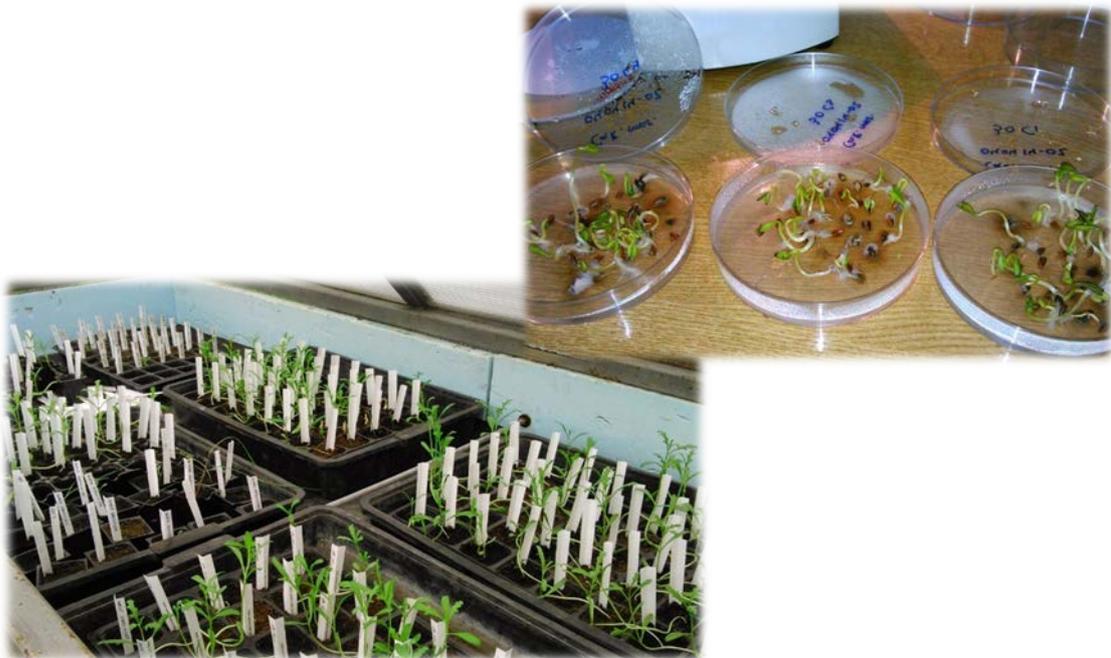




Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

RESTAURACIÓN ECOLÓGICA DE SISTEMAS DUNARES: BIOLOGÍA DE SEMILLAS Y DESARROLLO DE PROTOCOLOS DE CULTIVO



Adrián Pérez Arcoiza

10 de Junio de 2015

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

RESTAURACIÓN ECOLÓGICA DE SISTEMAS DUNARES:
BIOLOGÍA DE SEMILLAS Y DESARROLLO DE PROTOCOLOS DE
CULTIVO

ECOLOGICAL RESTORATION OF COASTAL DUNES: SEED
BIOLOGY AND DEVELOPMENT OF CULTURE PROTOCOLS

Adrián Pérez Arcoiza

Firma

Eduardo Fernández Pascual

Tomás Emilio Díaz González

Firma

Firma

Resumen:

En Asturias, los ecosistemas dunares se encuentran en retroceso debido al pequeño espacio que ocupan en el litoral abrupto, a la presión antrópica y a los eventos climáticos extremos. Se hacen necesarias unas prácticas de restauración *in situ* que garanticen la conservación estructural y genética de las comunidades vegetales de duna. Para ello, hacen falta estudios previos sobre la biología de semillas y las necesidades de cultivo de las especies de duna.

Se han estudiado 15 taxones indicadores de dunas embrionarias, dunas móviles y dunas fijas. Se han realizado pruebas de germinación para caracterizar la dormición y la temperatura de germinación. Posteriormente, se ha analizado la supervivencia en vivero de las plántulas germinadas.

