas:

Durante la maduración, las temperaturas extremadas pueden provocar letargo. En las gramíneas (trigo, cebada, avena) la maduración a baja temperatura a partir de los 30 días de la espigazón puede provocar la aparición del letargo. En otras especies, con distintas necesidades ecológicas, el letargo es inducido por altas temperaturas durante la maduración.

La acción de temperaturas extremas puede provocar también letargo secundario. La ruptura del letargo es bastante general y conocido. En los ensayos de germinación de semillas en laboratorio se ha podido observar que las temperaturas alternantes, que simulan las oscilaciones naturales en el ciclo día/noche, ayudan a superar las situaciones de letargo y sólo secundariamente favorecen la germinación.

Igualmente sucede cuando las semillas hidratadas se someten a bajas temperaturas durante períodos de tiempo más o menos largos, esta técnica conocida se denomina estratificación o estratificación en frío, ya que existe una estratificación cálida para semillas con embriones inmaduros o semillas de especies tropicales. Con la estratificación se simulan las condiciones naturales a las que se ven sometidas las semillas hidratadas situadas en el suelo, durante el invierno u otras épocas.

Más raramente puede romperse el letargo por la acción de temperaturas altas de breve duración y es necesario alternar la estratificación cálida con la estratificación en frío.

Efecto del oxígeno:

Existen casos aislados en los que la anaerobiosis puede inducir letargo secundario en suelos arcillosos mal aireados. Sin embargo, esto no parece ser frecuente, pues la situación de anaerobiosis artificial, en atmósfera de nitrógeno, provoca en muchos casos la ruptura del letargo y se piensa que el letargo es un estado que se da en situaciones de aerobiosis.

Efecto de la luz:

Hay semillas que germinan tanto a la luz como en la oscuridad. Los procesos biológicos y fisiológicos desencadenados por la acción de la luz están gobernados por un pigmento denominado fitocromo. Este pigmento es el mismo que, presente en las hojas, determina la respuesta de la planta al fotoperiodo y regula la inducción a la floración. En las semillas, el fitocromo está localizado en el eje embrionario y, concretamente, en la zona compuesta por el hipocótilo y la radícula.

Efecto de los inhibidores exógenos:

Los inhibidores exógenos son los que están situados fuera de las semillas. Son compuestos que se encuentran en los sustratos en que normalmente germinan las semillas (suelos, hojarasca del bosque, etc.) o en los frutos frescos carnosos, y son todos aquellos que se aplican en las experiencias de laboratorio.

Los inhibidores que pueden estar situados en los sustratos naturales de germinación son muy variados, y su distribución espacial es muy irregular. Los inhibidores situados en los frutos frescos y jugosos impiden la germinación de las semillas mientras éstas se encuentran en el interior de los frutos en contacto con jugos más o menos acuosos.

Efecto de los inhibidores endógenos:

Los inhibidores endógenos son aquellas sustancias producidas de modo natural por las semillas en maduración y que, localizadas en las cubiertas o en el embrión, provocan el letargo. Los inhibidores localizados en las cubiertas son muy variados y pueden clasificarse en dos tipos:

- Los que son eliminados o contrarrestados por la acción de factores externos sin que, aparentemente, lo sean por reacciones bioquímicas que tengan su origen en el embrión.
- Los que interaccionan bioquímicamente con el embrión, tanto en la inducción como en la ruptura del letargo.

De los inhibidores situados en el embrión, principalmente en los cotiledones, el más conocido y difundido es el ácido abscísico.

Efecto de las sustancias hormonales:

De entre las muchas sustancias exógenas que rompen el letargo destacan tres reguladores del crecimiento: giberelinas, citocininas y el etileno. Todas ellas se encuentran en las semillas de modo natural, en formas endógenas, variando su contenido durante las fases de formación de la semilla, letargo y germinación.

La aplicación de la sustancia exógena rompe el letargo en algunas semillas, pero no en otras. Esta ruptura del letargo está relacionada con las condiciones de luz y temperatura.

Se considera que las giberelinas, que han sido las más estudiadas, son las que más directamente actúan sobre los mecanismos de ruptura del letargo, mientras las citocininas ejercen una acción complementaria que parece consistir en contrarrestar la acción de los inhibidores, especialmente del ácido abscísico. El papel del etileno no está muy claro, pero es importante destacar que este compuesto químico existe o puede existir de modo natural en los suelos, lo que tiene una gran importancia ecológica.

2. 3. 8. 2. Metabolismo de las semillas aletargadas.

a) Respiración:

Durante las primeras horas después de la imbibición, la respiración de las semillas aletargadas y en reposo es la misma para semillas de una misma especie. Los niveles de consumo de oxígeno aumentan rápidamente en estas primeras horas y luego se estabilizan. La respiración se efectúa en el eje embrionario. El consumo de oxígeno no cambia después de haberse estabilizado, incluso después de varios meses a menos que el letargo se interrumpa y la semilla comience a germinar.

b) Hormonas y enzimas:

Los niveles de ácido abscísico decrecen a medida que progresa la estratificación en frío. Hay un moderado aumento, generalmente transitorio, de los niveles de giberelinas y lo mismo sucede con las citocininas. Parece, por el contrario, que en las semillas aletargadas no se produce etileno.

c) Degradación de las reservas:

La movilización y la actividad de las enzimas dan lugar a la degradación de parte de las reservas. Disminuyen los lípidos, aumentan los azúcares y, en algunos casos, se acumula almidón. Las proteínas de los cotiledones o del endospermo comienzan a hidrolizarse, aumentan los aminoácidos libres y se sintetizan nuevas proteínas.

2. 3. 9. Conservación de las semillas.

En los últimos 50 años ha habido una evolución en nuestro conocimiento sobre la conservación y sus interrelaciones con el objetivo de alcanzar un desarrollo sostenible. Se han dedicado muchos estudios para conocer las bases científicas, técnicas, sociológicas y económicas implicadas en la implementación eficaz de las acciones de la conservación. A partir de estas bases ha surgido una disciplina conocida como biología de la conservación, como una respuesta de la comunidad científica a la ola de cambio global que amenaza una gran fracción de la diversidad biológica mundial.

La biodiversidad mundial está disminuyendo a una elevada velocidad. Entre los años 1996-2004, un total de 8321 especies vegetales fueron incorporadas a la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). Esta Lista Roja cataloga los taxones de especies con mayor riesgo de extinción global. Durante este periodo ha habido también un aumento de más del 60% en el número de plantas consideradas en peligro crítico. Estos datos resultan si duda alarmantes y requieren medidas inmediatas de conservación para salvaguardar muchas de estas especies.

Es por ello que recurrimos a la ayuda del germoplasma, el cual, es cualquier material capaz de transmitir los caracteres hereditarios de una generación a otra (Witt, 1985). El término germoplasma está formado por la raíz germen (“inicio” u “origen”) y plasma (“formación”), definiéndose como todo “material genético capaz de regenerar otra materia viva igual o similar a la original” (Perrino & Terzi, 2003). El germoplasma puede ser las distintas estructuras vegetales como esporas, tejidos o partes de plantas, incluyendo sus células y compuestos con información genética (ADN, ARN, etc.) y, de especial modo, las semillas. Las semillas constituyen la estructura más representativa y evolucionada de las plantas superiores para su perpetuación, siendo además el agente de dispersión más frecuente, eficaz y con mayor capacidad de regenerar una planta vascular completa a largo plazo.

La conservación de las semillas fue necesaria desde que las sociedades humanas desarrollaron la agricultura para mantener los ciclos de recolección y siembra. Los comienzos de recolectar y almacenar semillas de distintas especies de todo el mundo en

infraestructuras capaces de garantizar su viabilidad a largo plazo surgió en los años 20 y 30 del siglo XX, debido a la propuesta del científico ruso Nicolai Ivanovitch Vavilov (Koo *et al.*, 2004). Esta propuesta surgió debido al declive económico que vivió la nación rusa, de tal manera que se aumentaron los suministros de germoplasma de las especies de uso alimenticio e industrial y, a su vez, se mejoró la genética.

Los centros encargados de la conservación de la biodiversidad contenida en el germoplasma suelen denominarse “bancos de germoplasma”; o bien, “bancos de semillas” si el material conservado se basa principalmente en semillas. Estos bancos hasta hace poco centraban su interés casi exclusivamente en la conservación de las variedades agronómicas y de sus antecesores silvestres. Actualmente, en bancos de semillas casi el 90% de accesiones está representado por especies de interés alimentario, muchas de ellas variedades de alimentos básicos como trigo, maíz, arroz, alubias, sorgo, etc., que a una escala mundial se cultivan de forma intensiva, y que en conjunto tienen gran importancia económica.

En la actualidad, la abundancia de bancos de semillas con vocación de preservar plantas silvestres raras o en riesgo de extinción es consecuencia de los acuerdos y obligaciones adoptados tras la Cumbre de la Tierra, celebrada en Rio de Janeiro en 1992, para evitar la pérdida de diversidad biológica, y que quedó materializado en el Convenio de Diversidad Biológica (CDB).

La primera iniciativa para la creación de un banco de semillas dedicado a plantas silvestres se desarrolló en 1966 en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM), mucho antes del Convenio de Diversidad Biológica (CDB). Como primer banco de germoplasma del mundo especializado en la conservación de plantas silvestres. Este banco se centró primeramente en la conservación de especies de crucíferas silvestres, iniciando, a comienzos de los setenta, proyectos de conservación *ex situ* de plantas endémicas de la Península Ibérica y de la región Macaronésica.

Gracias a las iniciativas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (www.fao.org), hoy en día existen millones de accesiones vegetales conservadas gracias a la actividad de 1.300 bancos de semillas. Ello representa, sin embargo, tan solo una pequeña fracción de la biodiversidad mundial, ya que numerosas regiones del planeta no han desarrollado aun acciones de este tipo, o se han dedicado principalmente a especies cultivadas. Los bancos dedicados a plantas silvestres utilizan los conceptos de rareza, amenaza, vulnerabilidad o endemidad como criterios orientativos para la selección de material a ser conservado, sin por ello dejar de lado otras especies, cultivares o variedades igualmente importantes por su contribución a la biodiversidad.

Hasta hace algunos años, la actividad de los bancos de germoplasma con accesiones de plantas silvestres se organizaba con base a la regeneración y conservación

del mayor número de muestras de flora rara o amenazada, generalmente en el ámbito de los territorios de origen. El aumento del número de accesiones de estas colecciones derivó en problemas de gestión de espacio y de planificación de la actividad, prestando poca atención a la representatividad genética (intrapoblacional e interpoblacional) de cada taxón conservado. En los últimos años se ha demostrado la importancia de los controles genéticos y la necesidad de conservar poblaciones representativas, por lo que las actividades de recolección modernas se basan en una planificación rigurosa que permita conservar el mayor número de representatividad genética en el menor número posible de accesiones.

En los últimos años también ha sido necesario corregir los mecanismos de conservación para los grupos taxonómicos que presentan dificultades derivadas de sus características biológicas (ej. *Orchidaceae*). En ocasiones algunos de los bancos nacidos en el seno de los jardines botánicos se preocuparon más en la conservación de especies exóticas u ornamentales, a menudo resultado de los tradicionales intercambios de *Index seminum* u otras colaboraciones, descuidando la conservación de especies autóctonas. En la actualidad, la situación ha dado un giro de 180 grados, y la función principal de los bancos de germoplasma nacidos y sustentados en los jardines botánicos se centra en la conservación de las plantas silvestres endémicas, raras y amenazadas, tomando como área primordial de trabajo las regiones geográficas en donde están ubicados.

Los bancos de germoplasma, en su concepción actual, constituyen sistemas esenciales para prevenir la pérdida de biodiversidad genética y garantizar así un futuro a las especies en peligro de extinción. Gran parte de las infraestructuras para la conservación de la biodiversidad nacen con el objetivo de contrarrestar la pérdida exponencial de especies debida, en parte, a fenómenos naturales y, principalmente, a las actividades antrópicas sobre los ambientes naturales (destrucción, contaminación, etc.). Su función no es solo salvaguardar las semillas de las especies en peligro, sino también conservar, mediante técnicas de preservación a largo plazo, esporas, esquejes, tejidos o cualquier otro material que constituya parte de la biodiversidad genética del planeta. En muchos centros de conservación de germoplasma especializados en flora silvestre se estudian además estrategias de actuación adecuadas para la conservación *in situ* de especies en peligro, disponiendo de la información necesaria sobre biología reproductiva, germinación o métodos de producción vegetal que permitan desarrollar con éxito proyectos de recuperación. De este modo, la filosofía de la conservación converge, especialmente para los taxones con mayor riesgo de extinción, hacia las actividades de conservación *in situ*, con el fin de preservar las plantas directamente en su ambiente natural. Por este motivo, los centros de conservación de plantas han intensificado, junto a la conservación *ex situ*, los estudios sobre biología de la conservación, colaborando también en acciones administrativas para la conservación (ej. Redes de espacios protegidos, redes ecológicas de conectividad territorial, etc.). En este sentido, la conservación *ex situ* debe considerarse como un instrumento de gran utilidad, indispensable para las intervenciones *in situ*, y de modo especial en casos

extremos de extinción inminente de poblaciones naturales, como única vía posible para su preservación.

La delimitación del área geográfica de competencia constituye un aspecto fundamental para la determinación de los programas y las políticas de intervención de los bancos de germoplasma actuales. Para una correcta gestión del territorio y una coherente labor de conservación y defensa de la biodiversidad, es necesario delimitar el área geográfica de origen de las accesiones, activándose una red de contactos y un intercambio de información bidireccional con otros organismos involucrados en la protección de la naturaleza y su valoración (administraciones locales, espacios protegidos, universidades, jardines o estaciones botánicas, laboratorios de investigación, asociaciones, aficionados privados, etc.). Es en este contexto en el que se hace posible la colaboración y el intercambio de germoplasma, recursos económicos y conocimientos. Siguiendo este objetivo, cada banco de germoplasma debe estructurarse en modo tal que pueda garantizar que la recolección de material se realice con total respeto a las normativas vigentes en el ámbito local, nacional, y regional, cumpliendo de igual modo los convenios internacionales que regulan estas actividades, principalmente derivados del Convenio de Diversidad Biológica (CDB). Con ese fin, cada banco de germoplasma debe cuidar con especial atención la obtención y actualización de permisos y autorizaciones correspondientes, evaluando la preparación científica y técnica de sus colaboradores, y garantizando prácticas respetuosas frente a terceros.

El reto de intentar detener la pérdida de biodiversidad vegetal es enorme y, si ya son costosas e insuficientes las medidas que se están adoptando en los países ricos, hay que buscar medidas imaginativas y de cooperación con los países pobres, sometidos al torbellino de destrucción y extinción de los recursos naturales del que todos somos responsables.

2. 3. 10. Recolección y gestión.

La recolección constituye, quizás, la actividad más crítica en cualquier banco de germoplasma, ya que de ella depende la eficacia de cualquier estrategia de conservación *ex situ*. Una vez conocida la distribución, ecología y características biológicas de un taxón, y diseñado el método de muestreo más adecuado, las técnicas de recolección y gestión pueden incidir de manera positiva o negativa en la calidad y viabilidad del germoplasma, por lo que resulta imprescindible garantizar unos protocolos mínimos para el desarrollo de esta actividad. En este apartado se detallan algunas de las pautas generales que deberían considerarse para la recolección en un banco de germoplasma, considerando por separado las condiciones especiales que atañen a las semillas, polen y esporas.

2. 3. 10. 1. Recolección en campo.

Durante la recolección es importante tener en cuenta el estado de maduración de los frutos y semillas, así como su localización en la planta, ya que la diferente posición en la inflorescencia puede dar lugar a una maduración escalonada de las semillas.

La observación de la polinización también puede aportar datos importantes a la forma de proceder a la recolección. La polinización con polen proveniente de distintos donantes puede llevar a una maduración heterogénea de los frutos producidos; en los óvulos de plantas que han sido fecundadas en un primer momento es más fácil que se desarrollen semillas que en las plantas fertilizadas tardíamente (Lee, 1988). Para reducir el riesgo de pérdida de semillas maduras, la recolección debería desarrollarse a lo largo de todo el periodo de dispersión de las semillas, registrando de manera individual cada recolección. La longevidad de una muestra de semillas que llega al banco de germoplasma está fuertemente determinada por su calidad en el momento de la recolección, sobre todo en las semillas consideradas “ortodoxas”, que son aquellas cuya conservación depende esencialmente del contenido de humedad y de la temperatura. Como norma general, debería recogerse el mismo número de semillas (o frutos) de cada planta, en el mismo estado de maduración y justo antes del momento de la diseminación.

La forma en que se han recogido las semillas puede igualmente influir en los resultados de los ensayos de germinación realizados en el laboratorio y en la capacidad para superar posibles dormiciones. Ha sido demostrado que, para algunas especies, dichas variaciones pueden depender de la posición que las semillas tienen en el interior del fruto (ej. semillas basales más durmientes que semillas apicales) o de su distribución en la planta (Toole *et al.*, 1964). Además, el peso y el tamaño de las semillas también pueden influenciar la calidad del lote y su respuesta en los ensayos de viabilidad. En concreto, algunas especies de la familia *Poaceae* desarrollan dos tipos morfológicos de semillas, de las cuales las más grandes dan lugar a plantas más vigorosas y con mayor capacidad de germinación (Lahiri & Kharabanda, 1961).

2. 3. 11. Momento idóneo para la recolección.

En muchos casos las semillas no pueden ser recolectadas separadamente, sino junto a los frutos que las contienen. De este modo se evita interrumpir el proceso de maduración fisiológica que se está produciendo, a la vez que se favorece la adquisición, por parte de las semillas, de la tolerancia a la deshidratación.

Sabiendo que las semillas producidas por los frutos no carnosos, sean estos dehiscentes o indehiscentes, son en las primeras fases del desarrollo intolerantes a la deshidratación, la recolección se debe efectuar en una fase posterior, cuando la semilla es capaz de absorber agua y, por lo tanto, tolera la deshidratación. Seleccionar este momento no es fácil. Cuando no existe experiencia, algunos indicios en el fruto (carnoso o no carnosos) pueden ayudar en la forma de proceder:

- El cambio de coloración puede ser un buen indicador, aunque no siempre es fiable.
- El tamaño del fruto en las drupas está relacionada con el desarrollo completo de sus semillas.
- El endurecimiento del pericarpo de determinados frutos se manifiesta únicamente cuando el embrión se ha desarrollado.

Una recolección anticipada puede proveer de materiales con bajo poder de germinación. Por otro lado, una recolección demasiado tardía puede ocasionar pérdidas de material debidas a la dispersión natural, como la predación por parte de animales o a fenómenos meteorológicos como granizo o lluvias intensas.

2. 3. 12. La prueba del corte.

Después de seleccionar la población que se va a muestrear se debería examinar con atención una primera muestra de las semillas usando la “prueba del corte” (Fotografía 1), utilizando en el caso de semillas muy pequeñas una lupa de campo. Este simple análisis preliminar permitirá realizar una estimación bastante aproximada sobre la calidad del material, la cantidad de semillas vacías o estropeadas y el momento óptimo para la recolección.

La prueba consiste en realizar una sección de un número representativo de semillas por la mitad, utilizando una cuchilla o un bisturí. Las semillas de buena calidad presentan sus tejidos turgentes, sanos, con el color típico de cada especie (generalmente blancos o marfileños) y sin daños producidos por patógenos o insectos. El número adecuado de semillas utilizadas varía en función de cada especie, si bien es necesario tener en cuenta que en el caso de lotes de calidad mediocre el corte de pocas semillas puede llevar a sobrestimar el número de semillas sanas (Suszka *et al.*, 1994).



Fotografía 1: Prueba del corte en un semilla de *Pancratium maritimum* L. (Bacchetta *et al.*, 2008).

2. 3. 13. Recolección de pliegos de herbario y/o material vivo.

Excepto en el caso de poblaciones amenazadas, es necesario recoger siempre un pliego testigo de la población. Estos ejemplares de herbario deberán portar el mismo número de referencia de la correspondiente colección de semillas y lo ideal sería que fueran muestras completas que, en el caso de plantas herbáceas, incluyan flores, frutos, partes vegetativas y raíces.

2. 3. 14. Almacenamiento.

La práctica normal de los bancos de germoplasma es recolectar semillas en el campo, limpiarlas, secarlas e introducir las en los recipientes al uso para su conservación a largo plazo en frigoríficos o congeladores, en un ambiente lo menos húmedo posible. Si disponemos de estimaciones del área del vecindario genético estimadas a partir de auto correlación espacial (área donde se espera una distancia genética menor entre individuos) deberíamos también conservar esa información junto con las semillas. En

estos casos, es adecuado (y no consume mucho tiempo) almacenar las semillas recolectadas en cada vecindario genético dentro de un mismo recipiente, separándolas de las semillas que provengan de otros vecindarios genéticos de la misma población, que deberían ser guardadas en otro recipiente y tratados como otra accesión. La información sobre la situación espacial de las semillas puede ser crucial para minimizar los efectos de la consanguinidad en eventuales reintroducciones o reforzamientos que se lleven a cabo con ellas.

A menudo sorprende la cantidad de recursos materiales y humanos que se invierten en el rescate de especies (especialmente animales) que ya no tienen apenas variabilidad genética y que están en un callejón evolutivo cuya única salida es la extinción. Ciertamente, la espectacular publicidad que en ocasiones acompaña a estas acciones puede ayudar a concienciar a los niños y a los adultos no especialistas, pero todo este despliegue de medios va en detrimento de otros organismos de interés que aun no están en peligro y que todavía tienen mucha variabilidad genética que conservar. La situación de cambio climático y su previsiblemente rápido impacto en la disminución del rango de distribución de especies actualmente abundantes deberían propiciar una redefinición de los criterios de adjudicación de recursos para que la conservación *ex situ* sea más coherente con las prioridades genéticas enfatizadas por la Convención sobre Diversidad Biológica (Grupo de Gran Canaria, 2006).

2. 3. 15. Conservación de las accesiones recolectadas en el campo.

Las muestras de germoplasma, lotes o ejemplares recolectados en el campo deben de ser conservados en un lugar fresco y sombrío, antes de ser enviados al banco. Se detallan algunas recomendaciones a seguir para una correcta conservación de las muestras:

- No dejar el germoplasma en lugares con altas temperaturas (vehículo, etc.). La exposición a temperaturas elevadas y la radiación directa del sol puede dañar y estropear la muestra.
- Mantener siempre una buena ventilación en torno al germoplasma; utilizar solo y exclusivamente bolsas de papel o sacos de algodón que garanticen una correcta transpiración.
- Comprobar siempre que las bolsas y sacos estén bien cerrados con el fin de evitar la pérdida y/o la contaminación del germoplasma que se ha recogido.
- Cerrar las bolsas preferiblemente con clips; en caso de usar cinta adhesiva se debe tener la precaución de aplicarla únicamente en el exterior del envoltorio puesto que, al abrir la bolsa, el material puede quedar pegado al adhesivo y ser inservible.

- En ningún caso congelar el germoplasma antes de entregarlo al banco de germoplasma.
- Si se han recogido frutos carnosos en el momento óptimo de maduración, se aconseja quitarles las partes carnosas lo más rápidamente posible tras la recogida, para evitar fermentaciones que puedan dañar la germinación. Este proceso debería llevarse a cabo en el banco. Cuando no es posible entregar los frutos inmediatamente al banco, ni limpiarlos, se pueden conservar en un frigorífico a pocos grados centígrados (0-5° C).

2. 3. 16. Extracción de semillas de los frutos.

En la mayor parte de los casos es aconsejable delegar las operaciones de limpieza al banco o al personal especializado. Si las semillas han sido recogidas completamente maduras y se encuentran dentro de los frutos o en capsulas secas, se puede proceder de manera rápida y segura a la apertura de los frutos y extracción manual de las semillas.

En los frutos carnosos la tolerancia a la desecación se manifiesta de forma tardía en las semillas. Los indicadores morfológicos de este proceso no siempre se manifiestan en el fruto, permaneciendo las semillas con elevada humedad interna. En el caso de que la entrega al banco se posponga durante algunos días, se recomienda extender las semillas en una capa sobre papel absorbente con el fin de maximizar la aireación y permitir la deshidratación, para alcanzar un equilibrio con las condiciones ambientales que rodean a las semillas. Estas condiciones deben de mantenerse lo más constantes que sea posible, al menos en lo referente a la humedad relativa y a la temperatura, controlándolas diariamente.

2. 3. 17. Estado fitosanitario del material recogido.

El transporte del germoplasma puede difundir distintas patologías o agentes patógenos. Por ello, en muchos países se ha elaborado una legislación que regula el ingreso e, incluso, el movimiento interno de las plantas.

La difusión de agentes patógenos puede comprometer de forma muy seria la viabilidad de las semillas recogidas. Si el material se multiplica puede, además, difundir infecciones a otras especies o territorios.

Puesto que este tipo de riesgos son reales, se debe documentar la presencia de patologías y el estado sanitario de la población de la que se ha recogido el material,

además de los posibles tratamientos a los que haya podido estar expuesto el germoplasma; como por ejemplo fumigación, pretratamientos fungicidas, etc. Por ello, puede ser necesaria la ayuda y experiencia de un fitopatólogo o de un entomólogo (Frison & Jackson, 1995). Por regla general, el riesgo de transmitir enfermedades es mayor cuando se transportan también las raíces de las plantas, ya que muchos agentes patógenos permanecen en el suelo, siendo de esta manera transportados con la muestra

Antes de realizar un envío de material con fines científicos o de conservación, hay que asegurarse de que no sea necesario acompañarlo de un certificado fitosanitario; actualmente, la normativa comunitaria permite la libre circulación de germoplasma dentro de la Unión Europea, mientras que para el material proveniente de terceros países se requieren certificados de procedencia, así como documentación fitosanitaria. En concreto, la Directiva de la Comisión Europea del 15 de octubre de 2004, determina los modelos de certificados fitosanitarios oficiales o de certificados fitosanitarios de exportación que acompañan a los vegetales, productos vegetales u otro tipo de material vivo proveniente de terceros países, que se encuentran incluidos en la Directiva 2000/29/CE.

Una vez que se verifica el material recibido y su documentación, el banco se convierte en el responsable de su correcta gestión, y debe elegir la metodología más adecuada para su limpieza, conservación y multiplicación, a no ser que esté ya especificada. Los responsables del banco deben valorar si se debe trabajar con todo el lote o con parte de él, en función de las prioridades del banco, la importancia del material y la cantidad recibida.

2. 3. 18. Tratamiento del germoplasma antes de su conservación.

2. 3. 18. 1. Ingreso del germoplasma en el banco.

Cuando el material se encuentra en el banco de germoplasma y se han realizado los controles fitosanitarios necesarios, se procede a la introducción de la información en la base de datos, comprobando si existe la necesidad de adoptar determinadas precauciones en su manipulación.

Es de fundamental importancia indicar en el registro la siguiente información:

- Nombre del taxón.
- Numero de entrada del lote.
- Fecha de ingreso en el banco.

- Calidad de la limpieza de las semillas o el tipo de tratamientos a los que han sido sometidas.
- Procedencia del lote: nombre de la localidad de muestreo y nombre o código del recolector o del centro del que proviene el material.
- Objetivo o proyecto para el cual se ha llevado a cabo la recolección

En las dependencias donde se almacena el material, se comprueba la validez e integridad del germoplasma recogido, efectuando la “prueba del corte” en el caso de que no haya sido ya efectuada en el campo y determinando el porcentaje de semillas frescas.

2. 3. 18. 2. Cuarentena.

Antes de introducir en las dependencias del banco el material recogido en el campo, se debe respetar un periodo de cuarentena (de tiempo variable) en el que el germoplasma se almacena en un ambiente externo y aislado del banco. Este procedimiento permite valorar el estado fitosanitario del material y determinar la presencia de hongos o parásitos fitófagos o dañinos. De hecho, no es raro encontrar, incluso en material perfectamente tratado y limpio, semillas que presentan daños u organismos dañinos que pueden estropear el germoplasma.

2. 3. 18. 3. Limpieza y manejo del germoplasma.

De las semillas que cumplan los requisitos adecuados, se extrae una pequeña cantidad que será testada para estimar el porcentaje de germinación y la validez del material recogido.

Los procedimientos de trabajo serán considerados como válidos y las semillas podrán continuar siendo manipuladas si el porcentaje de germinación es mayor del 50%, excluyendo los casos en los que sea difícil conseguir cantidades suficientes de germoplasma, cuando la población este en riesgo de extinción o cuando la capacidad de germinación típica de la especie sea muy baja.

La calidad del lote puede ser también estimada a través de observaciones directas (de color, tamaño, presencia de parásitos) o mediante pruebas de viabilidad como la “prueba del corte”, si no ha sido ya realizada en el campo en el momento de la recolección. Además, deben eliminarse las impurezas presentes en las semillas: polvo, residuos resinosos, semillas vacías o abortadas, semillas dañadas por insectos y/o infectadas. Estos trabajos pueden realizarse de tres formas:

- 1) **Extracción manual:** generalmente se utiliza una base construida con plástico blando, sobre la que se depositan pequeños trozos de los frutos o inflorescencias. El operario, utilizando un tampón de madera (revestido en su parte inferior con el mismo plástico que la base sobre la que se trabaja), ejerce fuerza de forma más o menos perpendicular al plano de trabajo, para desmenuzar y separar las semillas de otras estructuras de la flor o del fruto, para luego ser cribadas mediante tamices con diferentes mallas. En los casos en los que no se pueda desarrollar esta técnica, el trabajo manual se podrá llevar a cabo con utensilios y/o instrumentos de laboratorio (ej. pinzas, agujas, etc.).
- 2) **Métodos mecánicos:** el trabajo con pocas cantidades de semillas normalmente se lleva a cabo con pequeños aparatos en el laboratorio (Gorian, 2001). Los más comunes realizan una selección de tipo gravimétrico, emitiendo un flujo de aire que separa las impurezas de las semillas y las semillas viables de las vacías, estandarizando las semillas por dimensiones y peso. Cada grupo de semillas necesitará de un número de ciclos directamente proporcional a la homogeneidad del material y al tipo de germoplasma que se está limpiando.
- 3) **Métodos manuales o mixtos:** el uso combinado de técnicas manuales y mecánicas se utiliza cuando a una primera limpieza manual, más grosera, le sigue una posterior limpieza mecánica y, para finalizar, una tercera limpieza manual muy precisa.

2. 3. 18. 4. Caracterización del germoplasma.

La caracterización de germoplasma es una función comúnmente atribuida a los bancos de semillas de plantas cultivadas que, en el caso de especies silvestres debería corresponderse con una actividad de investigación complementaria. Es de gran utilidad para la conservación, pero requiere de una infraestructura y recursos no siempre disponibles. Entre los principales factores que condicionan la calidad de las semillas figuran: el patrimonio genético, la edad y el tipo de gestión a la que se ha sometido la planta madre, las condiciones climáticas y fisiológicas de la planta madre durante la formación de la semilla, el grado de madurez en el momento de la recogida, la técnica de recolecta y los métodos de conservación (Piotto & Di Noi, 2001).

La calidad del germoplasma se puede expresar mediante parámetros que midan el comportamiento de la semilla *in situ* y *ex situ*. Antes de ser conservadas, las semillas deben ser sometidas a pruebas cualitativas para determinar su capacidad de germinación y viabilidad:

- a) **Capacidad germinativa:** es el porcentaje de semillas germinadas (normales y anómalas). Es considerado el parámetro más útil para valorar un lote de semillas, aunque no explica otros componentes de su calidad.
- b) **Vigor germinativo:** el vigor germinativo de las semillas se define como la suma total de las propiedades que determinan el nivel de actividad y el comportamiento de los lotes durante la germinación en una amplia gama de ambientes (ISTA, 2004). Es un concepto que agrupa diferentes aspectos del comportamiento de las semillas, como la velocidad y la uniformidad de la germinación y el desarrollo de la plántula; la capacidad de emergencia de la plántula en condiciones desfavorables; o el comportamiento tras la conservación (en particular la capacidad de conservar su poder germinativo inicial).

2. 3. 18. 5. Viabilidad.

Se considera que una semilla es viable cuando presenta las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas fundamentales para su germinación. La pérdida de viabilidad generalmente viene acompañada de la reducción de la capacidad respiratoria, del contenido de ácidos grasos insaturados, de lípidos de membrana, de actividad enzimática y del contenido de ARNm. Las pruebas para determinar la viabilidad sólo dan una estimación de la calidad de las semillas (indicando si la semilla está “viva” o no), pero son muy rápidas (24 / 28 horas) en relación a las pruebas de germinación.

La viabilidad no debe ser confundida con la capacidad germinativa, de hecho las semillas viables durmientes no necesariamente germinan. Aunque erróneamente utilizados como sinónimo de viabilidad, los ensayos de germinación nos permiten cuantificar la capacidad germinativa de los lotes de semillas analizados, pero poco o nada nos aportan sobre las semillas que no han germinado. La utilización paralela de ensayos de germinación (incluyendo pruebas para romper la dormición) y de ensayos de viabilidad nos aporta información más fiable sobre el estado de las semillas que pretendemos conservar o estamos conservando.

2. 3. 18. 6. Desecado.

Las semillas pueden ser clasificadas en dos categorías principales en base a su respuesta frente a la deshidratación y a su comportamiento durante la conservación.

El primer grupo, definido como semillas “ortodoxas”, son aquellas cuya conservación depende esencialmente del contenido de humedad y de la temperatura. Este grupo de semillas pueden ser sometidas sin problemas a bajos valores de humedad (incluso a niveles muy inferiores a los que se alcanzan en condiciones naturales).

Su longevidad aumenta al disminuir la temperatura y el contenido en humedad. Actualmente las semillas ortodoxas son también denominadas como “tolerantes a la deshidratación”. Pertenecen a este grupo la mayor parte de las semillas de climas templados y mediterráneos (Hong *et al.*, 1998). Las posibles alteraciones a que pueden verse sometidas las semillas ortodoxas durante la conservación se muestran en la siguiente Tabla 1.

Contenido de humedad	Posibles alteraciones durante la conservación
Inferior al 5%	Oxidación de lípidos
Entre 5 y 6%	Prácticamente ninguna (nivel óptimo para la conservación de semillas de numerosas especies)
Entre 10 y 18%	Marcado desarrollo de la actividad de criptógamas
Superior al 18 %	Aumento de la respiración
Superior al 30%	Germinación de semillas no durmientes

Tabla 2. Comportamientos de las semillas ortodoxas durante la conservación a bajas temperaturas, en función del contenido de humedad (Bacchetta *et al.*, 2008).

Para poder afrontar la deshidratación, los tejidos celulares deben ser capaces de limitar o reparar los daños sufridos y mantener su integridad fisiológica durante el periodo en el que el tejido está seco. Además, deben poner en marcha, durante la fase de rehidratación, los mecanismos necesarios para la posible reparación de los tejidos (Black & Pritchard, 2002).

El segundo grupo, el de las semillas “recalcitrantes”, también llamadas “sensibles a la deshidratación”, agrupa a las semillas que no toleran una deshidratación significativa respecto al contenido de humedad presente en el momento de la diseminación (en general variable entre un 20% y un 70%, aunque más frecuentemente entre el 30% y 50%).

Estas semillas no pueden conservarse con altos niveles de humedad porque tienden a germinar en poco tiempo, ni pueden mantenerse a temperaturas inferiores a 0° C, ya que los tejidos sufrirían daños por la congelación del agua contenida en ellas. Para la conservación de este tipo de semillas se están desarrollando técnicas alternativas que prevén la crioconservación en nitrógeno líquido de los embriones; estructuras muy pequeñas bastante resistentes a la desecación y relativamente uniformes en dimensiones y contenido en humedad.

Una tercera categoría es la de las “semillas intermedias” (Dickie & Pritchard, 2002), que agrupa las semillas que soportan mejor la deshidratación que las recalcitrantes, pero peor en comparación con las ortodoxas. En este caso, las semillas parcialmente deshidratadas no toleran el estrés producido por bajas temperaturas (inferiores a 0° C), pero se comportan mejor si son expuestas a temperaturas más benignas (en torno a los 15° C). En general, esta tipología de semillas tolera una deshidratación hasta valores de humedad comprendidos entre el 10% y el 20% (Hong *et al.*, 1998).

a) Cámaras de desecado.

La disminución de la humedad de las muestras de semillas se puede realizar de diferentes formas, tales como mediante la exposición al aire en ambientes secos, ventilados y sombríos.

Los bancos de germoplasma generalmente utilizan cámaras de deshidratación que, aunque son bastante costosas, producen óptimos resultados. El material destinado a la deshidratación se almacena en una cámara (Fotografía 2) que, mediante deshumidificadores y aire acondicionado, mantienen valores de humedad relativa del 10-15% y temperaturas entre los 10° C y 25° C (FAO/IPGRI, 1994), para evitar que los tegumentos seminales sufran bruscas fracturas y/o arrugamientos. Este tratamiento tiene una duración variable en función de las características de las semillas y puede oscilar entre 30 y 180 días. Es importante que los lugares donde se realiza la desecación permitan una buena circulación de aire, garantizando 10 recambios de aire por hora. Otra alternativa, mas económica e igualmente eficiente, es la utilización de cámaras, generalmente de metacrilato, con gel de sílice en su interior, el cual se recambia periódicamente.



Fotografía 2: Equipamiento para la deshidratación de BG-SAR: medidor con los valores ambientales de humedad relativa y temperatura (primera fotografía); deshumidificador químico (segunda fotografía); y material almacenado (última fotografía) (Bacchetta *et al.*, 2008).

b) Desecantes artificiales.

También se puede conseguir la deshidratación de las semillas utilizando desecantes artificiales como el gel de sílice (Fotografía 3), poniéndolo en contacto con las semillas dentro de contenedores herméticos. Con su poder de absorción este compuesto disminuye el contenido de humedad interna de los lotes de semillas hasta valores que garanticen su conservación a medio y largo plazo (Probert, 2003). La cantidad de desecante que se debe usar varía en función de la composición de las semillas, de la cantidad de material y, sobre todo, de su contenido en aceites.



Fotografía 3: Diferentes tipos del gel sílice autoindicadores (Bacchetta *et al.*, 2008).

c) Ultradesección.

El procedimiento estandarizado en la mayor parte de los bancos de germoplasma actuales consiste en secar las semillas hasta contenidos de humedad del 5 al 7% aproximadamente, colocarlas en envases de hermeticidad (muchas veces no contrastada), y someter el material a bajas temperaturas. Quizá solo un centenar de bancos, sobre todo de semillas silvestres, entre los más de 1.400 que existen en el mundo, han utilizado hasta la fecha la ultradesección, procedimiento contrastado en el caso del banco de la UPM (Madrid) para un ultrasecado de hasta un 1-3% de contenido

de humedad en semillas ortodoxas (Pérez-García *et al.*, 2007), indicando además la relativa menor importancia de la temperatura en semillas ya ultrasecas. Debe hacerse notar que un contenido de humedad algo más alto (4% y hasta 5%) puede bastar para una efectiva conservación de algunas especies ortodoxas, sobre todo leguminosas (Ellis, 1988), pero, como indican estos mismos autores, dichas semillas no sufren si se siguen secando hasta un 1-3%. En un banco donde se manejen cientos o miles de accesiones, lo deseable es no individualizar los métodos, por lo que la ultradeseccación puede aplicarse con carácter general, siempre que se trate de semillas ortodoxas. La ultradeseccación puede conseguirse con distintos procedimientos, como las sustancias absorbentes de la humedad, la liofilización (congelar súbitamente el agua de una muestra y sublimar posteriormente el hielo), la inmersión en gases secos o los filtros moleculares.

Mención especial merece la ultradeseccación con gel de sílice, pues se consigue fácilmente poniendo las muestras en un envase cerrado en presencia de gel deshidratante (Fotografía 4). La muestra suele tener inicialmente un contenido de humedad más o menos alto (normalmente 10-12%), por lo que el gel se hidratará a costa de la muestra y cambiará de color. Necesitaremos entonces sustituir el gel por otro nuevo deshidratado, operación que a veces debe repetirse varias veces. Sólo cuando el gel no cambie de color, la semilla estará ultraseca, tendrá un contenido de humedad entre el 1 y 3% (dependiendo del tipo de semilla) y se mantendrá en equilibrio con el gel indefinidamente, si el envase permanece hermético.



Fotografía 4: Tarro con gel de sílice en el fondo (Bacchetta *et al.*, 2008).

Como alternativa al control de humedad en envases, en ocasiones se controla la humedad de la cámara misma, convirtiendo las cámaras frías existentes en cámaras

secas. Manteniendo la temperatura alrededor de 0 °C (más que suficiente, como se verá más adelante) no resulta difícil ni caro conseguir en el interior una humedad relativa de aproximadamente el 15% y tal solución sería en cualquier caso mucho más eficaz que disponer de una cámara a -20 °C donde se descuide la hermeticidad de los envases. Sin embargo, el control de la humedad dentro de los envases mismos con gel de sílice es, a la larga, mucho más práctico y eficaz, porque permite alcanzar niveles de ultrasecado más idóneos y una mejor monitorización, permitiendo además un traslado rápido del material a otras cámaras, en caso de mudanza o problemas técnicos.

2. 3. 19. El factor baja temperatura.

El uso de bajas temperaturas ha sido algo muy generalizado en la conservación de semillas a largo plazo. Los estándares publicados conjuntamente por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y el Instituto Internacional para los Recursos Genéticos Vegetales (IPGRI, hoy *Bioversity International*) recomiendan una temperatura de almacenamiento de -18 °C o inferior (FAO/IPGRI, 1994). Esta recomendación se ha mantenido hasta nuestros días, de modo que la planificación de un banco de semillas moderno incluye siempre la utilización de una cámara fría capaz de conseguir al menos -15° o -20 °C. La localización de las nuevas instalaciones del Banco Nórdico en una región de “permafrost” responde a esa misma idea.

Sin embargo, y desgraciadamente, el poner énfasis en las bajas temperaturas puede llevar a descuidar el factor de baja humedad (sea por no secar lo suficiente o por utilizar envases inadecuados), haciendo que una gran parte de los actuales bancos de germoplasma estén ya preocupados por la baja capacidad germinativa de sus semillas y por la necesidad de regenerar un material prematuramente envejecido. Semillas ultradeseccadas por liofilización en el *Conservatoire Botanique National Méditerranéen* (CBNM) de Porquerolles, y mantenidas a temperatura ambiente durante 10 años, mostraron un comportamiento ligeramente mejor que las conservadas a baja temperatura. A un plazo mucho más largo, semillas ultradeseccadas con gel de sílice en el banco de la UPM (Madrid) y mantenidas 40 años en un armario a temperatura ambiente (Pérez-García *et al.*, 2007, 2008) no se comportaron de forma distinta que las conservadas en cámara fría.

En conclusión, parece claro que el papel preponderante que se ha dado al factor temperatura, al menos en la práctica, debe sustituirse por una atención mucho más decidida hacia el factor humedad. No obstante, parece evidente que la baja temperatura complementa la conservación, por lo que sería poco sensato prescindir de ella. Sin embargo, temperaturas moderadamente bajas, entre -5 °C y 5 °C, pueden ser más que suficientes para las semillas ortodoxas y ultrasecas, ahorrándose con ello enormes

cantidades de energía. Por su implicación práctica y fisiológica, no debe confundirse la crioconservación con las bajas temperaturas.

2. 3. 20 La necesidad de nuevas herramientas de conservación.

2. 3. 20. 1. Biotecnología y conservación vegetal.

El mantenimiento y propagación de especies en jardines botánicos, así como en bancos de semillas y esporas, ha supuesto tradicionalmente un valioso seguro de vida contra la pérdida de muchas especies de plantas silvestres. La biotecnología moderna ofrece el potencial de extender estos métodos tradicionales de preservación *ex situ* y propagación a un rango mucho más amplio de taxones y también de tipos de tejidos vegetales, no sólo semillas. Si bien estas técnicas se desarrollaron en principio para especies de uso agrícola u hortícola, están siendo cada vez más aplicadas para la recolección, propagación, preservación y evaluación de germoplasma procedente de especies raras y/o amenazadas (Pence, 1999).

La limitada cantidad de material vegetal disponible es un factor que condiciona el trabajo con especies en peligro. La capacidad de ensayar protocolos o de realizar experimentos replicados se puede ver considerablemente limitada en estos casos, por lo que con frecuencia la experiencia con especies relacionadas, pero que no estén en peligro, suele ser utilizada como guía. Si la especie en cuestión produce un pequeño número de semillas, entonces el uso de tejidos distintos de las semillas será el objetivo principal. Por otro lado, las plantas pueden estar localizadas en lugares remotos o de difícil acceso y las expediciones para recolectar material vegetal resultan costosas, sin olvidar el hecho de que en muchos casos se requieren permisos para la recolección y para el transporte del material recogido (Pence, 1999).

2. 3. 20. 2. Integrando la biotecnología en los programas de conservación.

Las herramientas de la biotecnología moderna están siendo cada vez más aplicadas para la caracterización de la diversidad vegetal e, indudablemente, tienen un papel principal asistiendo a los programas de conservación de plantas. Sin embargo, su valor depende de que los métodos biotecnológicos estén dirigidos eficazmente y utilizados como tecnología complementaria. Es importante reconocer que la integración

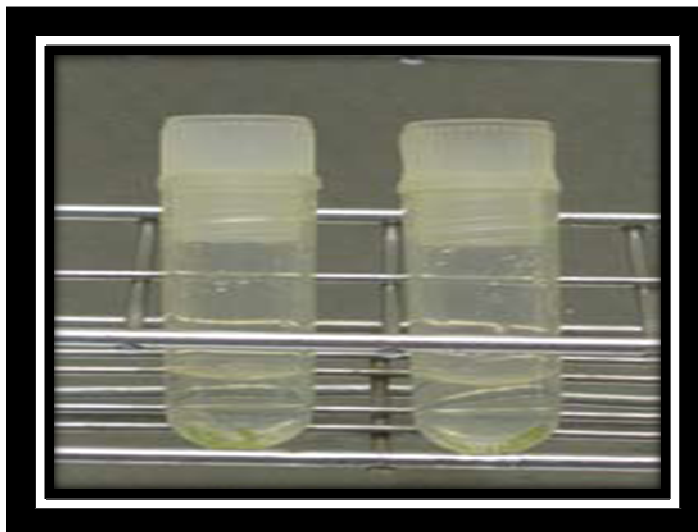
efectiva de la biotecnología en los programas de conservación requiere una clara cooperación multidisciplinar e interdisciplinar (Benson, 1999).

Hay cuatro áreas principales en las que la biotecnología moderna puede asistir directamente a los programas de conservación vegetal:

- 1- Tecnología de los marcadores moleculares.
- 2- Diagnóstico molecular.
- 3- Cultivo de tejidos (tecnologías *in vitro*).
- 4- Criopreservación.

Es de especial interés mencionar que la conservación a largo plazo de semillas se ha visto favorecida con la aplicación de técnicas de criopreservación, en unas condiciones tales que los procesos metabólicos de la semilla, y en particular los enzimáticos, se paralizan a causa de la ausencia de agua en estado líquido. De esta manera se puede preservar la viabilidad de semillas por un periodo potencialmente indefinido. La eficacia de esta técnica, demostrada en pruebas de laboratorio con numerosas especies, llevó a muchos investigadores a considerar la criopreservación como la única técnica actualmente disponible que asegura una conservación de semillas a largo plazo real y fiable en cualquier situación. A continuación se explican algunos de los progresos llevados a cabo en el campo de la criopreservación de semillas ortodoxas y recalcitrantes de plantas raras, endémicas o amenazadas.

Las semillas ortodoxas pueden ser deshidratadas hasta un contenido en humedad usualmente menor del 10% sin consecuencias perjudiciales. En estas condiciones las semillas pueden soportar frecuentemente la inmersión directa en nitrógeno líquido sin necesidad de pretratamiento alguno (González-Benito, 1998; Maroder *et al.*, 2000; Suszka *et al.*, 2005). En estos casos las semillas se introducen en los crioviales (Fotografía 5) que, a su vez, serán sumergidos directamente en nitrógeno líquido. Esta técnica se ha ensayado, por ejemplo, en especies ibéricas de las familias Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Cistaceae y Scrophulariaceae (González-Benito, 1998; Pérez-García & González-Benito, 2008).



Fotografía 5: Viales de polipropileno para crioconservación. Se puede apreciar el material vegetal (en este caso yemas vegetativas) embebido en una solución crioprotectora antes de su inmersión en nitrógeno líquido (Bacchetta *et al.*, 2008).

Las semillas recalcitrantes se caracterizan por poseer un elevado porcentaje de humedad en sus tejidos, por su sensibilidad a la deshidratación (pierden su viabilidad si la humedad desciende por debajo de ciertos niveles), así como por su sensibilidad a las bajas temperaturas. La crioconservación ha afrontado recientemente el grave problema de conservar semillas recalcitrantes, poniendo a punto algunas posibilidades para superar estas limitaciones. En estos casos, la estrategia que ha conseguido resultados más prometedores consiste en trabajar con embriones o ejes embrionarios aislados. La razón de esto es, que si la semilla se sumerge directamente en nitrógeno líquido, su supervivencia tras la congelación es prácticamente nula (Marzalina & Krishnapillay, 1999). Los embriones son estructuras más pequeñas, más resistentes a la desecación que la semilla entera y relativamente uniformes en dimensiones y contenido de humedad (Fu *et al.*, 1993); por lo tanto, pueden someterse a una deshidratación controlada (realizada, por ejemplo en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar) antes de ser introducidos en nitrógeno líquido, directamente o después de un enfriamiento progresivo. Se han realizado experimentos con resultados positivos con varias especies de *Quercus*, género que incluye especies con semillas recalcitrantes y de gran importancia en los ecosistemas templados y mediterráneos (González-Benito, 1998), y con especies de los géneros *Arthocarpus*, *Calamus*, *Elaeis*, *Hevea*, *Nephelium* y *Shorea* (Marzalina & Krishnapillay, 1999).