A partir de los resultados obtenidos, se ha podido concluir que la mayoría de especies tanto de dunas móviles como fijas siguen una estrategia de germinación oportunista germinando masivamente con temperaturas de otoño o invierno para reducir el estrés hídrico. Algunas especies presentan dormición fisiológica y germinarían en verano, lo que hace necesario un tratamiento previo a la siembra. Sin embargo, las diferentes tolerancias del paso de agar a sustrato por parte de las plántulas, hacen necesaria una compleja tarea de restauración que tenga en cuenta los requerimientos de cada taxón.

Abstract:

In Asturias, coastal dune ecosystems are in decline due to the small space they occupy in the rugged coastline, anthropic pressure and extreme climatic events. *In situ* restoration is needed to ensure structural and genetic conservation of plant communities. To that end, preliminary studies on seed biology and plant culture of dune species are needed.

Fifteen indicator species of embryonic dunes, shifting dunes and stable dunes were studied. Germination tests were conducted to characterize seed dormancy and germination temperature. Subsequent seedling survival was recorded in nursery conditions.

From the results, it has been concluded that the majority of species from both shifting and stable dunes follow an opportunistic strategy, germinating massively under autumn or winter temperatures, in order to reduce water stress. In some species, seeds have physiological dormancy and would germinate in spring or summer, thus requiring a pre sowing treatment. Nevertheless, different seedling tolerances to the transfer from agar to substrate make restoration a complex task, which requires considering the specific requirements of each taxon.

Agradecimientos

Este trabajo se ha podido llevar a cabo gracias a la colaboración con el Proyecto LIFE+ ARCOS financiado por la Comisión Europea (<http://www.arcoslife.eu/arcosweb/>), cuyo objetivo es la conservación de los sistemas dunares en 10 Lugares de Importancia Comunitaria (LICs) distribuidos en Asturias, Cantabria y País Vasco.

Es el fruto de varios meses de esfuerzo personal y colaboración con varias personas a las que quiero dar mi más sincera gratitud.

En primer lugar a mi tutor, Eduardo por ayudarme en todas las dudas que he tenido, por saber guiarme y darme pautas para la elaboración de este trabajo y sobre todo en el cálculo estadístico de los datos.

A todos mis compañeros del Jardín Botánico Atlántico de Gijón por ofrecerse en todo momento a ayudarme en la toma de datos en el Banco de Germoplasma y por hacer muchísimo más ameno el trabajo todos los días y en especial a Nuria que me ha enseñado muchos trucos en el día a día.

A Nacho y a Álvaro por ayudarme con las accesiones de cada una de las especies y por proporcionarme bibliografía de consulta y a Carlos Ley por su conferencia acerca de la restauración de sistemas dunares que me ha sido de gran utilidad.

A mi familia, a mis amigos, a mi hermana y a Fran, por su apoyo en todo momento y por escucharme siempre que necesitaba repasar este trabajo.

A todos vosotros, gracias.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento	2
1.3. Objetivos	3
2. Material y métodos	4
2.1. Material de estudio	4
2.2. Ensayos de germinación	7
2.3. Protocolos de cultivo	8
2.4. Análisis estadístico	9
3. Resultados y discusión	9
3.1. Germinación de semillas	9
3.2. Supervivencia de plántulas	18
4. Conclusiones	20
5. Referencias bibliográficas	21

1. Introducción

1.1. Antecedentes

Históricamente, gran parte de los asentamientos humanos se han desarrollado a lo largo de la línea de costa debido a la orografía del terreno, a la fácil accesibilidad a los recursos y a unas condiciones climáticas y ambientales favorables. Sin embargo, en Asturias, la línea de costa se caracteriza por ser abrupta y presentar numerosos acantilados, lo que significa que los ecosistemas dunares no se encuentran muy representados. En la actualidad, el rápido crecimiento demográfico de la población, el cambio de uso de suelo de natural a urbanizable y el aumento exponencial del turismo, están determinando que las zonas más accesibles de la costa se encuentren amenazadas por las actividades humanas (Defeo, McLachlan et al. 2009). De este modo, los ecosistemas dunares y los hábitats costeros, son entornos altamente perturbados no solo por la actividad humana, sino también por los eventos climáticos extremos como los vientos y las mareas, que destruyen y erosionan gran parte de ellos (Feagin, Sherman et al. 2005). Estos hábitats se desarrollan en sustratos arenosos, cuyas partículas carecen de una gran cohesión que garantice la unidad del entorno, de manera que cuanto más aislados y deforestados se encuentran, más vulnerables son a la erosión eólica (Tsoar 2005). En los últimos tiempos, se han presenciado a lo largo de la costa cantábrica, y en particular en la costa asturiana, este tipo de fenómenos extremos que, a pesar de darse de forma puntual (meses invernales), han sido capaces de generar erosiones en distintas playas asturianas y retrocesos de frentes dunares, así como destrozos civiles en diques y mobiliario urbano que ha llegado a generar un gran gasto económico (Flor, Flor-Blanco et al. 2015).