La implementación de las técnicas de criopreservación ha tenido un papel fundamental en el progreso de la conservación del germoplasma de plantas raras o

amenazadas. Encontramos un ejemplo de ello en algunas orquídeas en riesgo de extinción como *Bletilla striata* Rchbf. (Hirano *et al.*, 2005).

3- MATERIAL Y MÉTODOS



3.1. Material vegetal.

El material vegetal recolectado para el presente trabajo es la especie halófito *Limonium insigne*, cuyos nombres vernáculos son “siempreviva de saladar” y “siempreviva rosa” (Salazar & Lendínez, 2009).



Fotografía 6: *Limonium insigne* (Ivorra, 2010).

Se trata de una planta perenne, pluricaule y glabra perteneciente a la familia *Plumbaginaceae* cuya altura media se encuentra alrededor de los 90 cm (Salazar & Lendínez, 2009).

Sus tallos son ramificados y áfilos, y sus hojas están dispuestas en roseta basal (30-90 x 10-22 mm), peciolados, con limbo de espatulado a cuneiforme y ápice de redondo a romo.



Fotografía 7: Detalle de los tallos y ramas de *Limonium insigne* (Ivorra, 2010).



Fotografía 8: Hojas de *Limonium insigne* (Ivorra, 2010).

Sus inflorescencias son en panícula, con muchas de las ramas estériles. Las espigas tienen entre 10 y 35 mm, y se encuentran en el tercio superior de la inflorescencia. Sus espiguillas (8-10 mm) están rodeadas de tres brácteas, con 2-3 flores.



Fotografía 9: Inflorescencia de *Limonium insigne* (Ivorra, 2010).



Fotografía 10: Detalle de espigas de *Limonium insigne* (Ivorra, 2010).

Sus flores son hermafroditas, actinomorfas, pentámeras y con un diámetro que oscila entre los 7 y los 9 mm.



Fotografía 11: Flores de *Limonium insigne* (Ivorra, 2010).

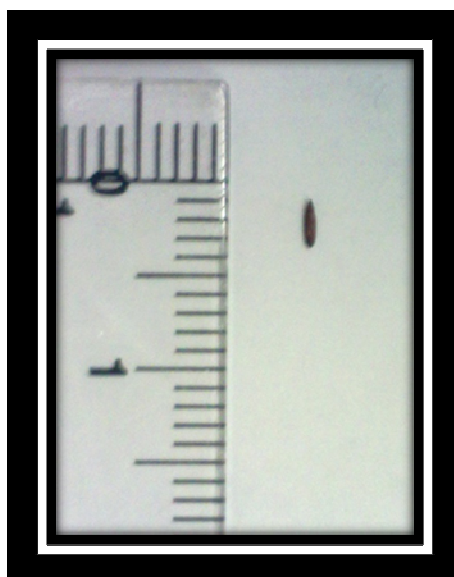
El cáliz es gamosépalo, tubular, con cinco costillas y limbo membranáceo. La corola tiene cinco pétalos de color púrpuro o rosa. El androceo está formado por cinco estambres insertos en la base de los pétalos, mientras que el gineceo posee cinco carpelos unidos sólo por los bordes y tiene un ovario unilocular.



Fotografía 12: Detalle de la flor de *Limonium insigne* (Ivorra, 2010).

El fruto es capsular y monospermo.

Las semillas son alargadas, de color entre marrón y rojizo y con unas dimensiones que aproximadas de 0,25-0,30 cm de largo por 0,005 cm de ancho.



Fotografía 13: Detalle de la semilla de *Limonium insigne* extraída en laboratorio.

La floración de *Limonium insigne* tiene lugar entre los meses de marzo y junio.

Esta planta se encuentra en acantilados costeros, estepas litorales y lugares secos de interior (0-400 m). Se distribuye por la mitad sur de la provincia de Almería y en las de Granada, Murcia y Alicante, coincidiendo con zonas salinas presentes en el sureste español.

En Almería se ha visto con frecuencia en las bases de Sierra Alhamilla, Sierra de Gádor y también en zonas de Cabo de Gata.



Fotografía 14: Distribución geográfica de *Limonium insigne* en España (Anthos, 2010).

3.2. Lugar de recogida del material vegetal.

La recogida del material vegetal tuvo lugar durante los meses de julio y agosto en El Cerro de los Lobos (base de la Sierra de Gádor), enclave localizado en el término municipal de Vícar, el cual, se encuentra al suroeste de la provincia de Almería.



Figura 2: Localización del Término Municipal de Vúcar en la provincia de Almería.

Almería se sitúa al sureste de la Península Ibérica, en la región Mediterránea Occidental, en un territorio en el que se destaca su marcada aridez.

Como se puede observar en la tabla que a continuación se muestra (Tabla 2), junto con su correspondiente diagrama termopluviométrico (Figura 3), Almería es un municipio que se caracteriza por temperaturas suaves a lo largo de todo el año, con una media que ronda los 18 °C, siendo los meses más calurosos los correspondientes a julio y agosto. El mes en el que las precipitaciones son, con diferencia, más voluminosas es diciembre, seguido por el mes de enero, de modo que la mayor cantidad de agua con la que cuenta Almería se centra entre finales de otoño y principios de invierno. La precipitación media anual es de aproximadamente 231 mm.

ESP ALMERIA (ALMERIA)		Altitude: 18 m.					
Latitude: 36°50'N		Longitude: 002°27'W					
Temperature observation period.: 1934-1970(37)		Rainfall observation period....: 1934-1970(37)					
(C°/mm)	Ti	Mi	mi	M'i	m'i	Pi	PEi
Jan	11.7	15.4	7.9	19.2	4.0	31.0	24.8
Feb	12.2	16.0	8.4	20.1	4.5	21.0	26.6
Mar	14.1	17.7	10.4	22.7	6.5	20.0	42.3
Apr	16.1	19.6	12.7	25.2	8.8	28.0	58.0
May	18.4	22.0	14.8	29.5	10.9	17.0	82.7
Jun	22.0	25.7	18.3	32.6	14.9	4.0	116.7
Jul	24.7	28.5	20.9	34.7	17.3	0.0	147.4
Aug	25.3	29.0	21.6	34.4	18.1	5.0	144.4
Sep	23.4	27.0	19.8	32.7	16.0	16.0	109.7
Oct	19.3	22.9	15.7	27.7	11.4	26.0	71.9
Nov	15.6	19.1	12.0	23.3	8.2	27.0	42.2
Dec	12.8	16.5	9.0	20.0	5.2	36.0	28.4
Year	18.0	21.6	14.3	26.8	10.5	231.0	895.0

Tabla 2: Datos de temperatura y precipitación correspondientes a la estación meteorológica del aeropuerto de Almería (Rivas-Martínez & Rivas Sáenz, 1996-2009).

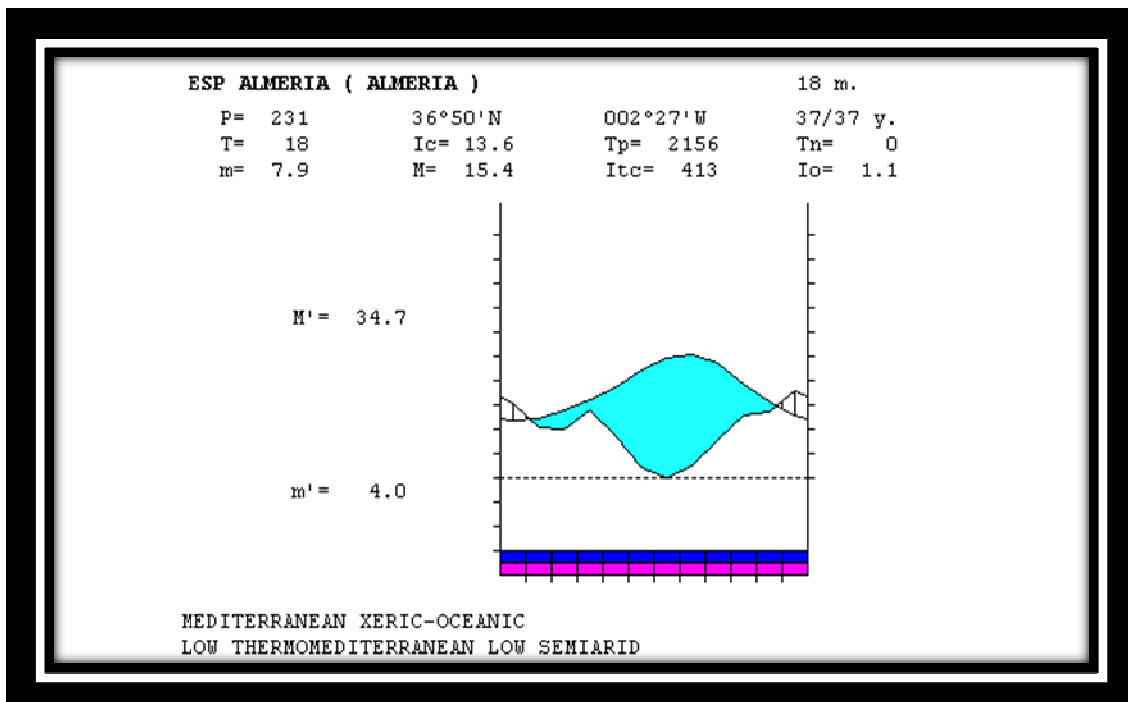


Figura 3: Diagrama termoplubiométrico correspondiente a la estación meteorológica del aeropuerto de Almería (Rivas-Martínez & Rivas Sáenz, 1996-2009).

Como ya fue citado anteriormente, la recogida de plantas de *Limonium insigne* tuvo lugar en el Cerro de los Lobos, cuyo punto más elevado se encuentra a 420 metros sobre el nivel del mar y se caracteriza por limitar al este con la rambla de las Hortichuelas. Dicho enclave consiste en una formación geológica constituida por

litosoles mayoritariamente, aunque posee zonas formadas también tanto por litosoles como por regosoles calcáricos. (Baena & Ewert, 1983).

Las características principales de los litosoles correspondientes a esta zona son que las rocas originales corresponden a la serie calizo-dolomítico. Se trata de bancos de caliza y dolomías bastante recristalizadas y, en su mayor parte, profundamente trituradas.

Las pendientes, entre escarpado (22-25%) a muy escarpado (más del 55%), indica el grado de erosión a que están sometidos los escasos suelos que se encuentran en la zona, no presentándose nada más que en ocasiones una ligera película de menos de 10 cm altamente pedregosa y con predominio de texturas arenosas.

La capacidad de retención de agua útil para las plantas es escasa debido a su espesor, lo que unido a que están excesivamente drenados, hace que estos suelos permanezcan secos gran parte del año.

En lo referente a las zonas constituidas tanto por litosoles como por regosoles calcáricos, mencionar que se trata de suelos con una profundidad media de 10 a 15 cm, que no presentan nada más que un horizonte ócrico, muy pedregoso, con buen drenaje y con poca capacidad de retención de agua, lo que los hace bastante secos.



Fotografía 15: Vista del Cerro de Los Lobos donde fueron recolectadas las plantas de *Limonium insigne*.



Fotografía 16: Ladera del Cerro de Los Lobos donde se pueden apreciar plantas de *Limonium insigne* en flor.

Las coordenadas aproximadas de la zona de recolección de las plantas en el Cerro de los Lobos fueron $36^{\circ} 49' 24,39''$ norte $2^{\circ} 36' 16,77''$.

El método para la recolección del material vegetal consistió en acceder al Cerro de los Lobos por la carretera A-391 e ir recorriendo a pie dicho cerro localizando enclaves donde se encontrase presente *Limonium insigne*.

Una vez localizada la planta, se procedió a recoger sus flores de forma manual deslizando las manos cerradas en torno a ésta desde la base de las ramas hasta el extremo de las mismas, tras lo cual se introducía el material obtenido en bolsas de plástico de color negro.

Después de tres desplazamientos al Cerro de los Lobos, se consideró que la cantidad de material obtenido era suficiente. Tras esto, las flores recogidas fueron llevadas al laboratorio, donde se dejaron secar durante los meses de agosto y septiembre.



Fotografía 17: Flores de *Limonium insigne* secándose en laboratorio tras su recolección en campo.

3. 3. Extracción de semillas.

3. 3. 1. Material utilizado para la extracción de semillas.

- Material vegetal seco.
- Lupa.
- Pinzas.
- Lanceta.
- Placas Petri.
- Cámara de conservación de semillas.

3. 3. 2. Método de extracción.

La obtención de las semillas que se encontraban en el interior de las flores se realizó de forma manual y de una en una con la ayuda de una lanceta y unas pinzas, siempre a través de la lupa debido a su reducido tamaño.

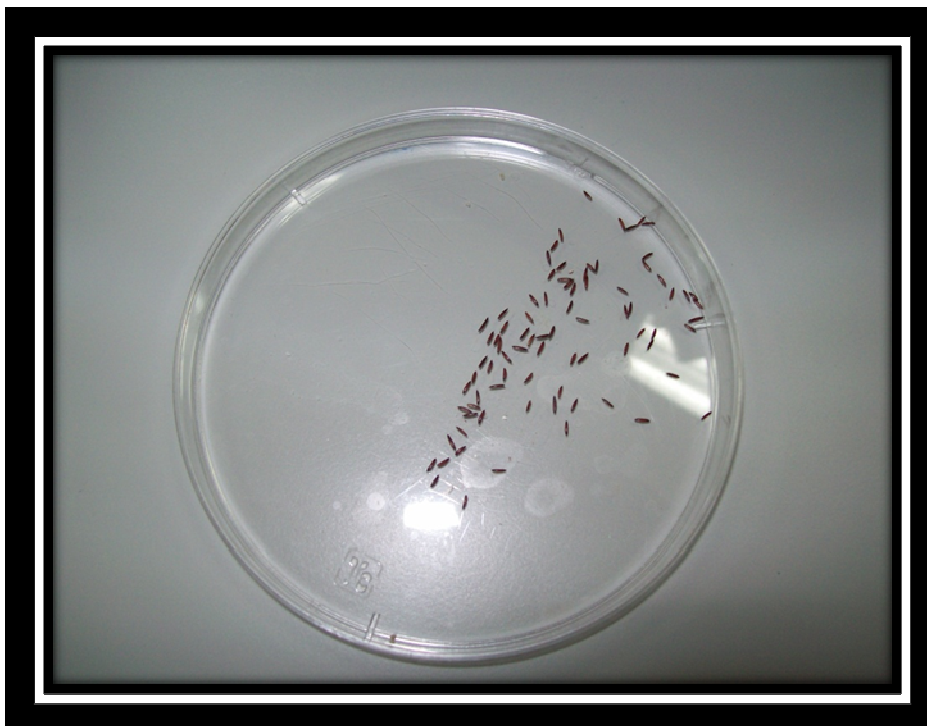
El procedimiento consistió en sujetar cada flor con las pinzas mientras que, con la lanceta, se procedía a ir eliminando las diferentes partes florales que cubrían la semilla (pétalos, estambres, pedúnculo, estigma y estilo) hasta llegar finalmente al fruto.

Una vez obtenido el fruto, se hacía una incisión sobre él con el fin de obtener de su interior la semilla, la cual, aparecía rodeada de una membrana protectora que también era retirada con ayuda de las pinzas.

La proporción de flores con frutos maduros en su interior era bastante inferior con respecto al número de flores que carecían de éstos, lo cual supuso una dedicación considerable en lo que respecta a tiempo y esfuerzo para obtener la adecuada cantidad de semillas para realizar nuestro estudio.

Las semillas extraídas se colocaban en una placa Petri, que más tarde sería introducida en una cámara frigorífica a 8 °C para conservarlas e impedir la proliferación tanto de hongos como de cualquier otro tipo de microorganismos que las volviera inviables.

Este procedimiento continuó hasta conseguir un total de dos mil quinientas semillas para, de este modo, tener material más que suficiente para la realización tanto de los ensayos de germinación en placas Petri como en el ensayo de germinación en macetas.



Fotografía 18: Detalle de placa Petri con semillas de *Limonium insigne* extraídas de sus flores.

3.4. Preparación del ensayo.

3. 4. 1. Material para la germinación.

- Placas Petri de 90 mm de diámetro.
- Discos de papel de filtro del mismo diámetro que las placas Petri.
- Pipetas.
- Agua destilada.
- Hipoclorito sódico.
- 25 semillas de *Limonium insigne* por placa Petri.
- 5 ml de solución a las distintas concentraciones salinas que se aplican.
- Soluciones salinas a concentraciones de 0, 100, 200 y 400 mM de NaCl.
- Cámara de germinación con fotoperiodo de 14/10 h (luz/oscuridad), iluminada en su interior mediante una lámpara fluorescente ($25\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^1$, 400-700 nm).
- 16 macetas troncocónicas.
- Arena de cuarzo de 1 y 2 mm.
- Balanza de precisión.
- Tamiz.
- Bisturí.

3. 4. 2. Soluciones.

Como fuente de salinidad utilizamos NaCl por ser Cl^- y Na^+ los iones más comunes y abundantes en los suelos salinos y, además, probablemente se trata de los más nocivos para la germinación y crecimiento de las plantas. Se planteó un ensayo con cuatro concentraciones salinas, 0, 100, 200 y 400 mM, que son las concentraciones más habitualmente empleadas en experiencias similares previas realizadas por diversos autores (Gulzar *et al.*, 2001; Zia & Khan, 2004; Ahmed & Khan, 2010).

El procedimiento para la preparación de las soluciones es el siguiente:

- a) Para la solución de salinidad 0 mM se utilizó tan sólo agua destilada, considerándose pues la muestra testigo en el estudio de germinación.
- b) Para el resto de las soluciones se emplearon matraces de 250 ml, en cada uno de los cuales se procedió de la siguiente forma para cada solución salina:
 - a. 100 mM: Pesamos 1,461 g de sal (NaCl) y enrasamos a 250 ml con agua destilada.
 - b. 200mM: Pesamos 2,922 g de sal (NaCl) y enrasamos a 250 ml con agua destilada.
 - c. 400 mM: Pesamos 5,844 g de sal (NaCl) y enrasamos a 250 ml con agua destilada.

Tras esto, se utilizaron 5 ml de cada una de las soluciones como medio de cultivo de las semillas.

3. 4. 3. Montaje del ensayo en placas Petri.

En primer lugar se procedió a la desinfección de las semillas de *Limonium insigne* con una solución de hipoclorito sódico, manteniéndolas en este medio durante 5 minutos y lavadas posteriormente con abundante agua destilada.

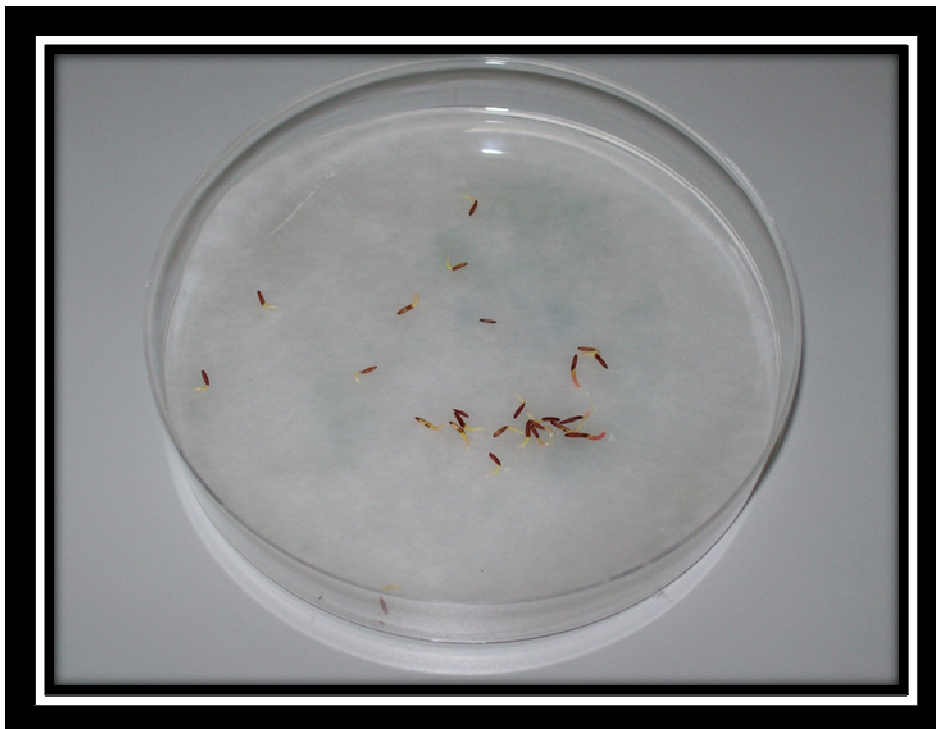
Para la germinación en placas Petri se llevaron a cabo cuatro ensayos, en cada uno de los cuales se realizaron los siguientes procedimientos: se dispusieron 25 semillas en cada placa Petri con papel de filtro, hasta completar un total de 16 placas. Tras esto se realizaron cuatro grupos de cuatro placas Petri cada uno, de tal manera que a cada grupo se le introdujeron 5 ml de solución de NaCl a distinta concentración; a saber: 0 mM, 100mM, 200 mM y 400 mM, cuya finalidad es la réplica en laboratorio de las diferentes condiciones de conductividad eléctrica a las que se pueden ver sometidas este tipo de plantas en su hábitat natural y, por tanto, el conocimiento del rango de tolerancia. Finalmente, todas las placas fueron colocadas en el interior de una cámara de cultivo que mantuvo controlado el fotoperiodo a 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad (25 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{S}^{-1}$, 400-700 nm con lámparas fluorescentes) y sin humedad ambiental.

Cada ensayo tuvo una duración de 25 días, siendo la diferencia entre los ensayos los distintos intervalos de temperatura en horas de luz y de oscuridad, lo cuales, fueron los siguientes:

- Primer ensayo: 20/10 °C.

- Segundo ensayo: 25/15 °C.
- Tercer ensayo: 30/20 °C.
- Cuarto ensayo: 35/25 °C.

Cada 2 días y a lo largo de los 25 días de duración de cada ensayo, se fue tomando nota de las semillas que germinaban (cuando emerge la radícula).



Fotografía 19: Detalle de semillas de *Limonium insigne* germinadas.

Además, como consecuencia de la evaporación existente (sobre todo a determinadas temperaturas), se les repuso cada vez que era necesario a cada placa Petri otros 5 ml de la solución salina a la que desde un principio fue sometida.

3. 4. 4. Montaje del ensayo en macetas troncocónicas.

Una vez conocida la temperatura más favorable para la germinación, se planteó un ensayo según un diseño de bloques al azar en macetas, con los cuatro tratamientos salinos y cuatro repeticiones; es decir, preparamos 16 macetas troncocónicas de una capacidad de 500 ml con arena de cuarzo en su interior y colocando 25 semillas en cada una de ellas.

Se utiliza para esta parte del proyecto arena de cuarzo ya que, como nuestra intención era recuperar las raíces de las semillas germinadas, este material nos dio la máxima facilidad para ello, al no ser difícil de eliminar con un simple lavado.

De esta forma tendríamos cuatro macetas con 25 semillas cada una para cada una de las soluciones, es decir, de 0, 100, 200 y 400 mM.

El procedimiento comenzó desinfectando cada una de las macetas que se iban a utilizar sumergiéndolas en una solución de hipoclorito sódico y agua durante 24 horas.

Tras esto, se procedió al secado de las macetas e introducción en su fondo de una malla de aluminio con el fin de que la arena de cuarzo, que posteriormente agregaríamos, no se perdiese por los orificios de desagüe presentes en la parte inferior de las macetas.

Fueron introducidas en cada una de las macetas dos tipos de arena de cuarzo, una más gruesa de 2 mm en la parte inferior que favoreciese la evacuación del agua sobrante de riego, y otra más fina de 1 mm en la parte superior, con el fin de evitar la percolación de las semillas por entre los poros de dicha arena debido a su pequeño tamaño.

La cantidad de arena de cuarzo más gruesa de 2 mm introducida por maceta fue de 300 g, mientras que la cantidad de arena de cuarzo más fina de 1 mm fue de 600 g por maceta, con el fin de obtener una relación 3:1 y un peso final por maceta de 900 g.

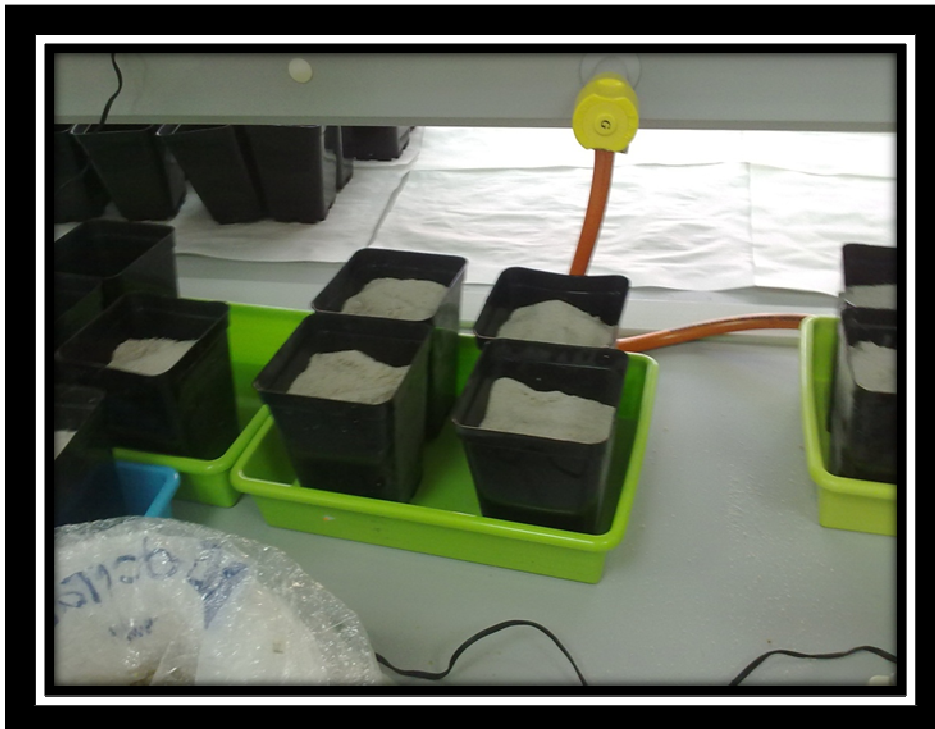


Fotografía 20: Maceta troncocónica con arena de cuarzo pesada en balanza de precisión.

Tras finalizar el proceso de llenado de todas las macetas con arena de cuarzo, el ensayo continuó con la introducción de 25 semillas desinfectadas en hipoclorito sódico de *Limonium insigne* en cada una de ellas con ayuda de unas pinzas y procurando que éstas estuviesen enterradas a una profundidad aproximada entre 0,25 y 0,30 cm.

Una vez introducidas las semillas se realizó un primer riego de 100 ml por maceta con la solución correspondiente.

Cada grupo de cuatro macetas (correspondiente a la solución con la que era tratada) fue colocada sobre unas bandejas y éstas, a su vez, fueron introducidas en la cámara de cultivo a un rango de temperatura de 20/10° C (correspondiente al primer ensayo de germinación en placas Petri) ya que fue el rango de temperatura al cual germinaron en mayor cantidad las semillas de *Limonium insigne*, según los resultados obtenidos en la primera parte del proyecto.



Fotografía 21: Macetas troncocónicas regadas con la misma solución dispuestas en bandejas.

Los posteriores riegos de las macetas se repitieron cada vez que se consideró necesario, es decir, cuando la humedad presente en la arena de cuarzo era baja (con 25 ml de la solución correspondiente), hasta que consideramos que las plantas tenían un tamaño adecuado para realizar los posteriores estudios de parámetros fisiológicos. Se supone que, al desarrollarse en un medio inerte como es la arena de cuarzo, las plantas sólo crecen con las reservas de sus cotiledones, por lo tanto, 50 días son más que suficientes para que alcancen su desarrollo.



Fotografía 22: Plantas de *Limonium insigne* germinadas en arena de cuarzo.



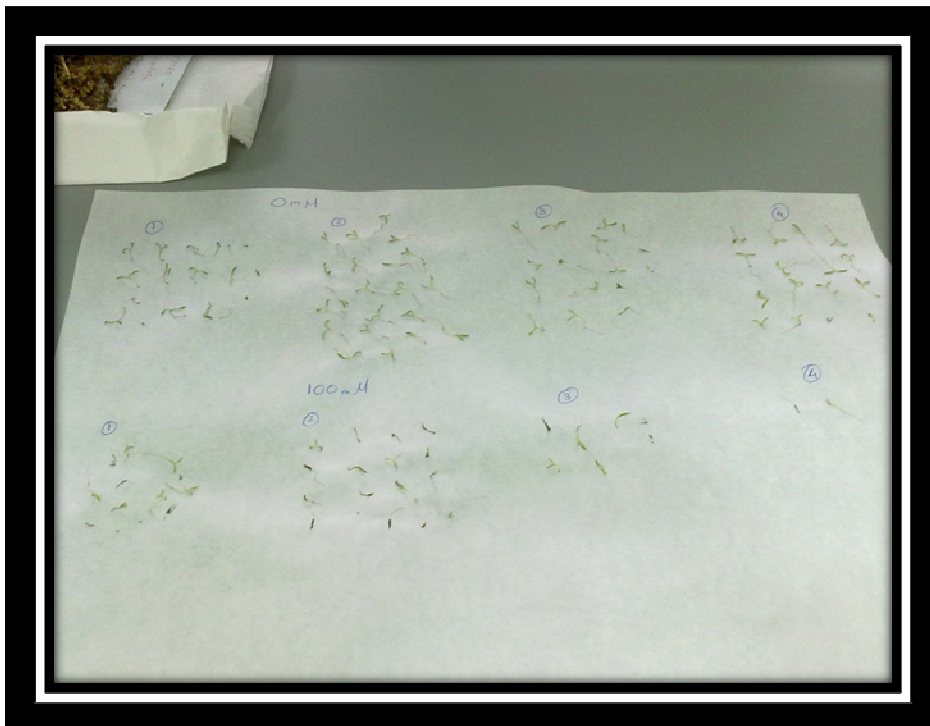
Fotografía 23: Detalle de plantas de *Limonium insigne* germinadas en arena de cuarzo.

Para la extracción de las plantas de las macetas se vertió sobre cada una de ellas agua en su parte superior, con la finalidad de disminuir el apelmazamiento de la arena

de cuarzo para no dañar las plantas a lo largo de este proceso. Las plantas que se extrajeron más fácilmente fueron aquellas que aparecieron flotando en la superficie del agua una vez aplicada ésta en cada maceta, y fueron retiradas una a una con ayuda de unas pinzas.

En cuanto a la obtención de aquellas plantas que no pudieron extraerse por este procedimiento, se procedió a ir vertiendo con cuidado la arena de cuarzo mezclada con agua sobre un tamiz, de manera que, al ir removiendo la arena con cuidado y filtrándose tanto ésta como el agua, iban apareciendo las plantas, que eran nuevamente recogidas con ayuda de las pinzas.

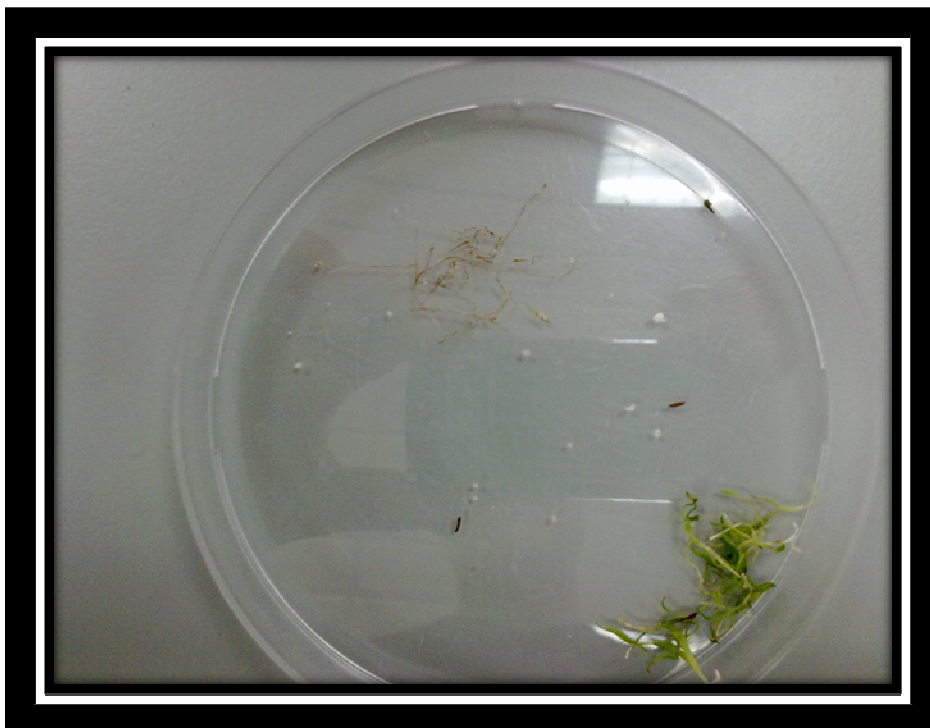
Todas las plantas obtenidas se fueron colocando sobre un papel de filtro para facilitar el secado de éstas previo a su posterior pesada en balanza de precisión. La colocación de las plantas de *Limonium insigne* sobre el papel de filtro se hizo por grupos, de manera que permaneciesen juntas todas aquellas procedentes de la misma maceta, tal y como se puede observar en la fotografía adjunta a continuación.



Fotografía 24: Colocación según solución de riego y maceta de plantas de *Limonium insigne* sobre papel de filtro.

Una vez secadas las plantas de *Limonium insigne* sobre el papel de filtro, se fueron colocando sobre placas Petri, de tal manera que en cada placa estuviesen las plantas procedentes de la misma maceta y que habían sido sometidas al riego con la misma solución salina.

Tras esto, se procedió a la separación de la parte aérea y de la parte radical de cada una de las plantas con ayuda de un bisturí y de unas pinzas. Una vez obtenidas cada una de las partes y amontonadas por separado en cada placa Petri se podría proceder a su pesada por medio de la balanza de precisión, anotando en cada caso (para cada maceta) el peso del conjunto de las partes aéreas por un lado y, por otro, el peso del conjunto de las partes radicales.



Fotografía 25: Separación de partes aéreas y partes radicales de plantas de *Limonium insigne*.

Tras la obtención de estos datos (peso fresco), se dispusieron las placas Petri con las partes aéreas y partes radicales en una estufa durante 24 horas a 60 °C, con la finalidad de, trascurrido este tiempo, repetir las mediciones anteriores, consiguiendo de esta forma el peso seco de las muestras.

3. 5. Parámetros medidos.

El porcentaje de germinación se calcula para cada réplica, y viene dado por la relación entre el número de semillas germinadas y el número total de semillas menos las semillas vacías, multiplicado por 100 (Bacchetta *et al.*, 2008), es decir:

$$\frac{\text{Número de semillas germinadas}}{(\text{Número total de semillas} - \text{Semillas vacías})} \times 100$$

El porcentaje final del ensayo será calculado haciendo la media entre todas las réplicas sometidas a las mismas condiciones de germinación.

Por otro lado se calculará el tiempo medio de germinación, que se trata de la relación entre el número de semillas germinadas cada día y el total de semillas germinadas al final del ensayo (Bacchetta *et al.*, 2008):

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

Donde:

MGT: es el tiempo medio de germinación en días.

n_i : número de semillas germinadas en el día d_i .

d_i : número de días desde el inicio del test de germinación.

N: número total de semillas germinadas al final del ensayo.

Finalmente, los parámetros fisiológicos medidos tras el ensayo de germinación en macetas de *Limonium insigne* fueron tanto el peso fresco como el peso seco de la parte aérea, de la parte radical y el total del material vegetal presente en cada una de las macetas.

3. 6. Análisis estadístico de los datos.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante la técnica del Análisis de la Varianza (ANOVA o AVAR), que se trata de una de las técnicas más utilizadas en los análisis de los datos de los diseños experimentales. Se utiliza cuando queremos contrastar más de dos medias.

El ANOVA es un método muy flexible que permite construir modelos estadísticos para el análisis de los datos experimentales cuyo valor ha sido constatado en muy diversas circunstancias. Básicamente es un procedimiento que permite dividir la varianza de la variable dependiente en dos o más componentes, cada uno de los cuales puede ser atribuido a una fuente (variable o factor) identificable (Sokal & Rohlf, 1986)

Los modelos que permiten construir el ANOVA pueden ser reducidos a la siguiente forma:

$$(\text{Valor observado}) = \Sigma (\text{efectos atribuibles}) + \Sigma (\text{efectos no atribuibles o residuales})$$

El valor observado se refiere al que se obtiene en la variable cuantitativa dependiente. Los efectos atribuibles son parámetros o variables aleatorias que son el resultado de cambios en los factores o variables independientes y, por tanto, atribuibles a ellos. Aquellos efectos no atribuibles a ningún factor controlado se denominan efectos residuales o variables aleatorias residuales.

Los modelos de ANOVA son muchos. Los modelos más representativos se clasifican bajo tres criterios: número de factores, muestreo de niveles y tipo de aleatorización:

- 1- Número de factores:** Aquellos experimentos que utilizan una sola variable independiente o factor y una variable dependiente se analizan mediante varianza llamado de un factor, de clasificación simple, unidireccional o de una vía (one way). Se trata de comparar grupos o muestras que difieren sistemáticamente en un solo factor.

Si varios grupos o muestras se asignan a diferentes combinaciones de dos factores, el ANOVA correspondiente es llamado de dos factores, de clasificación doble, bidireccional o de dos vías (two way). Se trata de comparar grupos o muestras que difieren sistemáticamente en dos factores. Y así sucesivamente.

- 2- Muestreo de niveles:** Como sabemos, el factor es la variable independiente o experimental controlada por el investigador. Puede tomar pocos o muchos valores o niveles, a cada uno de los cuales se asignan los grupos o muestras. Si se toman K niveles del factor, a cada uno se asignan las muestras y las inferencias se refieren exclusivamente a los K niveles y no a otros que podrían haber sido incluidos, el ANOVA se llama de **efectos fijos**, sistemático o paramétrico. El interés del diseño se centra en saber si esos niveles concretos difieren entre sí.

Cuando los niveles son muchos y se seleccionan al azar K niveles, pero las inferencias se desean hacer respecto al total de niveles, el análisis de varianza se denomina de **efectos aleatorios**. La idea básica es que el investigador no tiene interés en niveles particulares del factor.

Cuando se utilizan dos factores, cada uno con varios niveles, uno de efectos fijos y otro de efectos aleatorios, el análisis de varianza es **mixto**.

- 3- Tipo de aleatorización:** Sabemos que la aleatorización es el procedimiento por el cual las unidades experimentales (en general, los sujetos) se asignan al azar a los niveles del factor o tratamientos, de modo que todas ellas tengan la misma probabilidad de recibir un tratamiento o nivel determinado. Esta aleatorización se puede llevar a cabo en el total de las observaciones o por bloques. Ello dará

origen a dos tipos distintos de diseño experimental: completamente aleatorizado (CA) o aleatorizado en bloques (BA).

Cuando una variable extraña se utiliza para dividir a los sujetos en subgrupos o bloques se denomina variable de bloqueo. El objetivo es eliminar su efecto. Diseños más complejos pueden utilizar más de una variable de bloqueo. El bloqueo llevado a sus extremos puede ser aquel en el que un bloque son medidas de un único sujeto. Es decir, sólo un sujeto recibe todos los tratamientos, de modo que se eliminará mayor número de variables exógenas o extrañas. Este tipo de diseño se suele llamar de medidas repetidas o intrasujetos.

En nuestro caso utilizaremos el programa informático PASW Statistics (2009) 18 ver. 18.0.0 para llevar a cabo el análisis estadístico ANOVA, siendo el modelo utilizado aquel que tiene como criterio el número de factores; de tal manera que el análisis realizado será el conocido como ANOVA a dos vías puesto que, nuestras variables independientes serán la temperatura y la salinidad del medio de cultivo.

Esto fue así en el caso del estudio del porcentaje final de germinación y para el tiempo medio de germinación (MGT), los cuales, además, fueron consideradas como variables dependientes.

Por otro lado, para el caso del estudio de los pesos tanto en fresco como en seco de las plantas de *Limonium insigne*, se aplicó un análisis ANOVA a una vía, puesto que, en este caso, tan sólo se estableció una variable independiente, a saber, la salinidad, siendo en este caso la variable dependiente aquella relativa tanto a los pesos frescos como a los pesos secos de las plantas en su totalidad, así como de los pesos de la parte aérea como radical de éstas.

Finalmente, la prueba de Tukey (Tukey, 1949) fue usada para detectar diferencias significativas ($< 0,05$) en las comparaciones entre pares de ensayos.

Previamente, la hipótesis de normalidad fue comprobada por la prueba de David (David *et al.*, 1954) y la homogeneidad de las varianzas por la prueba de Cochran (Cochran, 1941).

En los casos del porcentaje de germinación y del tiempo medio de germinación, los datos precisaron una transformación mediante el cálculo del arcoseno puesto que no cumplían una distribución normal.

4- RESULTADOS



4.1. Efectos de la salinidad y la temperatura sobre los parámetros fisiológicos.

La germinación y crecimiento de las plántulas resultan afectados sistemáticamente por la presencia en el medio de cultivo de una concentración salina superior a la normal, y las consecuencias inmediatas suelen ser un deterioro más o menos acusado de tales procesos.

El efecto de la temperatura puede ser similar, ya que el aumento de este parámetro hace disminuir los procesos germinativos de *Limonium insigne*.

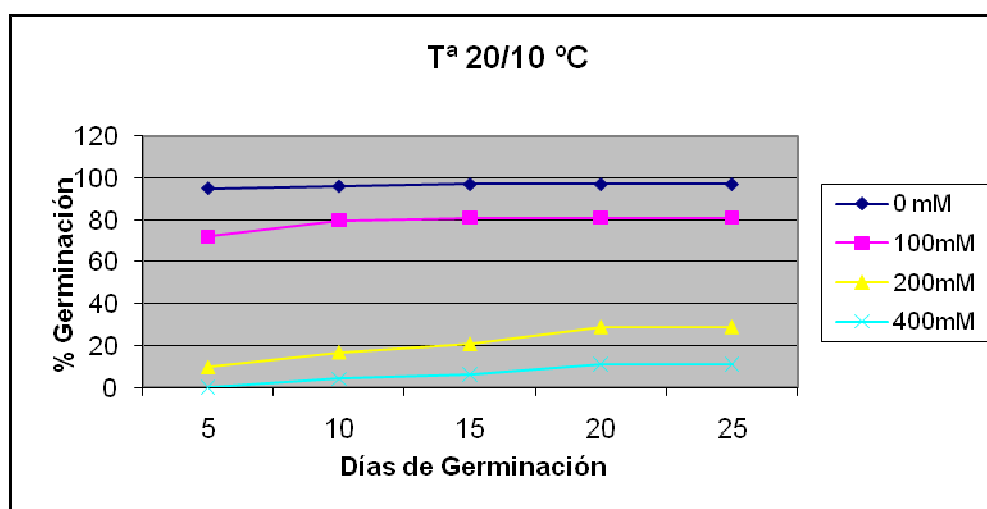
4.2. Efectos de la salinidad y distintos regímenes de temperatura sobre la evolución de la germinación.

Todos los datos que fueron recopilados a lo largo del estudio llevado a cabo en laboratorio fueron tratados en tablas Excel, con el fin de crear las tablas que a continuación se mostrarán junto con sus correspondientes gráficas, las cuales, nos facilitarán la interpretación de los resultados obtenidos.

Las tablas muestran el porcentaje de germinación alcanzado cada cinco días para cada uno de los ensayos realizados y para cada concentración salina a la que eran inmersas las semillas de *Limonium insigne*.

Tª 20/10	Día 5º	Día 10º	Día 15º	Día 20º	Día 25º
0 mM	95	96	97	97	97
100 mM	72	80	81	81	81
200 mM	10	17	21	29	29
400 mM	0	4	6	11	11

Tabla 3: Porcentaje de germinación de *Limonium insigne* cada 5 días durante el primer ensayo a las diferentes concentraciones salinas.



Gráfica 1: Evolución del porcentaje de germinación de *Limonium insigne* a temperaturas 20/10 °C y a distintas concentraciones salinas.

En la Tabla 3 podemos observar que aquellas semillas tratadas a concentración 0 mM poseen un porcentaje de germinación muy elevado tan sólo a los cinco días de comenzar el experimento, siendo el aumento de dicho porcentaje muy pausado a lo largo de los siguientes veinte días, tal y como demuestra la línea de pendiente casi nula que aparece en la Gráfica 1, llegándose al final a un porcentaje de germinación total del 97%,

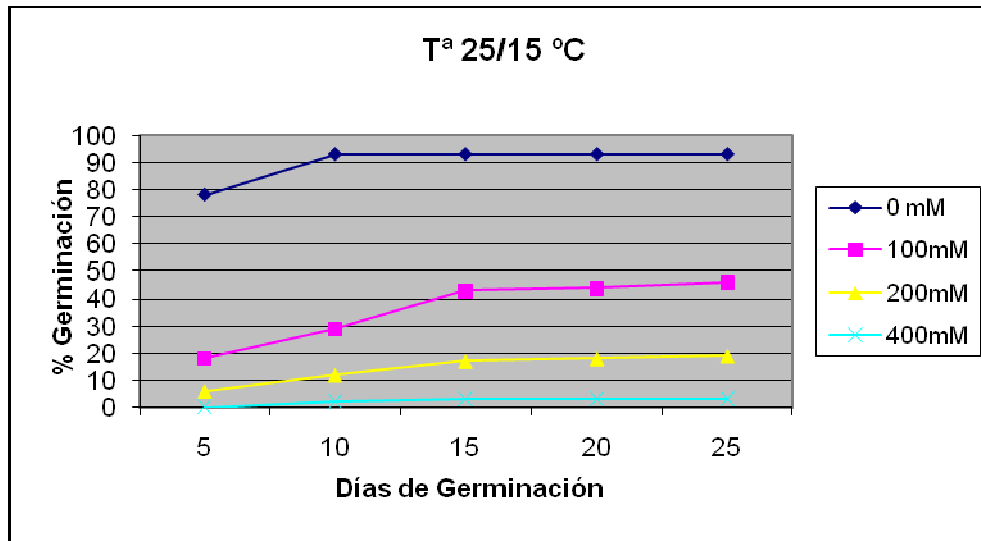
Las semillas de *Limonium insigne* tratadas con la solución 100 mM también muestran un elevado porcentaje de germinación a los cinco días (72%), siendo su evolución en el tiempo muy parecida a la de aquellas tratadas en ausencia de NaCl hasta llegar a un máximo en el porcentaje de germinación del 81%.

Por otro lado, aquellas semillas inmersas a concentración salina 200 mM ofrecen un resultado considerablemente bajo en comparación a los anteriores, alcanzándose tan sólo un 10 % de germinación total en los primeros cinco días. La diferencia con respecto a las semillas tratadas con una salinidad menor radica en que, en este caso, hay un aumento más marcado en el porcentaje de semillas germinadas conforme pasa el tiempo, llegándose a un total del 29%.

En último lugar, a concentraciones de 400 mM no se observan resultados hasta los diez días desde que comienza el experimento, siendo el porcentaje de germinación tan sólo del 4%. En este caso se siguió una tendencia parecida a la de las semillas tratadas a soluciones 200 mM, es decir, hubo un aumento en el porcentaje de germinación mayor que el de aquellas semillas tratadas a soluciones 0 y 100 mM, hasta alcanzar el 11% en el último día.

Tª 25/15	Día 5º	Día 10º	Día 15	Día 20	Día 25
0 mM	78	93	93	93	93
100 mM	18	29	43	44	46
200 mM	6	12	17	18	19
400 mM	0	2	3	3	3

Tabla 4: Porcentaje de germinación de *Limonium insigne* cada 5 días durante el segundo ensayo a las diferentes concentraciones salinas.



Gráfica 2: Evolución del porcentaje de germinación de *Limonium insigne* a temperaturas 25/15 °C y a distintas concentraciones salinas.