Esta situación, provoca una pérdida sustancial de especies locales que viven en estos entornos, de manera que se pierde biodiversidad y se favorecen procesos de invasión por flora alóctona. Estas especies invasoras, son capaces de remodelar ciertas zonas de los ecosistemas dunares e instalarse en el medio llegando a poner en peligro a muchas especies autóctonas (Carboni, Santoro et al. 2010). Como consecuencia conjunta, estos ecosistemas se van degradando poco a poco, pierden riqueza biológica y van retrocediendo cada vez más hasta tener una pequeña representación en nuestras costas. Los sistemas dunares, por tanto, son ambientes extremadamente frágiles e inestables (Ciccarelli, Bacaro et al. 2012) que, al igual que la mayoría de los ecosistemas, se encuentran sujetos a procesos de remodelación y cambios estructurales debido a la influencia marina directa, que constantemente genera procesos de erosión (acantilados) y sedimentación (ambientes dunares). La gran dinámica geomorfológica y ecológica que presentan estos ambientes, propicia un entorno que favorece los procesos de especiación generando una gran biodiversidad. Es por eso que a lo largo de las últimas décadas, los ecosistemas dunares se han convertido en objeto de preocupación y se ha consolidado una concienciación social más fuerte acerca de su pérdida, de manera que la conservación de los mismos sea un objetivo a cumplir (Martínez, Maun et al. 2004). A su vez, el hecho de conservar estos entornos, genera una serie de beneficios que repercuten directa e indirectamente en el conjunto de la sociedad. De manera directa, se trabaja en la preservación de los hábitats que componen dichos ecosistemas con el fin de establecer protocolos de conservación

de las especies que los habitan. De forma indirecta, todas estas acciones, repercuten sobre el bienestar social, generando un valor añadido al entorno como puede ser la defensa frente a la invasión del agua de mar sobre intereses humanos, así como espacios de descanso que garanticen la salud humana (Assessment 2005).

Se han establecido medidas de conservación por parte de las instituciones, de manera que muchos de estos ecosistemas se encuentran actualmente incluidos en espacios protegidos dentro de la Red Natura 2000, que están sometidos a legislaciones a nivel europeo. Los Lugares de Importancia Comunitaria (LICs), son zonas de especial protección para la comunidad europea y surgen a partir de la Directiva Hábitats (92/43/CEE) con objetivos claros de conservación de determinados hábitats. Los ecosistemas costeros, han sido clasificados en distintos hábitats de interés comunitario, que se recogen dentro del Anexo I de la Directiva Hábitats de la Unión Europea (Directiva 92/43/CEE). De entre la lista de hábitats publicados, aparecen indicados con un asterisco aquellos que se consideran prioritarios en la Unión Europea. Cuatro de dichos hábitats son de especial interés para este trabajo: el “Hábitat 1210 Vegetación anual de arribazón”, el “Hábitat 2110 Dunas embrionarias”, el “Hábitat 2120 Dunas primarias con *Ammophila arenaria* (“dunas blancas”)” y el “Hábitat 2130* Dunas costeras fijas con vegetación herbácea (“dunas grises)””(Díaz González 2009).

Siguiendo otro tipo de criterios, también se han recogido mediante la Agencia Europea del Medio Ambiente en el Sistema de Información de la Naturaleza Europea (EUNIS) (Davies, Moss et al. 2004) (<http://eunis.eea.europa.eu/>), que cataloga a cada uno de los ecosistemas con un código y un nombre en función de sus características ambientales y de las comunidades vegetales que los habitan.