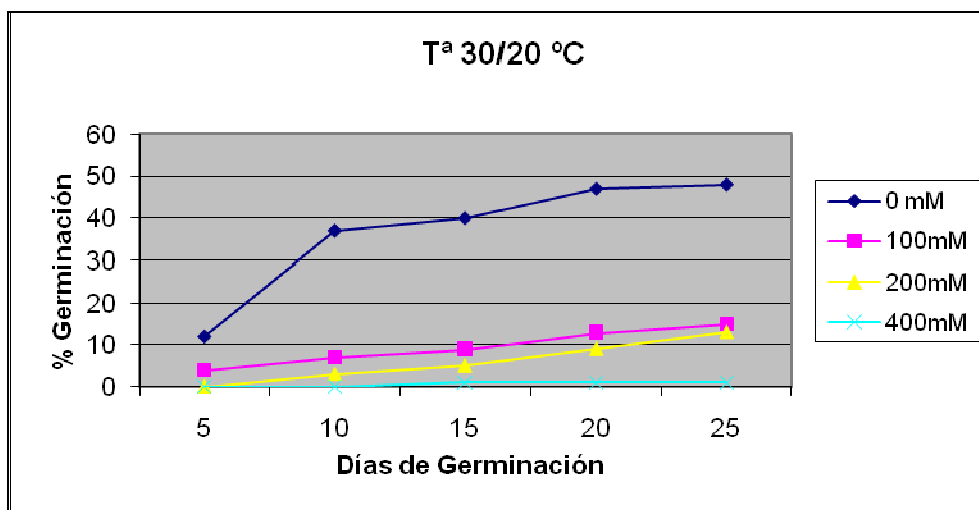
En el segundo ensayo (25/15 °C), Gráfica 2, nos encontramos con una evolución en los porcentajes de germinación muy similares a los expuestos en el caso anterior (Gráfica 1), con la salvedad de que tan sólo la solución 0 mM destaca sobre el resto por su elevado índice de germinación, comenzando con un 78% y finalizando con un 93%; alcanzando este máximo a los 10 días de incubación.

En la solución 100 mM se observa un mayor descenso en cuanto al porcentaje de germinación con respecto al ensayo anterior; comenzando con un 18% el quinto día (compárese con el 72% obtenido el mismo día en el ensayo 1) y finalizando con un 46%.

Las soluciones de 200 y 400 mM en este caso han seguido una evolución similar a la del primer ensayo (20/10 °C), con una ligera disminución en el porcentaje de germinación en todos los casos. Además, en el caso de las semillas sometidas a solución 400 mM, nuevamente no se obtuvieron resultados hasta el décimo día de estudio.

Tª 30/20	Día 5º	Día 10º	Día 15	Día 20	Día 25
0 mM	12	37	40	47	48
100 mM	4	7	9	13	15
200 mM	0	3	5	9	13
400 mM	0	0	1	1	1

Tabla 5: Porcentaje de germinación de *Limonium insigne* cada 5 días durante el tercer ensayo a las diferentes concentraciones salinas.



Gráfica 3: Evolución del porcentaje de germinación de *Limonium insigne* a temperaturas 30/20 °C y a distintas concentraciones salinas.

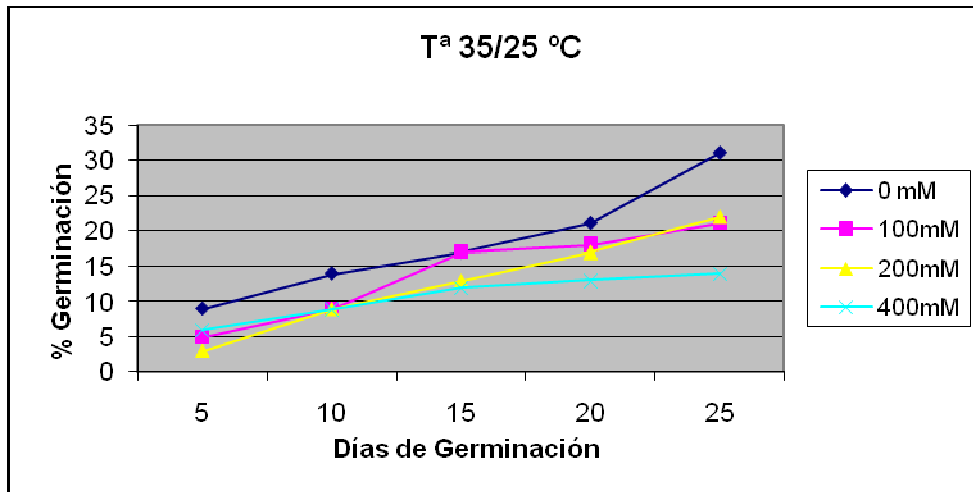
El tercer ensayo, Gráfica 3, se produce un notable descenso en los porcentajes de germinación de las soluciones a concentraciones 0 mM y 100 mM, pero se observa que la tendencia de las soluciones más salinas (200 y 400 mM) no presenta variaciones con respecto a los ensayos anteriores.

Podemos observar que, en la solución carente de NaCl (0 mM), el tiempo transcurrido hasta alcanzar el máximo en el porcentaje de germinación (48%) es mayor, pero lo que hay que destacar de forma importante es la disminución en el porcentaje de germinación con un régimen de temperaturas de 30/20 °C con respecto a temperaturas inferiores de 20/10 °C y 25/15 °C, hecho que se repite para los distintos niveles salinos (100 mM, 200 mM y 400 mM) donde, a lo largo de los 25 días, se alcanzan porcentajes de germinación inferiores.

En este caso no se obtuvieron datos de las semillas tratadas a soluciones de 200 mM hasta el décimo día de estudio, mientras que, para aquellas sometidas a concentraciones 400 mM, se tuvo que esperar hasta el decimoquinto día.

Tª 35/25	Día 5º	Día 10º	Día 15	Día 20	Día 25
0 mM	9	14	17	21	31
100 mM	5	9	17	18	21
200 mM	3	9	13	17	22
400 mM	6	9	12	13	14

Tabla 6: Porcentaje de germinación de *Limonium insigne* cada 5 días durante el cuarto ensayo a las diferentes concentraciones salinas.



Gráfica 4: Evolución del porcentaje de germinación de *Limonium insigne* a temperaturas 35/25 °C y a distintas concentraciones salinas.

En el último ensayo (35/25 °C), Gráfica 4, observamos que la evolución de las cuatro rectas sigue un patrón muy similar, y con unos valores bastante aproximados entre sí. En este caso podemos observar que un aumento en el régimen de temperatura de incubación afecta de forma considerable a las semillas que se cultivan en una solución carente de salinidad (0 mM), donde se alcanza sólo el 31% de semillas germinadas al final de los 25 días, a diferencia de los casos anteriores, donde a los 10 días se alcanzaban máximos superiores; sin embargo, se puede observar que las semillas toleran más la salinidad a estas temperaturas, alcanzando incluso niveles superiores en el porcentaje de germinación de los que habían alcanzado en los ensayos previos antes del final de los 25 días.

4.3. Efectos sobre el porcentaje final de germinación.

En este apartado se ha procedido a introducir tan sólo los porcentajes finales de germinación de *Limonium insigne* para cada concentración salina en cada uno de los ensayos realizados con el fin de obtener, por medio del programa Excel, los siguientes diagramas de barras.

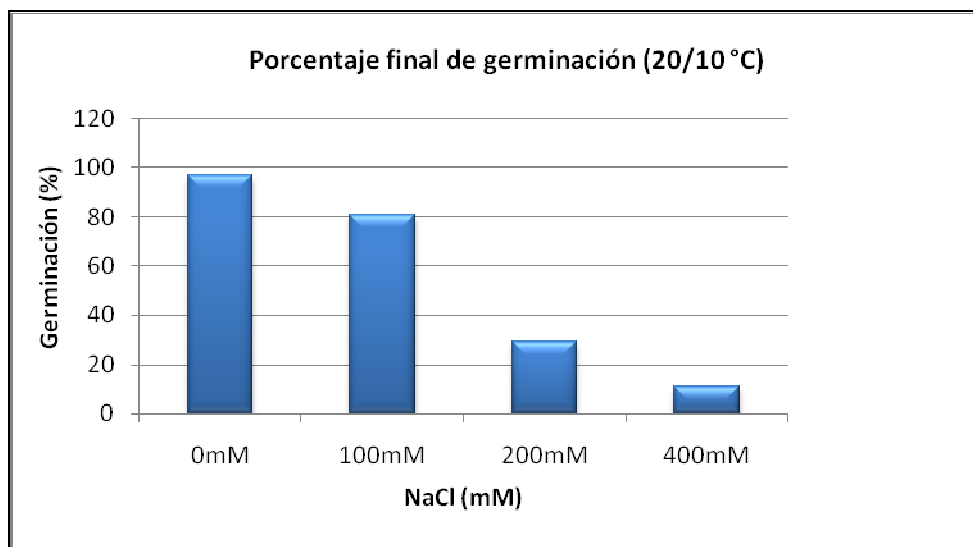
Esta forma de representación de la germinación nos ofrece la posibilidad de estudiar el total de germinación en cada caso, sin tener en cuenta ni la evolución del proceso ni los días necesarios para llegar a dichos porcentajes finales.

Además, ha sido añadida la tabla correspondiente al estudio estadístico realizado, con el fin de comprobar la significancia de los resultados obtenidos.

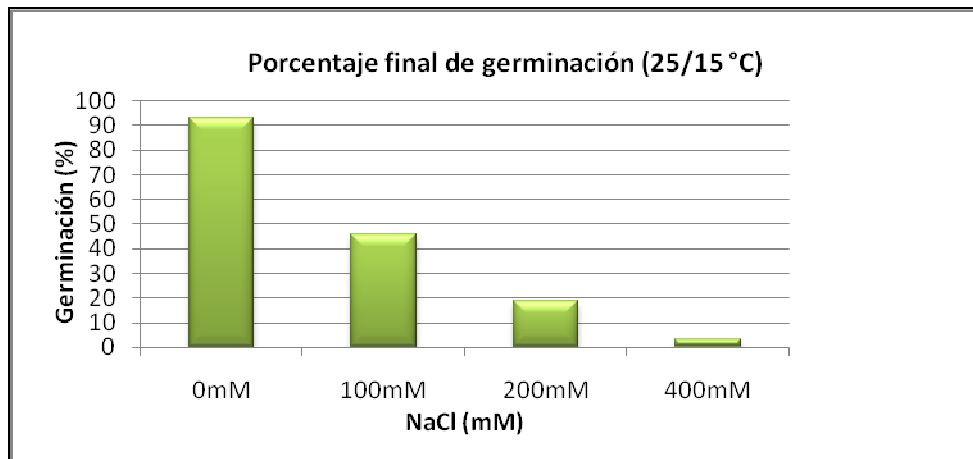
En los primeros ensayos (20/10 °C y 25/15 °C), Gráficas 5 y 6, se observa que los resultados obtenidos son muy semejantes.

El porcentaje de germinación final de las semillas de *Limonium insigne* es máximo cuando en la solución en el que éstas se hallan inmersas es de 0 mM, alcanzándose valores del 97% en el primer ensayo (20/10 °C) y del 93% en el segundo (25/15 °C).

Dicho porcentaje final de germinación va disminuyendo progresivamente conforme la concentración salina en las soluciones va aumentando, encontrándonos con una germinación del 81%, 29% y 11% en las soluciones de 100, 200 y 400 mM respectivamente en el primer ensayo (Gráfica 5; siendo en todos los casos las diferencias significativas, sobre todo entre las salinidades de 100 y 200 mM), y del 46%, 19% y 3% para las mismas soluciones en el segundo ensayo (Gráfica 6), siendo también en todos los casos las diferencias muy significativas tal y como demostró el test de Tukey.



Gráfica 5: Representación del porcentaje de germinación total de *Limonium insigne* para cada concentración salina al final del ensayo correspondiente a las temperaturas de 20/10 °C.

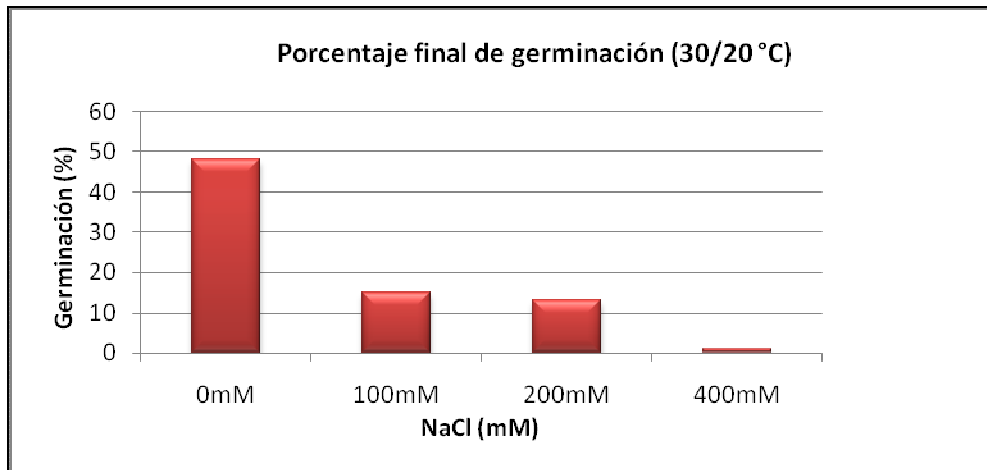


Gráfica 6: Representación del porcentaje de germinación total de *Limonium insigne* para cada concentración salina al final del ensayo correspondiente a las temperaturas de 25/15 °C.

En el tercer ensayo (30/20 °C), Gráfica 7, el descenso en el porcentaje de germinación es bastante acusado con respecto a los anteriores, alcanzándose valores del 48% para 0 mM, del 15% para 100 mM, del 13% a 200 mM y sólo de 1% en la máxima concentración salina de 400 mM, por lo tanto, continúa la tendencia en la que, a mayor salinidad, menor es el porcentaje de germinación.

Sin embargo, hay dos factores que llaman la atención. En primer lugar, existe una diferencia muy significativa entre el porcentaje final de germinación a 0 mM y a 100mM, siendo de 48% y de 15% respectivamente; hecho que no fue tan marcado en los anteriores casos.

En segundo lugar, también es llamativo el hecho de que los valores a concentraciones salinas de 100 mM y 200 mM no son significativos, con valores del 15% y del 13% respectivamente. Siendo muy significativos, sin embargo, la diferencia de éstos con los valores obtenidos a concentraciones de 400 mM (tan sólo un 1%).



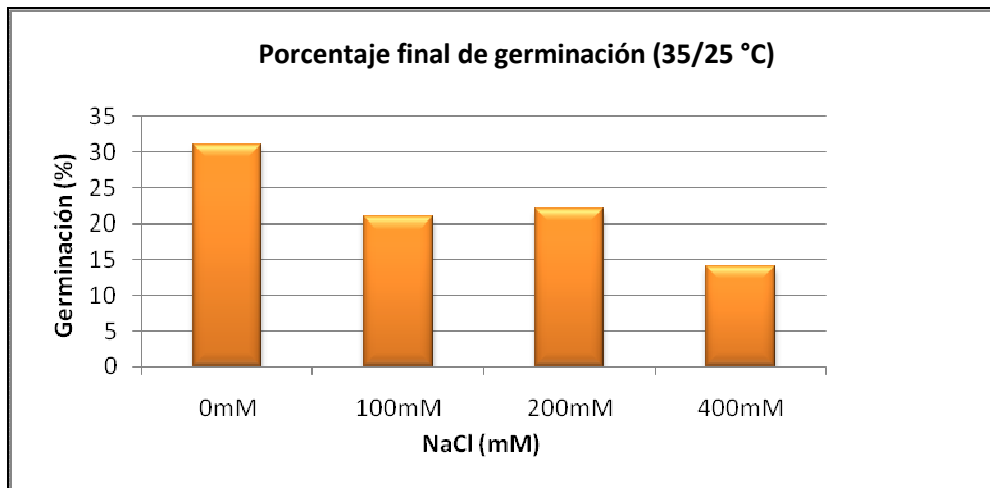
Gráfica 7: Representación del porcentaje de germinación total de *Limonium insigne* para cada concentración salina al final del ensayo correspondiente a las temperaturas de 30/20 °C.

En el último ensayo (35/25 °C), Gráfica 8, la diferencia entre los porcentajes finales de germinación entre unas soluciones y otras sigue la tendencia observada en los ensayos primero y segundo en las soluciones a 0, 100 y 400 mM.

La diferencia es claramente identificable en el caso de la solución 200 mM, que no solo no sigue la tendencia hasta ahora observada, es decir, que en cada ensayo, conforme aumentamos la concentración salina, disminuye el porcentaje de germinación, sino que se obtienen unos valores (22%) que son superiores a los de la solución 100 mM (21%). A pesar de todo, dicha diferencia no es significativa,

En este último ensayo, lo realmente destacable es el descenso tan acusado que se produce en el porcentaje de germinación de las semillas de *Limonium insigne* que son cultivadas en ausencia de salinidad (0 mM de NaCl), siendo sólo de un 31% con respecto al alcanzado en los regímenes de temperatura de 20/10 °C y 25/15 °C, que eran del 97 y 93% respectivamente. Este descenso también se observa a nivel de salinidad de 100 mM con un 81% y 46% en los regímenes de temperatura anteriores frente al 21% en la temperatura máxima de 35/25 °C.

Sin embargo, el efecto perjudicial de la salinidad no se observa a niveles de salinidad altos (200 mM y 400 mM), donde los valores en el porcentaje de germinación final (22% y 14%) son superiores a los obtenidos en los anteriores regímenes de temperatura, aunque, por otro lado, hay que decir que el test de Tukey demostró que los valores correspondientes entre en tercer y cuarto ensayo (30/20 y 35/25 °C) resultaron no ser significativos.



Gráfica 8: Representación del porcentaje de germinación total de *Limonium insigne* para cada concentración salina al final del ensayo correspondiente a las temperaturas de 35/25 °C.

Origen	Suma de Cuadrados	gl	F	Sig.
Modelo corregido	10,060 ^a	15	46,081	0,000
Intersección	17,388	1	1194,747	0,000
T	2,630	3	60,232	0,000
S	5,361	3	122,790	0,000
T*S	2,069	9	15,794	0,000
Error	,699	48		
Total	28,146	64		
Total corregida	10,758	63		

R cuadrado= 0,935 (R cuadrado corregida= 0,915). Significancia para valores inferiores a 0,05.

Tabla 7: Efecto de la temperatura, la salinidad y el conjunto de ambas en el porcentaje final de germinación de las semillas de *Limonium insigne*. Donde gl= grados de libertad y F= valor estadístico de contraste.

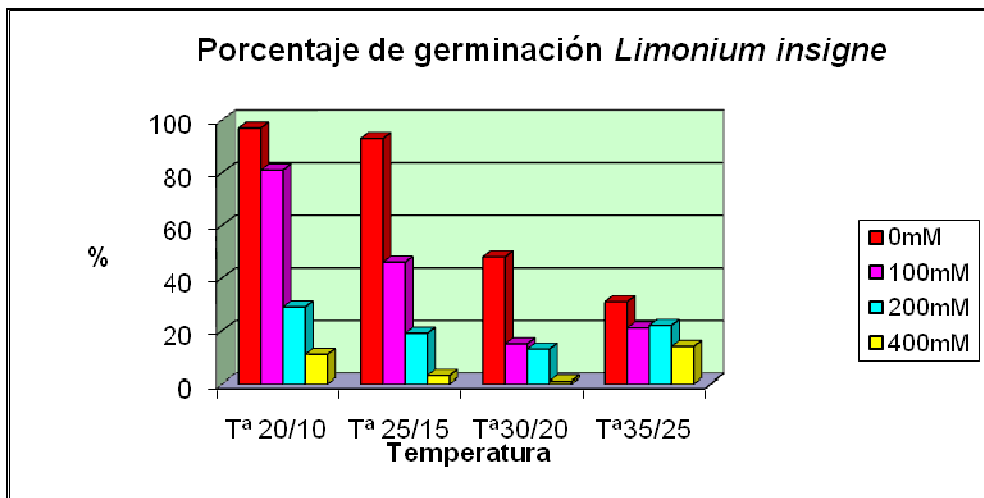
En el diagrama de barras representado en la Gráfica 9, se puede observar, claramente y de forma comparada, la evolución de los porcentajes de germinación de cada solución en cada uno de los ensayos realizados.

En el caso de las soluciones sin salinidad (0 mM) se produce una disminución en los porcentajes de germinación conforme la temperatura va aumentando. Dicho descenso en la germinación es más brusco y de forma significativa entre los ensayos segundo y tercero, mientras que entre los ensayos primero y segundo por un lado, y los ensayos tercero y cuarto por otro, se producen de manera menos drástica.

Por otro lado, en el caso de las soluciones 100 mM se genera un descenso en el porcentaje germinación constante desde el primer ensayo hasta el tercero también de forma significativa, sin embargo, en el último ensayo nos encontramos con un incremento en el porcentaje de germinación (21%) con respecto del ensayo anterior (15%).

Esta tendencia se repite en las concentraciones a 200 mM y a 400 mM. En el primer caso, el porcentaje de germinación en el tercer ensayo es del 13%, mientras que en el cuarto ensayo es del 22%. De la misma manera, a concentraciones de 400 mM, el tercer ensayo muestra una germinación del 1%, frente al 14% observado en el cuarto ensayo; pero estadísticamente no son significativas en ninguno de los casos tal y como demostró el test de Tukey.

De lo observado en la Gráfica 9, podemos deducir que el aumento de la temperatura hace disminuir, de manera general, el porcentaje de germinación de las semillas de *Limonium insigne*, siendo este efecto el mismo independientemente de la solución salina.



Gráfica 9: Comparativa de los porcentajes de germinación finales de *Limonium insigne* para cada una de las concentraciones salinas obtenidos en cada uno de los ensayos realizados (20/10 °C, 25/15 °C, 30/20 °C y 35/25 °C).

4.4. Tiempo medio de germinación.

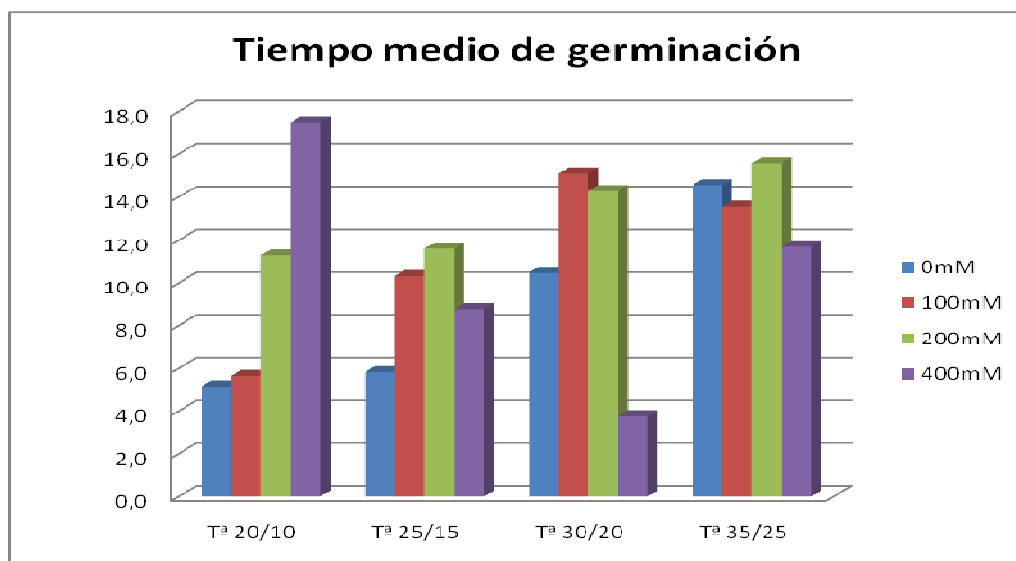
Para la realización de la Gráfica 10 que a continuación se expone, se ha aplicado la fórmula del tiempo medio de germinación (MGT) en la hoja de cálculo Excel a cada concentración salina para cada uno de los ensayos realizados, cuyos resultados se muestran en la Tabla 8.

	20/10 °C	25/15 °C	30/20 °C	35/25 °C
0 mM	5,2	5,8	10,5	14,6
100 mM	5,6	10,3	15,1	13,5
200 mM	11,3	11,6	14,3	15,6
400 mM	17,5	8,8	3,8	11,7

Tabla 8: Medias para las cuatro repeticiones de los tiempos medios de germinación en semillas de *Limonium insigne*.

En el diagrama de barras resultante, Gráfica 10, podemos observar el tiempo medio de germinación de las semillas de *Limonium insigne* en cada ensayo y en las diferentes soluciones salinas a las que han sido sometidas en cada uno de ellos.

A solución 0 mM los valores del tiempo medio de germinación son menores con respecto al resto de soluciones en los dos primeros ensayos. Los tiempos de germinación son muy similares en los ensayos primero y segundo, aumentando de forma significativa en los ensayos tercero y cuarto.



Gráfica 10: Comparativa de los tiempos medios de germinación de *Limonium insigne* para cada una de las concentraciones salinas obtenidos en cada uno de los ensayos realizados (20/10 °C, 25/15 °C, 30/20 °C y 35/25 °C).

Las semillas dispuestas a un nivel de salinidad 100 mM tienen un comportamiento similar al anterior. En el primer ensayo, el tiempo medio de germinación es muy parecido al que posee la solución 0 mM. En los ensayos segundo y tercero aumenta el tiempo medio de germinación con respecto al primero siendo, tal y como reflejó el test de Tukey, no significativa la diferencia entre las temperaturas 20/10 y 25/15 °C (correspondientes al primer y segundo ensayo), pudiéndose ver también que

sus valores son superiores a los obtenidos para la solución 0 mM. En el cuarto ensayo el tiempo medio de germinación disminuye, incluso siendo inferior que el valor conseguido para soluciones a concentraciones de 0 mM en el último ensayo, siendo este hecho no significativo.

En las soluciones a 200 mM se ve un aumento progresivo en el tiempo medio de germinación desde el primer hasta el último ensayo, no siendo estas diferencias significativas.

Por último, las soluciones de 400 mM presentan un descenso no significativo en el tiempo medio de germinación de las semillas desde el primer ensayo hasta el tercero, seguido de un aumento significativo en el cuarto ensayo, cuyo valor es superior a los obtenidos

La Tabla 9 nos demuestra que, de forma general, los datos obtenidos que nos relacionan el tiempo medio de germinación con la temperatura, así como con la combinación de temperatura y salinidad, muestran unos valores que son considerados como significativos, al ser éstos inferiores a 0,05.

Origen	Suma de Cuadrados	gl	F	Sig.
Modelo corregido	0,433 ^a	15	3,275	0,001
Intersección	6,488	1	736,029	0,000
T	0,083	3	3,156	0,033
S	0,053	3	2,014	0,124
T*S	0,296	9	3,734	0,001
Error	0,423	48		
Total	7,344	64		
Total corregida	0,856	63		

R cuadrado= 0,506 (R cuadrado corregida= 0,351). Significancia para valores inferiores a 0,05.

Tabla 9: Efecto de la temperatura, la salinidad y el conjunto de ambas en el tiempo medio de germinación de las semillas de *Limonium insigne*. Donde gl= grados de libertad y F= valor estadístico de contraste.

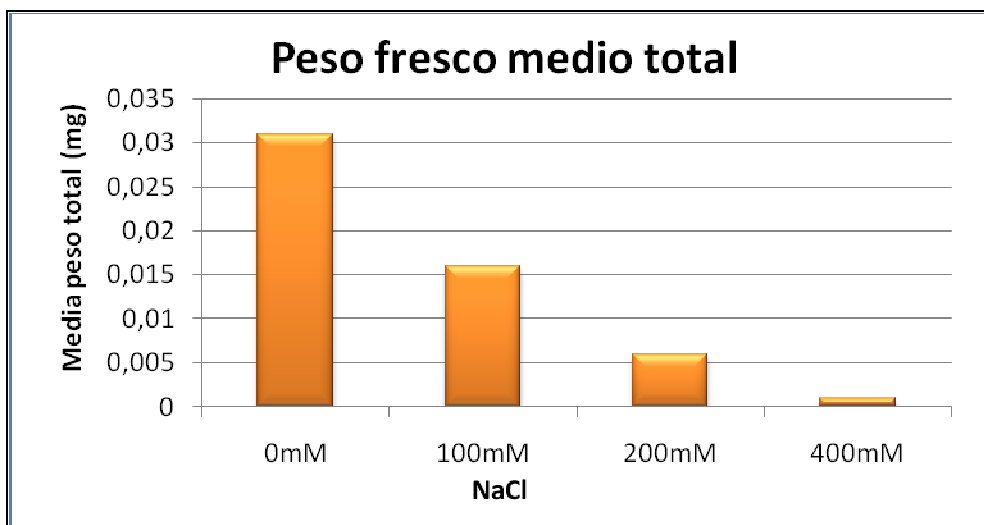
4.5. Efectos sobre los parámetros de crecimiento: Pesos frescos.

Tras lo observado en los estudios anteriores, es evidente que *Limonium insigne* tuvo mayor éxito germinativo en el primer ensayo, es decir, en aquel que consistía en la exposición de las semillas a unas temperaturas de 20/10 °C.

Debido a esto, el ensayo llevado a cabo en macetas troncocónicas se realizó con este mismo rango de temperaturas, obteniéndose los resultados que a continuación se exponen tras los 50 días que duró el experimento.

En la Gráfica 11 se muestran las medias calculadas del peso fresco de las plántulas a distintos niveles de salinidad. Como se puede observar, resulta evidente que el peso fresco de las plántulas de *Limonium insigne* disminuye conforme la concentración salina del agua de riego aplicada aumenta. Así, el mayor peso se alcanza en aquellas plantas regadas con agua carente de NaCl (0 mM) con una media de 0,031 mg, siendo considerable la diferencia con el peso de aquellas tratadas a una concentración 100, 200 y 400 mM con unas medidas de 0,016, 0,006 y 0,001 mg respectivamente.

Es interesante recalcar, además, que la diferencia entre el peso de las plantas tratadas con una solución 0 mM y las tratadas con una solución 100 mM es de prácticamente el doble, siendo esta diferencia significativa según el test de Tukey.



Gráfica 11: Representación de las medias de los pesos frescos totales de *Limonium insigne* para cada una de las concentraciones salinas.

Origen	Suma de Cuadrados	gl	F	Sig.
Modelo corregido	0,002 ^a	3	18,261	0,000
Intersección	0,003	1	76,070	0,000
Salinidad	0,002	3	18,261	0,000
Error	0,000	12		
Total	0,005	16		
Total corregida	0,003	15		

R cuadrado= 0,820 (R cuadrado corregida= 0,775). Significancia para valores inferiores a 0,05.

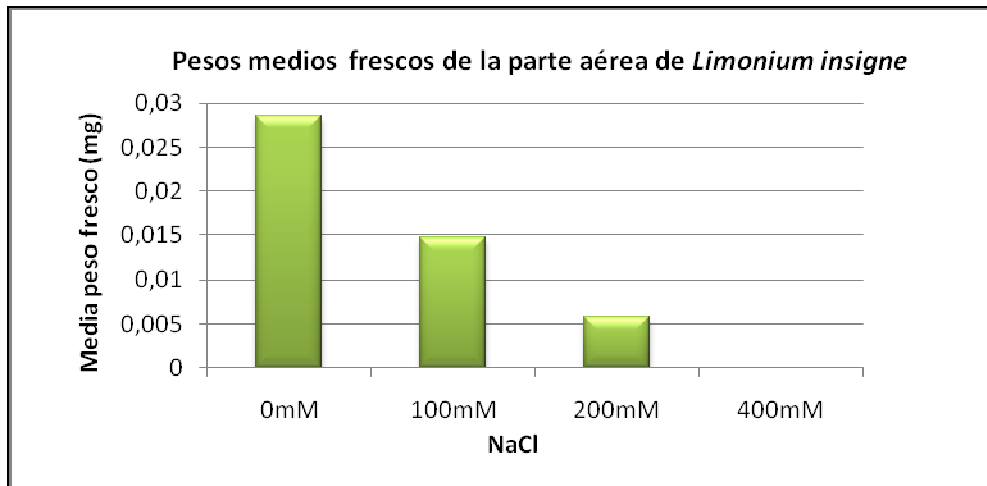
Tabla 10: Efecto de la salinidad en el peso fresco medio total de plantas de *Limonium insigne*. Donde gl= grados de libertad y F= valor estadístico de contraste.

Tras calcular el peso fresco de las plántulas, el siguiente paso consistió en separar la parte aérea de la parte radical con el fin de repetir el procedimiento anterior pero de forma separada.

Las alteraciones causadas en el crecimiento total de las plántulas de *Limonium insigne* son consecuencia lógica de lo que ocurre con sus componentes.

Así, en los primeros resultados que se muestran en la Gráfica 12, podemos observar el peso fresco de la parte aérea de *Limonium insigne*. Tal y como ocurría con el peso total estudiado en la Gráfica 11, el peso fresco de la parte aérea disminuye progresivamente conforme la concentración salina del agua aplicada para el riego se incrementaba, hasta el punto de que la balanza de precisión no fue capaz de detectar el peso de aquellas tratadas a concentración salina de 400 mM, siendo para todos los casos las diferencias significativas, tal y como expresa la Tabla 11.

Las plántulas con mayor peso correspondieron a las regadas con la solución 0 mM, sin NaCl, con un peso medio de 0,0285 mg, seguidas de las regadas con la solución de 100 mM con un peso de 0,01475 mg (nótese que es aproximadamente la mitad que el anterior), seguido por último de las sometidas a concentraciones de salinidad de 200 mM con un peso medio total de 0,00575 mg siendo, nuevamente, todos los datos significativos estadísticamente.



Gráfica 12: Representación de las medias de los pesos frescos de la parte aérea de *Limonium insigne* para cada una de las concentraciones salinas.

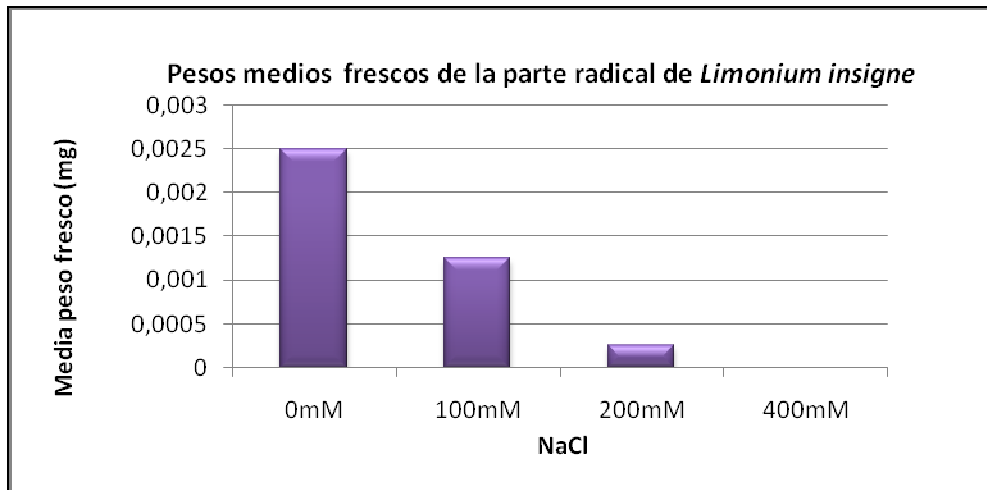
Origen	Suma de Cuadrados	gl	F	Sig.
Modelo corregido	0,002 ^a	3	16,941	0,000
Intersección	0,003	1	72,376	0,000
Salinidad	0,002	3	16,941	0,000
Error	0,000	12		
Total	0,005	16		
Total corregida	0,002	15		

R cuadrado= 0,809 (R cuadrado corregida= 0,761). Significancia para valores inferiores a 0,05.

Tabla 11: Efecto de la salinidad en el peso fresco de la parte aérea de plantas de *Limonium insigne*. Donde gl= grados de libertad v F= valor estadístico de contraste.

Por último se tomaron medidas del peso fresco referentes a la parte radical de las plántulas (Gráfica 13). Tal y como ocurrió anteriormente con la toma de datos del peso de la parte aérea, el peso de la parte radical de las plántulas regadas con agua con una concentración salina de 400 mM no pudo ser detectada por parte de la balanza de precisión.

De la misma forma, el patrón observado en las Gráficas 11 y 12 se repitió en este caso, a saber, el peso medio de la parte radical de las plántulas de *Limonium insigne* descendía progresivamente conforme el agua de riego iba conteniendo una concentración salina superior, siendo las raíces de mayor peso aquellas regadas con un nivel salino de 0 mM de NaCl, con un peso de 0,0025 mg, seguido de aquellas tratadas con una concentración 100 y 200 mM con 0,00125 y 0,00025 mg.



Gráfica 13: Representación de las medias de los pesos frescos de la parte radical de *Limonium insigne* para cada una de las concentraciones salinas.

Tal y como ocurrió con las medias del peso fresco total y el peso fresco de la parte aérea, el peso fresco de las raíces de las plántulas tratadas con una solución 100 mM es prácticamente la mitad que el peso de las que fueron regadas en ausencia de salinidad (0 mM).

Sin embargo, hay que hacer referencia a que, si bien el cómputo global de los datos muestra que existe una diferencia significativa entre la salinidad y el peso fresco de las raíces, tal y como refleja la Tabla 12, el test de Tukey nos dice que las diferencias no son significativas entre las salinidades 200 y 400 mM.

Origen	Suma de Cuadrados	gl	F	Sig.
Modelo corregido	1,550E-5 ^a	3	5,905	0,010
Intersección	1,600E-5	1	18,286	0,001
Salinidad	1,550E-5	3	5,905	0,010
Error	1,050E-5	12		
Total	4,200E-5	16		
Total corregida	2,600E-5	15		

R cuadrado=0,596 (R cuadrado corregida= 0,495). Significancia para valores inferiores a 0,05.

Tabla 12: Efecto de la salinidad en el peso fresco de la parte radical de plantas de *Limonium insigne*. Donde gl= grados de libertad y F= valor estadístico de contraste.

4.6. Efectos sobre los parámetros de crecimiento: Pesos secos.

Tras la obtención de los datos anteriores relativos a los pesos frescos, se dispusieron las plantas en una estufa durante 24 horas a 60 °C, con la finalidad de,

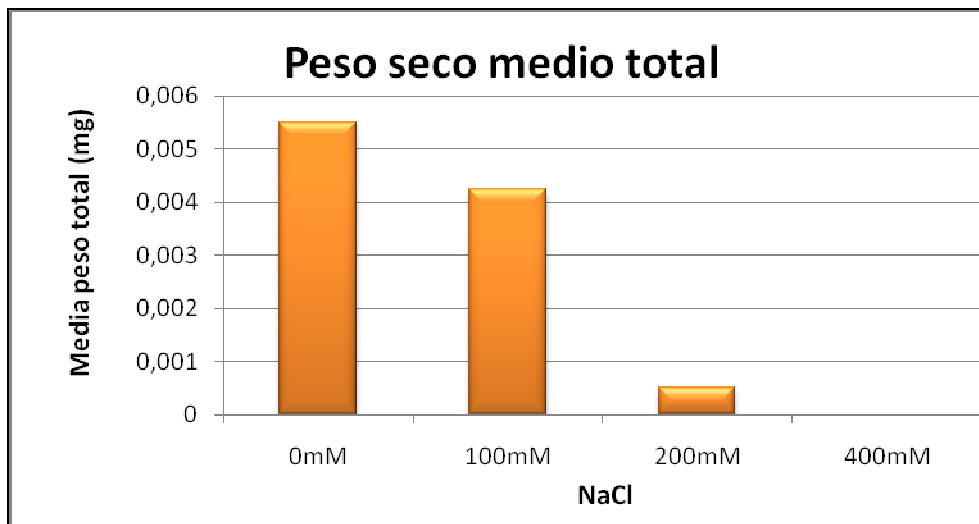
trascurrido este tiempo, repetir las mediciones anteriores, consiguiendo de esta forma el peso seco de las muestras.

Como podemos apreciar en la Gráfica 14 se repite el mismo patrón que hasta ahora se ha ido observando, es decir, conforme la concentración salina del medio ha ido aumentando el peso de las plántulas de *Limonium insigne* ha ido disminuyendo.

En este caso en particular se puede ver que las plantas con un peso seco superior son, nuevamente, las tratadas en ausencia de salinidad, alcanzando un peso medio de 0,0055 mg, seguido de cerca de aquellas regadas con una solución salina 100 mM con un peso seco medio de 0,00425 mg, siendo las diferencias no significativas.

Llama la atención, por otro lado, la disminución tan brusca que se puede observar en el peso de las plántulas sometidas a salinidad 200 mM con aquellas sometidas a salinidad 100 mM, obteniéndose de éstas un peso seco medio de tan sólo 0,0005 mg, sí siendo en este caso, según el test de Tukey, las diferencias significativas (Tabla 13).

El peso seco total de las plántulas de *Limonium insigne* tratadas a salinidades de 400 mM no pudo ser detectado por la balanza de precisión; hecho que se repitió para el cálculo de los pesos secos tanto de la parte aérea como de la parte radical por separado.



Gráfica 14: Representación de las medias de los pesos secos totales de *Limonium insigne* para cada una de las concentraciones salinas.

Origen	Suma de Cuadrados	gl	F	Sig.
Modelo corregido	8,919E-5 ^a	3	9,707	0,002
Intersección	0,000	1	34,306	0,000
Salinidad	8,919E-5	3	9,707	0,002
Error	3,675E-5	12		
Total	0,000	16		
Total corregida	0,000	15		

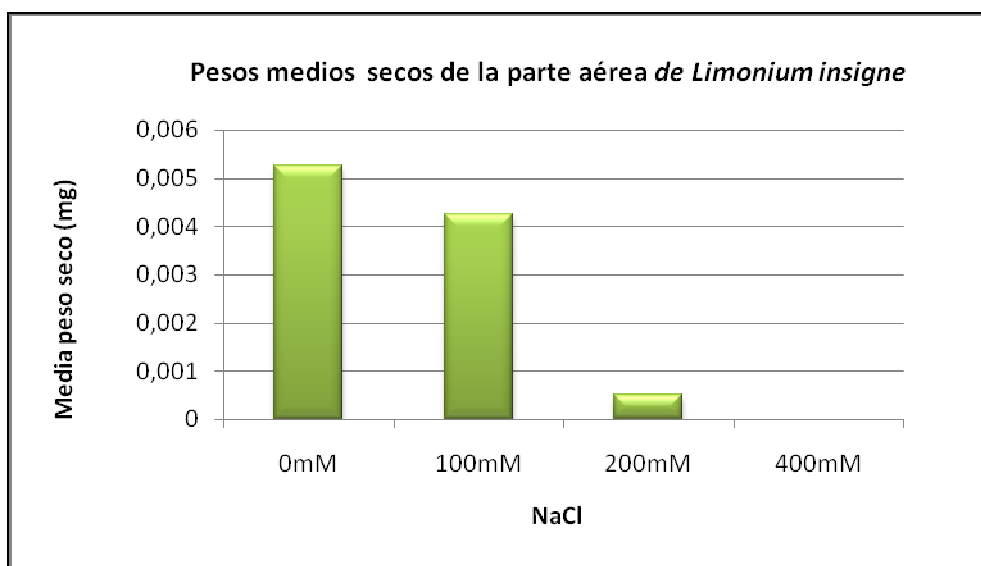
R cuadrado= 0,708 (R cuadrado corregida= 0,635). Significancia para valores inferiores a 0,05.

Tabla 13: Efecto de la salinidad en el peso seco medio total de plantas de *Limonium insigne*. Donde gl= grados de libertad v F= valor estadístico de contraste.

En lo referente a las medidas del peso en seco de la parte aérea de las plántulas, Gráfica 15, la tendencia es exactamente la misma que la observada en la Gráfica 14.

En la Gráfica 15 se hace evidente que las plántulas con mayores pesos secos en su parte aérea fueron aquellas regadas con bajos niveles de salinidad (0 y 100 mM) con unas medidas de 0,00525 y 0,00425 respectivamente, siendo sus diferencias no significativas (Tabla14).

Nuevamente, las plantas sometidas a concentraciones salinas altas de 400 mM no dieron resultado alguno en la balanza de precisión.



Gráfica 15: Representación de las medias de los pesos secos de la parte aérea de *Limonium insigne* para cada una de las concentraciones salinas.

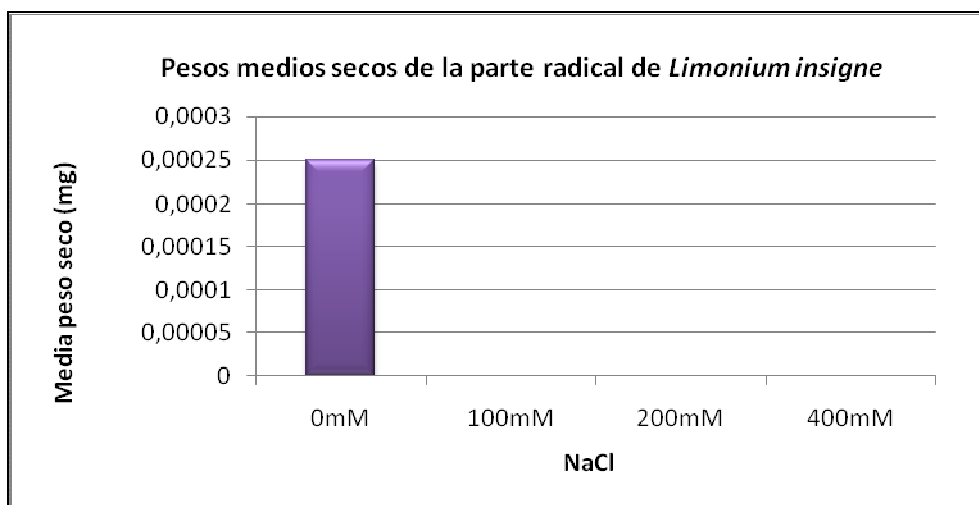
Origen	Suma de Cuadrados	gl	F	Sig.
Modelo corregido	8,350E-5 ^a	3	9,151	0,002
Intersección	,000	1	32,877	0,000
Salinidad	8,350E-5	3	9,151	0,002
Error	3,650E-5	12		
Total	0,000	16		
Total corregida	0,000	15		

R cuadrado= 0,696 (R cuadrado corregida= 0,620). Significancia para valores inferiores a 0,05.

Tabla 14: Efecto de la salinidad en el peso seco de la parte aérea de plantas de *Limonium insigne*. Donde gl= grados de libertad y F= valor estadístico de contraste.

En la Gráfica 16 se exponen los resultados de los pesos secos referentes a la parte radical de *Limonium insigne*.

Lo más significativo en este caso es que tan sólo pudieron ser tomadas las medidas de la parte radical de las plantas tratadas con agua a concentración salina 0 mM, con un resultado de 0,00025 mg, puesto que los pesos secos de las partes radicales pertenecientes a las plantas regadas con agua con alguna concentración de NaCl, dieron unos pesos demasiado pequeños como para ser captados por la balanza de precisión.



Gráfica 16: Representación de las medias de los pesos secos de la parte radical de *Limonium insigne* para cada una de las concentraciones salinas.

4.7. Variación entre el peso fresco y el peso seco.

En este apartado se presenta la diferencia existente en las medias entre el peso fresco y el peso seco de las plántulas de *Limonium insigne*.

Diferencias de pesos (peso fresco – peso seco) en mg			
Salinidad (mM)	Peso total	Peso parte aérea	Peso parte radical
0	0,0255	0,02325	0,00225
100	0,01175	0,0105	0,00125
200	0,0055	0,00525	0,00025
400	0,001	0	0

Tabla 15: Diferencia de peso de las plántulas de *Limonium insigne* tras su introducción en secadora a 60 °C durante 24 horas.

En la Tabla 15 se muestra de forma detallada la disminución en el peso del total, la parte aérea y la parte radical de las plántulas para cada una de las concentraciones salinas tras haber sido sometidas a desecación.

Se aprecia claramente que la mayor disminución en el peso las han sufrido aquellas plantas que han sido tratadas en ausencia de salinidad (0 mM).

En lo referente al peso total, es interesante el hecho de que esta pérdida se reduce a prácticamente la mitad en aquellas plantas tratadas con soluciones a 100 mM con respecto a las tratadas a 0 mM, realidad que se repite si comparamos los pesos totales de las plantas sometidas a salinidades de 200 mM con respecto a las de salinidad de 100 mM.

Este mismo patrón parece repetirse si observamos los resultados de la diferencia de peso de la parte aérea para estas tres concentraciones salinas (0, 100 y 200 mM); mientras que tan sólo se aprecia entre las concentraciones de 0 y 100 mM para los pesos de la parte radical.

5- DISCUSIÓN



El estudio de la germinación de especies halófitas como *Limonium insigne* a distintas concentraciones salinas y a distintos rangos de temperatura facilitan el conocimiento sobre las condiciones más favorables para que se lleve a cabo la germinación de esta especie.

La germinación de las semillas de *Limonium insigne* se reduce progresivamente conforme aumenta la concentración salina en la solución proporcionada, al igual que en experiencias realizadas por Herranz *et al.* (2004) en *Arthrocnemum macrostachyum*, *Senecio auricula* y *Lepidium cardamine*, por Zia & Khan (2004) para *Limonium stocksii*, Song *et al.* (2008) estudiando la germinación de *Suaeda salsa* o Orlovsky *et al.* (2011) para las especies *Kochia prostrata* y *Kochia scoparia*.

Además, de la misma forma que en los estudios anteriormente mencionados, *Limonium insigne* mostró un mayor índice de germinación bajo condiciones no salinas para todos los ensayos a diferente temperatura, ya que las semillas no se ven sometidas a un estrés fisiológico. Según Gulzar & Khan (2001), las semillas de muchos halófitos germinan mejor bajo condiciones no salinas, y tiene distintos niveles de tolerancia a la sal.