1.2. Planteamiento

Las comunidades vegetales de dunas costeras, se estructuran en un gradiente que va desde el límite del agua del mar hasta el interior, donde las condiciones ambientales varían drásticamente. Las presiones climáticas, ambientales y biológicas a las que se encuentran sometidas las especies varían considerablemente y hacen que estas se distribuyan a lo largo de dicho gradiente y mantengan distintas relaciones entre sí, así como diferentes estrategias de supervivencia (Grime 1977, Kim and Yu 2009). En primer lugar, el movimiento de las partículas de arena por efecto del viento, genera un estrés por abrasión constante sobre las especies que habitan en esta franja, a la vez que se recrea un ambiente relativamente inestable para ellas, siendo un factor importante en la distribución de las comunidades vegetales (Moreno-Casasola 1986). Las comunidades asociadas a los hábitats más estables hacia el interior, presentarían dinámicas más dependientes de las condiciones macro-climáticas (Jiménez-Alfaro, Marcenò et al. 2014).

El “Hábitat 1210 Vegetación anual de arribazón” representaría a las comunidades vegetales que habitan en la primera línea superior de playa, zona susceptible a los eventos climáticos extremos, donde la mayoría de las especies tienen un ciclo de vida anual o efímero y necesitan completarlo antes de que llegue el periodo desfavorable (Royo and Traveset 2009). Cabría esperar que las especies que habitan

estos entornos, tuviesen un nicho de regeneración mucho más amplio, siguiendo una estrategia oportunista. Lo mismo ocurriría en el “Hábitat 2110 Dunas embrionarias”.

En el “Hábitat 2120 Dunas primarias con *Ammophila arenaria* (dunas blancas)”, las especies que componen esta comunidad, están sujetas a las variaciones y al aporte y retirada de partículas de arena que realiza el viento. De hecho, en este primer cordón dunar, se asientan especies que se asocian al “barrón de playa” (*Ammophila arenaria*), la cual fija parte del sustrato y donde las condiciones de salinidad son menores que en la primera línea de playa pero el estrés hídrico sigue siendo el factor limitante. Las especies que habitan estos entornos, optarían por la estrategia de adaptación especialista de partes anatómicas para evitar la evapotranspiración (Díaz González, Fernández Prieto et al. 2002, Prieto 2009).

En el “Hábitat 2130* Dunas costeras fijas con vegetación herbácea (dunas grises)”, las especies que componen dicho ambiente más estabilizado se encuentran con unas mejores condiciones ambientales, ya que la salinidad aquí es menor y la fijación del sustrato por parte de la vegetación retiene más cantidad de agua (Prieto and Reinoso 2009). De esta manera, cabría esperar que las especies que habitan estos entornos, adopten una estrategia generalista, ya que las condiciones ambientales no son tan duras. Esta vegetación y su regeneración estarían más acopladas a las condiciones macro-climáticas de la costa asturiana (Jiménez-Alfaro, Marcenò et al. 2014)

De manera general, se ha tenido en cuenta esta dinámica para la conservación y restauración de sistemas dunares (de Seoane, Fernández et al. 2007), ya que no todas las especies que habitan estos entornos necesitan los mismos requerimientos fisiológicos y ecológicos. Es importante conocer las relaciones que estos distintos hábitats mantienen entre sí en un espacio tan pequeño como puede ser el gradiente de las playas costa-interior y establecer una serie de protocolos a seguir para la gestión sostenible de estos ecosistemas (Navarro-Pons, Román-Sierra et al. 2010)

1.3. Objetivos

Con el objeto de restaurar los diferentes hábitats costeros de interés comunitario, son necesarios unos conocimientos previos sobre la ecología de semillas de las especies que los habitan, así como unas bases científicas que ayuden a introducir adecuadamente las poblaciones vegetales características de estos ecosistemas (de Seoane, Fernández et al. 2007, Bacchetta, Fenu et al. 2008). Este trabajo presenta dos objetivos definidos. En primer lugar, se trata de conocer la biología de las semillas de especies que viven en estas comunidades dunares, de manera que se genere conocimiento sobre los requisitos ecológicos (dormición, temperatura de germinación) que requieren ciertas especies para su germinación. En segundo lugar, desarrollar unos protocolos de cultivo para dichas especies, que puedan garantizar la supervivencia de las mismas con el fin de poder restaurar estos ecosistemas dunares.

En base a los conocimientos previos sobre las dinámicas que sufren las comunidades vegetales de dunas y las interacciones que presentan unas con otras, el objetivo final es relacionar los datos obtenidos y poder asignar a cada especie unas características óptimas de germinación y de crecimiento en función de las estrategias

que presenta. De manera general, esto puede ayudar a conocer y mejorar los protocolos de restauración a seguir en los ambientes dunares.

2. Material y métodos

2.1. Material de estudio

Para la elaboración de este estudio, se han utilizado semillas de 15 especies de ecosistemas dunares, las cuales han sido recolectadas entre julio y septiembre en distintas playas del litoral cantábrico.

Las especies utilizadas, siguiendo la nomenclatura del proyecto “*Flora iberica*” y según “*Anthos*” (<http://www.anthos.es/>) han sido: *Beta maritima* (Playa de Peñarronda, Asturias), *Cakile maritima* (Playa de Peñarronda, Asturias), *Calystegia soldanella* (Playa de Verdicio, Asturias), *Carex arenaria* (Playa de La Vega, Asturias), *Crucianella maritima* (Sistema dunar de Somo, Cantabria), *Eryngium maritimum* (Playa de Verdicio, Asturias), *Festuca rubra* var. *littoralis* (Playa de Peñarronda, Asturias), *Glaucium flavum* (Playa de Verdicio, Asturias), *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* (Pontevedra), *Helichrysum stoechas* (Playa de La Vega, Asturias), *Malcolmia littorea* (Playa de Peñarronda, Asturias), *Otanthus maritimus* (Playa de Verdicio, Asturias), *Pancratium maritimum* (Playa de Verdicio, Asturias), *Polygonum maritimum* (Playa de Rodiles, Asturias), *Reichardia gaditana* (Playa de Verdicio, Asturias). De esta última se han recolectado dos tipos de semillas, internas y externas. Todos los taxones fueron recolectados en 2014, salvo *Helichrysum stoechas* y *Polygonum maritimum*, que fueron recogidos en 2012.

Una vez recolectadas, se ha asignado un código diferente a cada una de las especies y se han registrado en la base de datos *Babilonia* (<http://www.aimjb.net/babilonia/>) para poder guardar la información asociada a cada uno de los taxones, como la localidad y fecha de recogida y la ecología de los mismos (Tabla 2.1).

Tras diferenciar cada accesión con un código, se limpiaron todas las semillas para garantizar la pureza de cada uno de los taxones a la hora de conservarlo en el Banco de Germoplasma del Jardín Botánico Atlántico (BG-JBA); así como para poder realizar correctamente las pruebas de germinación de cada uno.

Tabla 2.1. Información asociada a cada uno de los 15 taxones a estudiar. Código de accesión en la base de datos, la familia, la forma de vida, el hábitat preferente asociado al código EUNIS y al Anexo I de la Directiva Hábitats. Fuente: (Díaz González, Fernández Prieto et al. 2002, Davies, Moss et al. 2004, Fernández Prieto, Rodríguez et al. 2014)