Normalmente, según estudios realizados por varios autores (Gutterman, 1992; Huang & Gutterman, 1999; Badger & Ungar, 1989; Pujol *et al.*, 2000), la germinación de especies halófitas en el campo es controlada por varios factores ambientales, en particular la luz, la temperatura y la salinidad. En nuestro trabajo observamos que la evolución de la germinación de semillas bajo condiciones no salinas (0 mM) durante los 25 días que duró cada ensayo era controlada por la temperatura del experimento. La emergencia de la radícula ocurría a los pocos días de empezar la experiencia cuando los rangos de temperatura eran de 20/10 °C y de 25/15 °C, correspondiendo a un porcentaje de germinación final del 97 y 93% respectivamente. Sin embargo, la tendencia en la germinación pasaba a ser más pausada y progresiva en el tercer y cuarto ensayo (30/20 y 35/25 °C respectivamente) con porcentajes de germinación del 48 y 31%, lo cual nos indica que, a pesar de la evidente mejora en la germinación cuando las semillas se hallaban inmersas en un medio carente de salinidad, el rango de temperatura ambiente supone un factor que controla la germinación de las semillas halófitas.

La germinación se ve afectada por el incremento de la salinidad, siendo esta disminución significativa a niveles salinos altos. Observamos que a una salinidad 100 y 200 mM se produce la germinación de forma progresiva, llegando al número total de semillas germinadas prácticamente al final de todos y cada uno de los ensayos realizados. Aunque, por otro lado, en las semillas regadas con la solución 100 mM en el primer ensayo (20/10 °C) podemos observar que la mayoría de las radículas emergieron a los pocos días de comenzar el experimento. Este hecho también fue observado en la especie *Limonium stocksii* por Zia & Khan (2004), de cuyos resultados se dedujo que las semillas tratadas con salinidades bajas, de valores de 100 mM, y a temperaturas entre 20 y 30 °C ofrecían los mejores resultados.

En lo referente a las semillas regadas con la solución salina 400 mM, la germinación fue muy reducida en todos los ensayos practicados.

La germinación de *Limonium insigne* en el último ensayo (35/25 °C) fue baja, donde todas las semillas, y de forma independiente a la salinidad con que eran tratadas, mostraron una tendencia similar. La evolución de la germinación en el tiempo parecía no estar influenciada de forma notable por la concentración de NaCl presente en el agua con que eran regadas, ya que las variaciones observadas no son significativas, pero sí se observaron influencias por el rango de temperatura. Esta disminución en la germinación y el aumento del tiempo necesario para que las semillas germinen está apoyado por el trabajo de Greenwood & MacFarlane (2006) que observaron en distintas especies de halófito, que las altas temperaturas de verano eran menos favorables para la germinación de las semillas.

La germinación es uno de los procesos más críticos en el ciclo de vida de los halófitos (Ungar, 1996). Distintos estudios (Greenwood & MacFarlane, 2006; Vicente *et al.*, 2007; Engloner, 2009; Vicente *et al.*, 2009) ponen de manifiesto que las semillas de los halófitos se comportan de manera parecida frente a la salinidad, se retrasa el comienzo de la germinación, la germinación se reduce y algunas semillas permanecen dormidas. En nuestro experimento el porcentaje final de germinación, sufre una disminución significativa en el número de semillas germinadas conforme la salinidad aumenta para los tres primeros ensayos (temperaturas de 20/10, 25/15 y 30/20 °C). Esto nos hace deducir que *Limonium insigne* posee una capacidad germinativa menor cuanto mayor es la temperatura ambiental y la concentración salina del medio.

La presencia de condiciones hipersalinas en el sustrato durante los meses estivales donde las temperaturas son elevadas y existe una alta evapotranspiración, puede dar lugar a que estos ambientes sean inapropiados temporalmente para la germinación y el normal desarrollo de las plántulas, como han puesto de manifiesto Ungar (1977), Khan & Ungar (1997) y Khan & Gulzar (2003). Pero no para todos los halófitos esta tendencia es la normal, ya que los estudios realizados por Gulzar *et al.* (2001), indican que *Urachondra setulosa*, no germina bien a temperaturas bajas del orden de 20/10 °C ni a temperaturas elevadas del orden de 35/25 °C, lo que nos hace pensar que cada especie de halófito tendrá su temperatura favorable de germinación, por encima y por debajo de la cual su porcentaje de germinación se verá disminuido. Para el caso de *Limonium insigne* podemos afirmar que su temperatura más adecuada para que se produzca la máxima germinación es el rango de 20/10 °C, que corresponde a temperaturas de primavera cuando, además, se producen las máximas precipitaciones en la zona donde se desarrolla el *Limonium insigne*.

Sin embargo, lo realmente llamativo sucede en el último ensayo, donde se aplicaron las temperaturas más elevadas (35/25 °C). En este caso, el mayor porcentaje de semillas germinadas se muestra nuevamente en aquellas dispuestas en condiciones no salinas (0 mM), aunque se trata de un porcentaje de germinación muy bajo (31%).

Pero, de forma contraria a lo que cabría esperar, la siguiente concentración salina a la que *Limonium insigne* muestra un mayor rango de semillas germinadas no es el de 100 mM, con un 21%, si no el de 200 mM con un 22%, aunque hay que señalar que el test de Tukey mostró que no existían diferencias significativas entre las temperaturas de los dos últimos ensayos (30/20 °C y 35/25 °C)

También destacar que, para las semillas sometidas a una salinidad 400 mM, el mayor porcentaje de germinación de los cuatro ensayos realizados fue en el último, es decir, tal y como se pudo apreciar en la Gráfica 9, el número de semillas germinadas a un nivel de salinidad de 400 mM fue disminuyendo desde el primer al tercer ensayo (conforme aumentaba la temperatura) hasta que, en el cuarto ensayo, se produjo un índice de germinación superior al de cualquiera de los tres ensayos previos. Esto nos podría hacer pensar que la especie halófila *Limonium insigne* posee una mayor capacidad germinativa a elevadas temperaturas cuando la salinidad existente en el medio es alta, pero los resultados no son del todo concluyentes, ya que las diferencias entre los valores obtenidos no son significativas. Apoyándonos en los trabajos realizados por Gulzar & Khan (2001); Wei *et al.* (2008); Pangua *et al.* (2009) donde observan que el aumento de la salinidad conlleva una disminución de la germinación al igual que su inhibición completa a salinidades más allá de los límites de tolerancia de la especie, podemos afirmar que la germinación de *Limonium insigne* se ve afectada por el aumento de la salinidad, pero que no ha llegado a su límite de tolerancia.

El tiempo medio de germinación y, por tanto, la velocidad de germinación, va siendo mayor conforme la salinidad del medio posee una mayor concentración y se aumenta la temperatura a la que son expuestas las semillas de *Limonium insigne*.

Este mismo hecho ha quedado reflejado en los estudios llevados a cabo por Debez *et al.* (2004) con *Cakile marítima* y Li (2008) con las especies *Limonium sinense*, *Glycine soja* y *Sorghum sudanese*. Redondo-Gómez *et al.* (2008) concluyen, en su trabajo sobre *Limonium emarginatum*, que los dos efectos más importantes producidos por la salinidad son la disminución en el porcentaje de germinación y el aumento en el tiempo de germinación, ambos efectos los hemos observado en nuestro experimento con las semillas de *Limonium insigne*.

La incidencia de la salinidad en el crecimiento vegetal se ha investigado en numerosas especies (Al-Kateed, 2006; Carter *et al.*, 2005; Williams & Ungar, 1972), poniendo de manifiesto que la salinidad de los suelos o del agua de riego reduce el crecimiento vegetativo de las especies halófitas debido a un ajuste en el potencial osmótico de sus tejidos al ambiente salino.

El peso total de las plantas de *Limonium insigne* va disminuyendo progresivamente conforme la concentración salina existente en el medio va aumentando, tal y como reflejaba la Gráfica 11. Este hecho se apoya en los estudios realizados por Orlovsky *et al.* (2011) tratando plantas de *Kochia prostrata* y *Kochia*

scoparia con soluciones de 0,5, 1, 2, 3 y 5% de NaCl, en los cuales mostraron una tendencia igual a la de *Limonium insigne*, ya que, en este caso, el incremento en la salinidad reflejó una disminución en la altura y en el peso de las plantas.

Efectos similares han sido observados en *Suaeda salsa* (Song *et al.*, 2008), donde la elevada salinidad inhibía de forma notable la longitud de las plantas y, por lo tanto, su peso fresco total.

Por otro lado, los resultados obtenidos nos muestran que la relación existente entre el peso medio de las plantas tratadas a 0 mM con aquellas tratadas a 100 mM, es de prácticamente la mitad, hecho que se repite entre las plantas regadas con las soluciones salinas de 100 mM y 200 mM, y entre estas últimas con las tratadas a concentraciones de 400 mM. Esto nos indica que existe una reducción significativa en el crecimiento de las plantas de *Limonium insigne* con el aumento de la salinidad en el medio y, al igual que ocurría en la germinación, la ausencia de salinidad beneficia al desarrollo de este halófito, al igual que comprobó Redondo-Gómez *et al.* (2008) en su trabajo con *Limonium emarginatum*.

Idénticos resultados se obtienen al estudiar el peso de forma separada tanto de la parte aérea como de la parte radical, donde la disminución de ambas partes de la planta reducen su biomasa con el aumento de la salinidad.

Todos estos resultados nos indican que se produce una drástica disminución en el crecimiento total de *Limonium insigne* como consecuencia del incremento en la concentración salina del agua con que fue tratada, tal y como reflejan experiencias similares realizadas por Bewley & Black (1994) para la planta *Sorghum sudanese* y por Li (2008) para *Glycine soja*.

Sin embargo, no es éste el comportamiento que siguen todas las plantas calificadas como halófitas. Por ejemplo el caso de *Cakile marítima* (Bedez *et al.*, 2004), la cual fue tratada a concentraciones salinas de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mM y, como resultado, se obtuvo que la biomasa mostró un ligero incremento en aquellas plantas que fueron tratadas con la solución salina de 100 mM con respecto a aquellas control (0 mM). Este efecto es debido a la ley de Arnt-Schulz (Tingery, 1980), que establece que hay una tendencia universal a que los tóxicos en bajas concentraciones estimulen los procesos biológicos y en altas concentraciones los depriman, pero este caso no ocurre con las plántulas de nuestro estudio.

El agua total absorbida disminuye con el aumento de la salinidad. La permeabilidad de las raíces de las plantas halófitas disminuye significativamente bajo las condiciones de estrés salino. Así, conforme la concentración salina con la que son tratadas las plantas de *Limonium insigne* es más reducida, la presencia de agua es mayor, lo cual nos vuelve a indicar que, cuanto mayor es la cantidad de sales existentes

en el medio donde se desarrollan las plantas, menos será su contenido en agua, pues más difícil será para éstas obtenerla del suelo

Todos estos datos nos demuestran que la salinidad, ya sea natural o inducida, es un estrés medioambiental generalizado que puede limitar el crecimiento y desarrollo de las plantas. Según De Villiers *et al.* (2001), las etapas tempranas del crecimiento de algunas especies parecen ser menos tolerantes a la sal que durante la germinación y las etapas maduras.

Para finalizar, y en referencia a la aplicación del presente trabajo tanto para la restauración como para el ajardinamiento de áreas salinas, los datos obtenidos demuestran que el mejor rango de temperaturas en el que se produce la germinación de *Limonium insigne* es de 20/10 °C. Esta temperatura coincidiría en Almería con los meses comprendidos entre marzo y mayo, en los que las máximas temperaturas no superarían en mucho los 20 °C, mientras que en extrañas circunstancias las mínimas temperaturas serían inferiores a los 10 °C, de modo que serían las fechas más convenientes para sembrar las semillas tanto en campo como en jardines. Además, las mayores precipitaciones tienen lugar entre los meses de diciembre y enero, lo cual favorecería también a la posterior germinación de las semillas de *Limonium insigne*, pues se produciría un importante lavado de sales previo a la siembra.

6- CONCLUSIONES



- 1) Las semillas de *Limonium insigne* se ven afectadas de forma paulatina por la presencia de la salinidad.
- 2) Las semillas de *Limonium insigne* presentan los mejores porcentajes de germinación y un tiempo medio de germinación menor a un rango de temperatura de 20/10 °C, considerándose estas temperaturas las más idóneas para la obtención de plántulas en viveros y su trasplante a la zona de ajardinamiento.
- 3) Las semillas de *Limonium insigne* disminuyen su porcentaje de germinación conforme aumenta la temperatura en ausencia de salinidad (0 mM de NaCl), al igual que ocurre a concentraciones de 100, 200 y 400 mM de NaCl.
- 4) A una concentración de 400 mM de NaCl, la germinación se redujo conforme la temperatura del medio aumentaba a excepción del último de los ensayos (35/25 °C), donde los índices de porcentaje final de germinación fueron los más elevados de todo el experimento.
- 5) El crecimiento de las plántulas de *Limonium insigne* resulta sistemáticamente afectada por la presencia de salinidad en el medio de cultivo. Los pesos frescos y secos, tanto totales como de la parte aérea y de la parte radical por separado, disminuyen conforme mayor es la concentración salina con la que fueron tratadas las plantas.
- 6) La diferencia entre el peso total, así como del peso de la parte aérea y de la parte radical por separado, de las plántulas frescas y de las plántulas secadas, demuestran que, conforme menor es la salinidad del medio, mayor cantidad de agua pueden acumular en su interior las plantas de *Limonium insigne*.

7- BIBLIOGRAFÍA



Adams, S.R. & Langton, F.A. (2005). Photoperiod and plant growth: a review. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 80: 2-10.

Ahmed, M.Z. & Khan, M.A. (2010). Tolerance and recovery responses of playa halophytes to light, salinity and temperature stresses during seed germination. *Flora*, 205: 764-771.

Álvarez-Rogel, J., Alcaraz, F. & Ortiz, R. (2000). Soil salinity and moisture gradients and plant zonation in Mediterranean salt marshes of Southeast Spain. *Wetlands*, 20: 357-372.

Álvarez-Rogel, J., Martínez-Sánchez, J.J., Carrasco, L. & Marín, C.M. (2006). Vegetal bioindicators for monitoring hydrological and saline gradients in a coastal dune salt marsh of southeast Spain: a conceptual model. *Wetlands*, 26: 703-717.

Al-Khateed, S.A. (2006). Effect of salinity and temperature on germination, growth and ion relations of *Panicum turgidum* Forssk. *Bioresource Technology*, 97: 292-298

Al-Sherif, E.A. (2009). *Melilotus indicus* (L.) All., a salt-tolerant wild leguminous herb with high potential for use as a forage crop in salt-affected soils. *Flora*, 204: 737-746.

Amezketta, E. (2006). An integrated methodology for assessing soil salinization, a precondition for land desertification. *Journal of Arid Environments*, 67: 594-606.

Anthos (2010). Sistema de información de las plantas de España. Real Jardín Botánico, CSIC-Fundación Biodiversidad. Recurso electrónico en: <http://www.anthos.es>.

Ault, J. (2003). Breeding and development of new ornamental plants from North American native taxa. *Acta Horticulturae*, 624: 37-42.

Azcón-Bieto, J. & Talón M. (2008). *Fundamentos de Fisiología vegetal*. 2ª edición. McGraw-Hill-Interamericana. 522 pp.

Bacchetta G., Bueno Sánchez A., Fenu G., Jiménez-Alfaro B., Mattana E., Piotto B. & Virevaire M. (EDS). (2008). *Conservación ex situ de plantas silvestres*. Principado de Asturias/La Caixa. 378 pp.

Badger, K.S. & Ungar, I.A. (1989). The effects of salinity and temperature on the germination of the inland halophyte *Hordeum jubatum*. *Canadian Journal of Botany*, 67: 1420-1425.

Baena, J. & Ewert K. (1983). Memoria y Hoja Geológica nº 1058 (Roquetas de Mar). Mapa Geológico de España a E 1:50.000 (Segunda Serie). IGME. Madrid. 34 pp.

Bainbridge, D., Tiszler, J., MacAller, R. & Allen, M. F. (2001). Irrigation and mulch effects on desert shrub transplant establishment. *Native Plants Journal*, 2: 25-29.

Bañón, S., Franco, J.A., Fernández, J.A., Ochoa, J. & González, A. (2001a). Growth and leaf colour responses of oleander (*Nerium oleander* L.) to pinching and chlormequat chloride treatment. *Acta Horticulturae*, 559: 155-160.

Bañón, S., Ochoa, J., Fernández, J. A. & Franco, J. A. (2001b). Paclobutrazol as aids for *Phillyrea angustifolia* nursery production. *HortScience*, 36: 449-500.

Bañón, S., Ochoa, J., Franco, J.A., Alarcón, J.J., Fernández, T. & Sánchez-Blanco, M.J. (2002). The influence of acclimation treatments on the morphology, water relations and survival of *Myrtus communis* L. plants. En: Sustainable Use and Management of Soils in Arid and Semiarid Regions. (Faz, A., Ortiz, R., Mermut, A. R., Eds.). Quaderna Editorial, Murcia, España. 275- 277.

Bañón, S., Ochoa, J., Fernández, J. A., Sánchez, J. J. M., Franco, J. A. & González, A. (2003a). Plant growth retardants for introduction of native *Reichardia tingitana*. *Acta Horticulturae*, 598: 271-277.

Bañón, S., Ochoa, J., Franco, J.A., Sánchez-Blanco, M.J. & Alarcón, J.J. (2003b). Hardening of *Olea europaea* var. *sylvestris* seedlings by application of water and humidity ambiental stress treatments. *Acta Horticulturae*, 614: 515-520.

Bañón, S., Fernández, J.A., Franco, J.A., Torrecillas A., Alarcón, J.J. & Sánchez-Blanco, M.J. (2004). Effects of water stress and night temperature pre-conditioning on water relations and morphological and anatomical changes of *Lotus creticus* plants. *Scientia Horticulturae*, 101: 333-342.

Bañón, S., Fernández, J.A., Ochoa, J. & Sánchez-Blanco, M.J. (2005). Paclobutrazol as an aid to reduce some effects of salt stress in oleander seedlings. *European Journal of Horticultural Science*, 70: 43-49.

Bartual, J. (2000). Preselección clonal de *Banksia integrifolia* L.F. para uso ornamental. *Actas de Horticultura*, 31: 187-191.

Benson, E.E. (1999). Cryopreservation. In: Benson E.E. (ed). *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor & Francis, Ltd. 83-95

Bergeron, O., Lamhamedi, M.S., Margolis, H.A., Bernier, P.Y. & Stowe, D.C. (2004). Irrigation control and physiological responses of nursery-grown black spruce seedlings (1+0) cultivated in airlit containers. *HortScience*, 39: 599-605.

Besnier-Romero, F. (1989). *Semillas: Biología y tecnología*. Ediciones Mundi Prensa. 637 pp.

Bewley, J.D. & Black, M. (1994). *Seeds: Physiology of Development and Germination*. 2nd Edn. Plenum Press, New York and London. 147 pp.

Biel, C., Savé, R., Habrouk, A., Espelta, J.M. & Retana, J. (2004). Effects of restricted watering and CO₂ enrichment in the morphology and performance after transplanting of nursery-grown *Pinus nigra* seedlings. *HortScience*, 39: 535-540.

Biernbaum, J.A. & Versluys, N.B. (1998). Transplant production and performance: Water management. *HortTechnology*, 8: 504-509.

Bilderback, T.E. (2002). Water management is key in reducing nutrient runoff from container nurseries. *HortTechnology*, 12: 541-544.

Black, M. & Pritchard, H.W. (eds), (2002). Dessication and survival in plants, drying without dying. CABI Publishing, Oxon, UK. 373-382.

Bloomfield, J., Vogt, K. & Wargo, P.M. (1996). Tree root turnover and senescence. En: *Plant Roots: The Hidden Half*. (Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U., Eds.). Marcel Dekker, NY, USA. 363-381.

Bradley, P.H. & Morris, J.T. (1991). Relative importance of ion exclusive, secretion and accumulation in *Spartina alterni* Loisel. *Journal Experimental of Botany*, 42: 1525-1532.

Caro-Fernández, M. (1969). Suelos salinos y procesos de salinización en el Sureste español. *Servicio de publicaciones de la Universidad de Murcia*, 28: 1-3.

Carpio, L.A., Davies, F.T. Jr. & Arnold, M.A. (2003). Effect of commercial arbuscular mycorrhizal fungi on growth, survival, and subsequent landscape performance of selected container grown nursery crops. *Journal of Environmental Horticulture*, 21: 190-195.

Carpio, L.A., Davies, F.T. Jr. & Arnold, M.A. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi, organic and inorganic controlled-release fertilizers: Effect on growth and leachate of container-grown Bush Morning Glory (*Ipomoea carnea* ssp. *fistulosa*) under high production temperatures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130: 131-139.

Carter, C.T.; Grieve C.M. & Poss, J.A. (2005) Salinity effects on emergence, survival, and ion accumulation of *Limonium perezii*. *Journal of Plant Nutrition*, 28: 1243-1257.

Chapman, V.J. (1960). *Salt Marshes and Salt Deserts of the World*. Interscience Publishers, New York. 392 pp.

Close, D.C. & Beadle, C.L. (2004). Total, and chemical fractions, of nitrogen and phosphorus in Eucalyptus seedling leaves: effects of species, nursery fertiliser management and transplanting. *Plant and Soil*, 259: 85-95.

Close, D.C., Beadle, C.L. & Battaglia, M. (2004). Foliar anthocyanin accumulation may be useful indicator of hardiness in eucalypt seedlings. *Forest Ecology and Management*, 198: 169-181.

Cochran W.G. (1941). The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. *Ann. Eugenics*, 11, 47-61.

Cortés, P., Espelta, J.M., Savé, R. & Biel, C. (2004). Effects of a nursery CO₂ enriched atmosphere on the germination and seedling morphology of two Mediterranean oaks with contrasting leaf habit. *New Forest*, 28: 79-88.

David H.A., Hartley H.O., Pearson E.S. (1954). The distribution of the ratio in a single normal sample of range to standard deviation. *Biometrika*, 41, 482-493.

De Herralde, F., Biel, C., Savé, R., Morales, M.A., Torrecillas, A., Alarcón, J.J. & Sánchez-Blanco, M.J. (1998). Effect of water and salt stresses on the growth gas exchange and water relations in *Argyranthemum coronopifolium* plants. *Plant Science*, 139: 9-17.

Debez, A., Hamed, K.B., Grignon, C. & Abdelly, C. (2004). Salinity effects on germination, growth, and seed production of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant and Soil*, 262: 179-189.

Delgado, I.C. (1992). Distribución de nutrientes minerales en plantas de girasol (*Helianthus annuus L.*) sometidas a estrés salino. Tesis doctoral. Universidad de Granada-Facultad de Ciencias. 336 pp.

Delgado, I.C. & Sánchez-Raya, J. (2007). Effect of sodium chloride and mineral nutrients on initial stages of development of sunflower life. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38: 2013-2027.

De Pascale, S., Maggio, A. & Barbieri, G. (2005). Soil salinization affects growth, yield and mineral composition of cauliflower and broccoli. *European Journal of Agronomy*, 23: 254-264.

De Villiers, A.J., Van Rooyen, M.W. & Theron G.K. (2001). Seedling emergence and survival of three Namaqualand pioneer plant species grown under saline soil conditions. *South Africa Journal of Botany*, 67: 354-357.

Dickie, J.B. & Pritchard, H.W. (2002). Systematic and evolutionary aspects of desiccation tolerance in seeds. In: Black, M. & Pritchard, H.W. (eds). *Desiccation and survival in plants, drying without dying*. CABI Publishing, Oxon, UK. 239-259.

Egan, T.P. & Ungar, I.A. (2000). Similarity between seed Banks and above-ground vegetation along a salinity gradient. *Journal of Vegetation Science*, 11: 189-194.

Ekstam, B., Johannesson, R. & Milberg, P. (1999). The effect of light and number of diurnal temperature fluctuations on germination of *Phragmites australis*. *Seed Science Research*, 9: 165-170.

Ellis, R.H. (1988). The viability equation, seed viability nomographs, and practical advice on seed storage. *Seed Science and Technology*, 16: 29-50.

Elsey-Quirk, T., Middleton, B.A. & Proffit, C.E. (2009). Seed flotation and germination of salt marsh plants. The effects of stratification, salinity and/or inundation regime. *Aquatic Botany*, 91: 40-46.

Engloner, A.I. (2009). Structure, growth dynamics and biomass of reed (*Phragmites australis*) – A review. *Flora* 204: 331-346.

European Commission (2002). Towards a strategy for soil protection. COM (2002) 179 final. Brussels. 39 pp.

FAO/IPGRI, (1994). Genebank standards. Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Plant Genetic Resources Institute, Rome.

Fausey, B. A., Heins, R. D. & Cameron, C. (2005). Daily light integral affects flowering and quality of greenhouse-grown *Achillea*, *Gaura*, and *Lavandula*. *HortScience*, 40: 114-118.