Taxón	Código de Accesión	Familia	Forma de vida
<i>Beta maritima</i> L.	040914-03	Amaranthaceae	Hemicriptófito escaposo Halonitrófila
<i>Cakile maritima</i> Scop.	040914-02	Brassicaceae	Terófito erecto Halonitrófila
<i>Calystegia soldanella</i> (L.) R.Br.	280714-01	Convolvulaceae	Geófito con rizoma
<i>Carex arenaria</i> L.	240714-01	Cyperaceae	Geófito con rizoma
<i>Crucianella maritima</i> L.	D-2465-02- S	Rubiaceae	Caméfito sufrutescente
<i>Eryngium maritimum</i> L.	030914-02	Apiaceae	Geófito con rizoma
<i>Festuca rubra</i> var. <i>littoralis</i> Vasey ex Beal.	040914-04	Poaceae	Hemicriptófito cespitoso
<i>Glaucium flavum</i> Crantz.	030914-01	Papaveraceae	Hemicriptófito escaposo
<i>Helichrysum italicum</i> subsp. <i>picardii</i> Franco.	D-2465-01- S	Asteraceae	Caméfito sufrutescente
<i>Helichrysum stoechas</i> (L.) Moench.	180712-16	Asteraceae	Caméfito sufrutescente
<i>Malcolmia littorea</i> (L.) R.Br.	040914-01	Brassicaceae	Caméfito sufrutescente
<i>Otanthus maritimus</i> (L.) Hoffmanns. & Link.	030914-03	Asteraceae	Caméfito sufrutescente
<i>Pancratium maritimum</i> L.	030914-05	Amaryllidaceae	Geófito con bulbo
<i>Polygonum maritimum</i> L.	180712-14	Polygonaceae	Caméfito decumbente
<i>Reichardia gaditana</i> (Willk.) Samp.	280714-04	Asteraceae	Terófito erecto

Tabla 2.1. Continuación.

Taxón	Hábitat preferente	Código EUNIS	Anexo I Directiva Hábitats
<i>Beta maritima</i>	Vegetación efímera de arribazón	B1.1 / B2.12	1210
<i>Cakile maritima</i>	Vegetación efímera de arribazón	B1.1 / B2.12	1210
<i>Calystegia soldanella</i>	Dunas embrionarias/ Dunas móviles	B1.31 / B1.32	2110/2120
<i>Carex arenaria</i>	Dunas móviles	B1.32	2120
<i>Crucianella maritima</i> L.	Dunas fijas	B1.4	2130*
<i>Eryngium maritimum</i>	Dunas embrionarias/ Dunas móviles	B1.31 / B1.32	2110/2120
<i>Festuca rubra</i> var. <i>littoralis</i>	Dunas móviles	B1.32	2120
<i>Glaucium flavum</i>	Vegetación efímera de arribazón	B1.1 / B2.12	1210
<i>Helichrysum italicum</i> subsp. <i>picardii</i>	Dunas fijas	B1.4	2130*
<i>Helichrysum stoechas</i>	Dunas fijas	B1.4	2130*
<i>Malcolmia littorea</i>	Dunas fijas	B1.4	2130*
<i>Otanthus maritimus</i>	Dunas móviles	B1.32	2120
<i>Pancratium maritimum</i>	Dunas móviles	B1.32	2120
<i>Polygonum maritimum</i>	Vegetación efímera de arribazón	B1.1 / B2.12	1210
<i>Reichardia gaditana</i>	Dunas fijas	B1.4	2130*

2.2. Ensayos de germinación

En primer lugar, se realizó la preparación del medio de cultivo basado en agar y agua destilada a una concentración del 1%, es decir, se prepararon 10 g de agar *Liofilchem*® (Ref. 611001) especial para medios de cultivo en 1L de agua destilada. Para ello, se disolvió el agar en agua y se mantuvo en agitación a 500 r.p.m. durante 5 minutos. Pasado ese tiempo, se calentó en el microondas a máxima potencia en intervalos de 3 minutos hasta comprobar que la mezcla era transparente. Posteriormente, se echó en cada una de las placas de Petri en donde quedaría solidificado y se esperó hasta que estuviese lo suficientemente frío. Este medio de cultivo proporciona el sustrato y la humedad suficientes para facilitar la germinación de las semillas.