Fernández, F.G., Caro, M. & Cerda, A. (1981). Interacción salinidad-fertilización nitrogenada en el cultivo del pimiento (*Capsicum annuum*). *Anales de Edafología y Agobiología*, Madrid, 40: 9-10.

Fernández, J.A., Balenzategui, L., Bañón, S., González, A. & Nicola, S. (2004). Paclobutrazol and water stress induce morphological adaptation in *Phillyrea angustifolia* during hardening. *Acta Horticulturae*, 659: 245-251.

Font-Quer, P. (2001). *Diccionario de botánica*. 2ª edición. Eds. Península. 1244 pp.

Franco, J.A., González, A., Bañón, S. & Fernández, J.A. (1999). Nursery irrigation effects on postplanting root development of two mediterranean species in semiarid conditions. *HortScience*, 34: 487.

Franco, J.A., Bañón, S., Fernández, J.A. & Leskovar, D.I. (2001). Effect of nursery regimes and establishment irrigation on root development of *Lotus creticus* seedlings following transplanting. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 76: 174-179.

Franco, J.A., Cros, V., Bañón, S., González, A. & Abrisqueta, J.M. (2002a). Effects of nursery irrigation on postplanting root dynamics of *Lotus creticus* in semiarid field conditions. *HortScience*, 37: 525-528.

Franco, J.A., Cros, V., Bañón, S. & Martínez-Sánchez, J.J. (2002b). Nursery irrigation regimes and establishment irrigation affect the postplanting growth of *Limonium cossonianum* in semiarid conditions. *Israel Journal of Plant Sciences*, 50: 25-32.

Franco, J.A. & Leskovar, D.I. (2002). Root dynamics of muskmelon transplants as affected by nursery irrigation. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127: 337-342.

Frison, E.A. & Jackson, G.V.H. (1995). Plant health and germplasm collectors. Collecting Plant Genetic Diversity. In: Guarino, L., Ramanantha-Rao, V. & Reid, R. (eds). Collecting Plant Genetic Diversity. Technical guidelines. CABI. Wallingford, Oxon. UK. 378 pp.

Fu, J.R., Xia, Q.H. & Tang, L.F. (1993). Effects of desiccation on excised embryonic axis of three recalcitrant seeds and studies on cryopreservation. *Seed Science and Technology*, 21: 85-95.

Gilman, E.F. (2001). Effect of nursery production method, irrigation, and inoculation with mycorrhizae-forming fungi on establishment of *Quercus virginiana*. *Journal of Arboriculture*, 27: 30-38.

Goicoechea, N., Merino, S. & Sánchez-Díaz, M. (2004). Management of phosphorous and nitrogen fertilization to optimize *Anthyllis-Glomus-Rhizobium* symbiosis for revegetation of desertified semiarid areas. *Journal of Plant Nutrition*, 27: 1395-1413.

González-Benito, M.E. (1998). Cryopreservation as a tool for preserving genetic variability: its use with Spanish wild species with possible landscaping value. *Acta Horticulturae*, 457: 133-142.

Gorian, F. (2001). La lavorazione di sementi di alberi e arbusti. In: Piotta B. & Di Noi A. (eds). Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea. ANPA, Roma. 265 pp.

Greenwood, M.E. & MacFarlane, G.R. (2006). Effects of salinity and temperature on the germination of *Phragmites australis*, *Juncus kraussii* and *Juncus acutus*: Implications for estuarine restoration initiatives. *Wetlands*, 26 (3): 854-861.

Grupo de Gran Canaria. (2006). Gran Canaria Declaration on Climate Change and Plant Conservation. Cabildo de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

Gul, B. & Weber, D.J. (1999). Effect of salinity, light, and thermoperiod on the seed germination of *Allenrolfea occidentalis*. *Canadian Journal of Botany*, 77: 1-7.

Gulzar, S. & Khan, M.A. (2001). Seed germination of a halophytic grass *Aeluropus lagopide*. *Annals of Botany*, 87: 319-324.

Gulzar, S., Khan, M.A. & Ungar, I.A. (2001). Effect of salinity and temperature on the germination of *Urochondra setulosa* (Trin.) C.E. Hubbard. *Seed Science & Technology*, 29: 21-29.

Guma, I.R., Padrón-Mederos, M.A., Santos-Guerra, A. & Reyes-Betancort, J.A. (2010). Effect of temperature and salinity on germination of *Salsola vermiculata* L. (Chenopodiaceae) from Canary Islands. *Journal of Arid Environments*, 1: 4 pp.

Gutterman, Y. (1992). Maternal effects on seeds during development. In: Fenner, M. (Ed.), *Seeds. The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. CAB International, Wallingford. 27-59.

Harris, G.L., Hodgkinson, R.A., Scott, M., Mason, D.J. & Pepper, T.J. (1997). Impact of hardy ornamental nursery stock (HONS) systems on the environment: losses of nutrients and agrochemicals. *Agricultural Water Management*, 34: 95-110.

Heiskanen, J. (2004). Effects of pre- and post-planting shading on growth of container Norway spruce seedlings. *New Forest*, 27: 101-114.

Herranz, J.M., Ferrandis, P., Copete, M.A. & Martínez-Sánchez, J.J. (2002). Influencia de la temperatura de incubación sobre la germinación de 23 endemismos vegetales ibéricos o iberoafricanos. *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales*, 17(2): 229-245.

Herranz, J.M., Ferrandis, P., Copete, M.A. & Martínez-Sánchez, J.J. (2004). Germinación de tres halófitos amenazados en Castilla-La Mancha en condiciones de estrés salino. *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales*, 13(2): 357-367.

Hirano, T., Godo, T., Mii, M. & Ishikawa, K. (2005). Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Reports*, 23: 534-539.

Hong, T.D., Linington, S. & Ellis, R.H. (1998). Compendium of information on seed storage behaviour, I: A-H. Royal Botanic Gardens, Kew. 400 pp.

Huang, Z. & Gutterman, Y. (1999). Water absorption by mucilaginous achenes of *Artemisia monosperma*: Floating and germination as affected by salt concentrations. *Israel Journal of Plant Sciences*, 47 (1): 27-34.

Iglesias, M.I., Sainz, M.J., López Mosquera, M.E., Vilariño, A., Pintos, C. & Mansilla, J.P. (2004). Mineral nutrition of *Taxus baccata* L. as affected by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. *Acta Horticulturae*, 630: 225-229.

ISTA (2004). International rules for seed testing. Edition 2004. The International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, CH-Switzerland. 89 pp.

Ivorra, A. (2010). Almerinatura. <http://www.almerinatura.com/joyas/limonium-insigne.html>.

Jackson, L.L.N., Lopukine, N. & Hillyard, D. (1995). Ecological restoration: a definition and comments. *Restoration Ecology*, 3:71-75.

Keiffer, C.W. & I.A. Ungar (1997). The effect of extended exposure to hypersaline conditions on the germination of five inland halophyte species. *American Journal of Botany*, 84: 104-111.

Kellog, C.H., Bridgham, S.D. & Leicht, S.A. (2003). Effects of water level, shade and time on germination and growth of freshwater marsh plants along a simulated successional gradient. *Journal of Ecology*, 91: 274-282.

Khan, M.A., Gul, B. & Darrell, D.J. (2000). Germination response of *Salicornia rubra* to temperature and salinity. *Journal of Arid Enviroments*, 45: 207-214.

Khan, M.A., Gul, B. & Weber, D.J. (2002). Seed germination in the great basin halophyte *Salsola iberica*. *Canadian Journal of Botany*, 80: 650-655.

Khan, M.A. & Gulzar S. (2003). Germination responses of *Sporobolus iocados*; a potential forage grass. *Journal of Arid Environment*, 53: 387-394.

Khan, M.A. & Qaiser, M. (2006). Halophytes of Pakistan: Characteristics distribution and potential economic usages. Department of Botany, University of Karachi. 129 pp.

Khan, M.A. & Ungar I.A. (1997). Effects of light, salinity, and thermoperiod on the seed germination of halophytes. *Canadian Journal of Botany*, 75: 835-841.

Koo, B., Pardey, P. & Wright, B. (2004). Saving seeds. IPGRI and IFPRI. CABI Publishing, Wallingford, UK. 209-217 pp.

Kotzen, B. (2004). Plant use in desert climates — looking forward to sustainable planting in the Negev and other world deserts. *Acta Horticulturae*, 643: 39-49.

Lee, T.D. (1988). Patterns of fruit and seed production. In: Lovett Doust J. & Lovett Doust L. (eds). *Plant reproductive ecology: patterns and strategies*. Oxford University Press, New York. 179-202.

Leskovar, D.I. (1998). Root and shoot modification by irrigation. *HortTechnology*, 8: 510-514.

Lahiri, A.N. & Kharabanda, B.C. (1961). Dimorphic seeds in some arid zone grasses and the significance of growth differences in their seedlings. *Science and Culture*, 27(9): 448-450.

Li, Y. (2008). Effect of salt stress on seed germination and seedling growth of three salinity plants. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(9): 1268-1272.

Li, R., Shi, F. & Fukuda, K. (2010). Interactive effects of various salt and alkali stresses on growth organic solutes, and cation accumulation in a halophyte *Spartina alterniflora* (Poaceae). *Environmental and Experimental Botany*, 68: 66-74.

Linderman, R.G. & Davis, E.A. (2003). Arbuscular mycorrhiza and growth responses of several ornamental plants grown in soilless peat-based medium amended with coconut dust (coir). *HortTechnology*, 13: 482-487.

Liptay, A., Sikkema, P. & Fonteno, W. (1998). Transplant growth control through water deficit stress — A review. *HortTechnology*, 8: 540-543.

MARM (2011). Conceptos básicos sobre el Cambio Climático. <http://www.marm.es/es/cambio-climatico/temas/que-es-el-cambio-climatico-y-como-nos-afecta/default.aspx>.

Maroder, H.L., Prego, I.A., Facciuto, G.R. & Maldonado, S.B. (2000). Storage behaviour of *Salix alba* and *Salix matsudana* seeds. *Annals of Botany*, 86: 1017-1021.

Martin, C.A. & Ruter, J.M. (1996). Growth and foliar nutrient concentrations of crape myrtle in response to disparate climate and fertilizer placement in large nursery containers. *Journal of Environmental Horticulture*, 14: 9-12.

Martin, T.P., Harris, J.R., Eaton, G.K. & Miller, O.K. (2003). The efficacy of ectomycorrhizal colonization of pin and scarlet oak in nursery production. *Journal of Environmental Horticulture*, 21: 45-50.

Martínez-Rodríguez, M.M., Estaño, M.T., Moyano, E., García-Albellan, J.O., Flores, F.B., Campos, J.F., Al-Azzawi, M.J., Flower, T.J. & Bolarín, M.C. (2008). The effectiveness of grafting to improve salt tolerance in tomato when an “excluder” genotype is used as scion. *Environmental and Experimental Botany*, 63: 392-401.

Martínez-Sánchez, J.J., Conesa, E., Vicente, M.J., Jiménez, A. & Franco, J.A. (2006). Germination responses of *Juncus acutus* (Juncaceae) and *Schoenus nigricans* (Cyperaceae) to Light and temperature. *Journal of Arid Environments*, 66(1): 187-191.

Martínez-Sánchez, J.J., J.A. Franco, M. J. Vicente, M. Muñoz, S. Bañón, E. Conesa, J. A. Fernández, R. Valdés, J. Miralles, J. Ochoa, M. Aguado, J. Esteva, J. López & L. Aznar (2008). Especies silvestres mediterráneas con valor ornamental. Selección, producción viverística y utilización en jardinería. Dirección General de Patrimonio Natural y Biodiversidad. Consejería de Agricultura y Agua. Región de Murcia. 224pp.

Marzalina, M. & Krishnapillay, B. (1999). Recalcitrant seed biotechnology applications to rain forest conservation. In: Benson, E.E. (ed). *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor & Francis, Ltd. 265-274.

Meyer, M. H. & Cunliffe, B. A. (2004). Effects of media porosity and container size on overwintering and growth of ornamental grasses. *HortScience*, 39: 248-250.

Morales, M.A., Olmos, E., Torrecillas, A., Sánchez-Blanco, M.J. & Alarcón, J.J. (2001). Differences in water relations, leaf ion accumulation and excretion rates between cultivated and wild species of *Limonium* sp. grown in conditions of saline stress. *Flora*, 196: 345-352.

Navidoo, G. (1994). Growth, water and ion relationship in the coastal halophytes *Triglochin bulbosa* and *Triglochin striata*. *Environmental and Experimental Botany*, 34: 419-426.

Nedjimi, B. (2009). Salt tolerance strategies of *Lygeum spartum* L.: A new fodder crop for Algerian saline steppes. *Flora*, 204: 747-754.

Noe, G.B. & Zedler, J.B. (2000). Differential effects of four abiotic factors on the germination of salt marsh annuals. *American Journal of Botany* 87: 1679-1692.

Nonogaki, H., Bassel, G.W. & Derek Bewley, J. (2010). Germination-Still a mystery. *Plant Science*. 8 pp.

ONU. 1994. Elaboración de una convención internacional de lucha contra la desertificación en los países afectados por sequía grave o desertificación, en particular en África. Asamblea General Naciones Unidas. 66 pp.

Orlovsky, N. S., Japakova, U. N., Shulgina, I. & Volis, S. (2011). Comparative study of seed germination and growth of *Kochia prostrata* and *Kochia scoparia* (Chenopodiaceae) under salinity. *Journal of Arid Environments*, 75: 532-537.

Pangua, E., Belmonte, R. & Pajarón, S. (2009). Germination and reproductive biology in salty conditions of *Asplenium marinum* (Aspleniaceae), a European coastal fern. *Flora*, 204 (9): 673-684.

Pence, V.C. (1999). The application of biotechnology for the conservation of endangered plants. In: Benson E.E. (ed). *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor & Francis, Ltd. 227-250

Pérez-García, F., González-Benito, M.E. & Gómez-Campo, C. (2007). High viability recorded in ultra dry seeds of 37 species of Brassicaceae after almost 40 years of storage. *Seed Science and Technology*, 35: 143-153.

Pérez-García, F., González-Benito, M.E. & Gómez-Campo, C. (2008). Germination of fourteen endemic species from the Iberian Peninsula, Canary and Balearic Islands after 32-34 years of storage at low temperature and very low water content. *Seed Science and Technology*, 36(2): 407-422.

Pérez-García, F. & González-Benito, M.E. (2008). Seed cryopreservation of *Halimium* and *Helianthemum* species *CryoLetters*, 29(4): 271-276.

Perrino, P. & Terzi, M. (2003). Importanza della conservazione del germoplasma. In: Bressan, M., Magliaretta, L. & Pino, S. (eds). *Cereali del Veneto*. Regione Veneto/Prov. Di Vicenza/Veneto Agricoltura. 268 pp.

Piotto, B. & Di Noi, A. (2001). *Manuale ANPA. Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea*. ANPA, Roma. 212 pp.

Probert, R.J. (2003). Seed Viability under Ambient Conditions, and the Importance of Drying. In: Smith, R.D., Dickie, J.B., Linington, S.H., Pritchard, H.W & Probert, R.J. (eds). *Seed Conservation: turning science into practice*. Royal Botanic Gardens, Kew. 337-365 pp.

Pujol, J.A, Calvo, J.F. & Ramírez-Díaz, L. (2000). Recovery of germination from different osmotic conditions by four halophytes from southeastern Spain. *Annals of Botany*, 85: 279-286.

Ramoliya, P.J. & Pandey, A.N. (2003). Effect of salinization of soil on emergence, growth and survival of seedlings of *Cordia rothii*. *Forest Ecology and Management*, 176: 185-194.

Redondo-Gómez, S., Rubio-Casal, A.E., Castillo, J.M., Luque, C.J., Álvarez, A.A., Luque, T. & Figueroa, M.E. (2004). Influences of salinity and light on germination of three *Sarcocornia* taxa with contrasted habitats. *Aquatic Botany*, 78: 255-264.

Redondo-Gómez, S., Mateos Naranjo, E., Garzón, O., Castillo, J.M., Luque, T., Figueroa, M.E. (2008) Effects of salinity on germination and seedling establishment of endangered *Limonium emarginatum* (Wiid.) O. Kuntze. *Journal of Coastal Research*, 24(1A): 201-205

Richardson-Calfee, L.E., Day, J.W., Witte, W.T. & Fare, D. C. (2001). Effects of extended photoperiod and light quality on growth of *Carpinus caroliniana*, *Fagus grandifolia* and *Gymnocladus dioica* seedlings. *Journal of Environmental Horticulture*, 19: 171- 174.

Rikala, R., Heiskanen, J. & Lahti, M. (2004). Autumn fertilization in the nursery affects growth of *Picea abies* container seedlings after transplanting. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 19: 409-414.

Rivas-Martínez, S. & Rivas-Sáenz, S. (1996-2009). Sistema de Clasificación Bioclimática Mundial. Centro de Investigaciones Fitosociológicas, España. <http://www.ucm.es/info/cif>.

Rodríguez-Pérez, J.A., Fernández-Falcón, M. & Socorro-Monzón, A.R. (2000). The effect of salinity on growth and nutrition of *Protea obtusifolia*. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 75: 97-104.

Rubio-Casal, A.E., Castillo, J.M., Luque, C.J. & Figueroa, M.E. (2003). Influence of salinity on germination and seeds viability of two primary colonizers of Mediterranean Salt pans. *Journal of Arid Environments*, 53(2): 145-154.

Ruter, J.M. (1994). Growth and landscape establishment of *Pyracantha* and *Juniperus* after application of paclobutrazol. *HortScience*, 29: 1318-1320.

Salazar C. & Lendínez, M.L. (2009). *Limonium* Mill. En: G. Blanca, B. Cabezudo, M. Cueto, C. Fernández López & C. Morales Torres (eds.), *Flora Vascular de Andalucía Oriental*. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla, 2: 218-225.

Sánchez-Blanco, M.J., Morales, M.A., Torrecillas, A. & Alarcón, J.J. (1998). Diurnal and seasonal osmotic potential changes in *Lotus creticus* plants grown under saline stress. *Plant Science*, 136: 1-10.

Sánchez-Blanco, M.J., Ferrández, T., Navarro, A., Bañón, S. & Alarcón, J.J. (2004). Effects of irrigation and air humidity preconditioning on water relations, growth and survival of *Rosmarinus officinalis* plants during and after transplanting. *Journal of Plant*

Physiology, 161: 1133-1142.

Shannon, M.C. (1984). Breeding, selection and the genetics of Salt tolerance. In: Staples, R.C (Ed), Salinity tolerance in plant: strategies for crop improvement. Ohn Wiley & Sons, New York. 231-254 pp.

Shannon, M.C. & Grieve, C.M. (1999). Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulturae*, 78: 5-38.

Savé, R., Estaun, V. & Biel, C. (1994). Water relations and fungal activity of arbuscular mycorrhizal *Rosmarinus officinalis* L. plants submitted to a cycle of drying/rewatering. 4th European Symposium of Mycorrhizas, Granada, España. 472-475.

Society of Ecological Restoration (2004). Principios de SER International sobre la Restauración Ecológica. <http://www.ser.org/content/spanishprimer.asp>.

Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. (1986). Introducción a la bioestadística. Ed: Reverté. Barcelona. 362 pp.

Solé-Benet, A. & Cantón-Castilla, Y. (2005). Mejora de suelos salinos y control de la erosión en zonas áridas. CSIC. 1-23 pp.

Song, J., Fan, H., Zhao, Y., Jia, Y., Du, X. & Wang, B. (2008). Effect of salinity on germination, seedling emergence, seedling growth and ion accumulation of a euhalophyte *Suaeda salsa* in an intertidal zone and on saline inland. *Aquatic Botany*, 88: 331-337.

Suszka, B., Muller, C. & Bonnet-Masimbert, M. (1994). Graines des feuillus forestiers, de la recolte au semis. INRA Editions, Paris. 332 pp.

Suszka, B., Chmielarz, P. & Walkenhorst, R. (2005). How long can seeds of Norway spruce *Picea abies* L. Karst. be stored? *Annals of Forest Science*, 62: 73-78.

Tobe, K., Zhang, L., Yu Qiu, G., Shimizu, H. & Omasa, K. (2001). Characteristics of seeds germination in five non-halophytic Chinese desert shrub species. *Journal of Arid Environments*, 47(2): 191-201.

Thompson, K. (1986). Small-scale heterogeneity in the seed banks of an acidic grassland. *Journal of Ecology*, 74: 733-738.

Tingery, D.T. (1980). Stress ethylene production. A measure of plant response to stress. *HortScience*, 15(5): 630-633.

Toole, V.K., Bailey, W.K. & Toole, E.H. (1964). Factors influencing dormancy of peanut seeds. *Plant Physiology*, 39(5): 768-772.

Tukey, J.W. (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*, 5, 99-114.

- Ungar, I.A. (1977). Salinity, temperature, and growth regulator effects on seed germination of *Salicornia europaea* L. *Aquat Bot*, 3, 329-335.
- Ungar, I.A. (1982). Germination ecology of halophytes. In *Contribution to the ecology of halophytes*, (Eds.): D.N. Sen and K.S. Rajpurohit. Hague: Junk Publishers. pp. 143-154.
- Ungar, I.A. (1987). Population ecology in halophyte seed. *Botanical Review*, 53: 301–334.
- Ungar, I.A. (1995). Seed germination and seed-bank ecology in halophytes. In *Seed development and germination*. Edited by J. Kigel and G. Galili. Marcel Dekker, New York, 18: 529–544.
- Ungar, I.A. (1996). Effect of salinity on seed germination, growth, and ion accumulation of *Atriplex patula* (chenopodiaceae). *American Journal of Botany*, 83 (5): 604-607.
- Van Den Driessche, R. (1991a). Influence of container nursery regimes on drought resistance of seedling following planting. I. Survival and growth. *Canadian Journal of Forest Research*, 21: 555-565.
- Van Den Driessche, R. (1991b). Influence of container nursery regimes on drought resistance of seedling following planting. II. Stomatal conductance, specific leaf area, and root growth capacity. *Canadian Journal of Forest Research*, 21: 566-572.
- Van Den Driessche, R. (1996). Drought resistance and water use efficiency of conifer seedlings treated with paclobutrazol. *New Forests*, 11: 65-83.
- Vicente, O., Boscaiu, M., Naranjo, M.A., Estrelles, E., Bellés, J.M. & Soriano, P. (2004). Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). *Journal of Arid Enviroments*, 58: 463-481.
- Vicente, M.J., Conesa, E., Álvarez-Rogel, J., Franco, J.A. & Martínez-Sánchez, J.J. (2007). Effects of various salts on the germination of three perennial salt marsh species. *Aquatic Botany*, 87: 167-170.
- Vicente, M.J., Conesa, E., Álvarez-Rogel, J., Franco, J.A. & Martínez-Sánchez, J.J. (2009). Relationships Between Salt Type and Seed Germination in Three plant Species Growing in Salt Marsh Soils of Semi-Arid Mediterranean Environments. *Arid Land Research and Management*, 23: 103-114.
- Vilagrosa, A., Cortina, J., Gil-Pelegrín, E. & Bellot, J. (2003). Suitability of drought-preconditioning techniques in Mediterranean climate. *Restoration Ecology*, 11: 208-216.

Watson, G. W. (2001). Soil applied paclobutrazol affects root growth, shoot growth, and water potential of American elm seedlings. *Journal of Environmental Horticulture*, 19: 119-122.

Wei, Y., Dong, M., Huang, Z.Y., & Tan, D.Y. (2008). Factor influencing seed germination of *Salsola affinis* (Chenopodiaceae), a dominant annual halophyte inhabiting the deserts of Xinjiang, China. *Flora*, 203(2): 134-140.

Williams, M.D. & Ungar, I.A. (1972). Effects of environmental parameters on the germination, growth, and development of *Suaeda depressa*. *American Journal of Botany*, 59: 912-918.

Witt, S. (1985). *Biotechnology and Genetic Diversity*. California Agricultural Lands Project, San Francisco. 145pp.

Woodel, S.R.J. (1985). Salinity and seed germination patterns in coastal plants. *Vegetation*, 61: 223-229.

Wullschleger, S. D., Tschaplinski, T. J. & Norby, J. R. (2002). Plant water relations at elevated CO₂. Implications for water-limited environments. *Plant Cell and Environment*, 25: 319-333.

Yeager, T. H. & Henley, R. W. (2004). Irrigation and fertilization for minimal environmental impact. *Acta Horticulturae*, 638: 233-240.

Zia, S. & Khan M.A. (2004). Effect of light, salinity and temperature on seed germination of *Limonium stocksii*. *NRC Research Press*, 82: 151-157.

Zia, S. & Khan M.A. (2008). Seed germination of *Limonium stocksii* under saline conditions. *Pakistan Journal Botany*, 40(2): 683-695.

Zhu, J.K. (2001). Plant salt tolerance. *Plant Science*, 6: 2.