Una vez preparadas todas las placas con el medio de cultivo, se seleccionaron 24 para cada ensayo, las cuales fueron etiquetadas en función del tratamiento que llevarían las semillas. Tras etiquetarlas, se sembraron 25 semillas por placa bajo una campana extractora para evitar la contaminación de los medios de cultivo. Las semillas de *Calystegia soldanella* fueron escarificadas manualmente para romper su dormición física (Di Sacco and Bedini 2014). En el caso de *Calystegia soldanella*, *Beta maritima* y las semillas externas de *Reichardia gaditana*, se sembraron 15 semillas por placa debido al poco material de germoplasma disponible o porque la semilla era demasiado grande para la placa de Petri. También se realizaron ensayos de germinación de *Ammophila arenaria* (L.) Link y *Elymus farctus* subsp. *boreatlanticus* (Simonet & Guin.) Melderis, pero la mayor parte de sus semillas se encontraron vacías y por eso no se han tenido en cuenta en los resultados de germinación, pero sí para la supervivencia de las plántulas. La siembra se realizó mediante la ayuda de lancetas y pinzas y se colocaron horizontalmente para facilitar el conteo de las semillas germinadas. Una vez realizadas las siembras, las placas se sellaron con *Parafilm*® para evitar que se secan.

Para realizar las pruebas de germinación de todas las especies, se ha seguido un protocolo que tiene en cuenta el efecto de la estratificación y la temperatura sobre la germinación de las semillas. Para ello, se ha diseñado un experimento factorial con dos factores (estratificación y temperatura). Para el caso de la estratificación, se diferenciaron dos niveles: en fresco (F), en el que un lote de semillas sembradas sobre las placas de Petri han ido directamente a sus correspondientes germinadores tras la siembra y en frío (C), en el que otro lote de semillas sembradas pasaron un proceso previo de estratificación fría a 3°C y en oscuridad (se han envuelto con papel de aluminio), durante 12 semanas en nevera antes de ir a las diferentes temperaturas de germinación. Para poder analizar el efecto de la temperatura sobre la germinación, se han incubado a tres termo-periodos diferentes durante 4 semanas: un germinador a 14/4°C que simula el periodo otoñal o primaveral, un germinador a 22/12°C que simula el periodo estival y un germinador a 30/20°C que simula una situación de calentamiento extremo.

Todos estos ensayos se han llevado a cabo en cámaras germinadoras de *Ing. Climas modelo Grow-S 360*, programadas con un fotoperiodo de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad. Durante el proceso de incubación, se cambió el orden de las 4 placas por tratamiento y la posición de las mismas dentro del germinador, con el fin de

evitar falsos resultados por efecto de posición en el mismo, de manera que se evitó que unas placas recibiesen mayor tiempo y cantidad de luz que otras. Durante las 4 semanas de incubación, se tomaron los datos de germinación de cada una de las especies estudiadas con una frecuencia semanal. El criterio para considerar a una semilla germinada, fue la rotura de la testa y la aparición del primordio radicular y se anotaron el número de semillas germinadas en esa semana. Pasadas las 4 semanas en incubación, se realizó una prueba de corte de las semillas para ambos tratamientos (F y C) que no habían conseguido germinar y se observó a la lupa el motivo, clasificándolas como semillas normales cuando el embrión era visible y aparentemente sano (N), como vacías cuando no se encontraba un embrión en su interior (V) y como contaminadas cuando el embrión existente no era viable (C). Las semillas contaminadas y vacías no se tuvieron en cuenta a la hora de posteriores análisis.

En varias especies, se produjo germinación de semillas durante la estratificación, es decir, a 3°C en oscuridad. Estas semillas se incluyeron a la hora de calcular porcentajes de germinación de semillas estratificadas, puesto que en caso contrario aparecería un falso descenso de la germinación después de la estratificación. En cualquier caso, los porcentajes de germinación durante la estratificación se ofrecen también de forma separada y deben tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

2.3. Protocolos de cultivo

En la segunda parte del experimento, se estudió la supervivencia de las plántulas obtenidas a partir de las pruebas de germinación de algunas de las especies anteriores. En este caso, se analizó la supervivencia de *Ammophila arenaria*, *Cakile maritima*, *Calystegia soldanella*, *Crucianella maritima*, *Elymus farctus* subsp. *boreatlanticus*, *Eryngium maritimum*, *Glaucium flavum*, *Malcolmia littorea*, *Otanthus maritimus* y *Pancratium maritimum*. El objetivo de esta segunda parte, fue conocer la tolerancia de las diferentes especies al paso de un medio de cultivo en agar, a un sustrato, con el fin de evaluar la supervivencia y elaborar protocolos de cultivo para dichas especies, dentro del objetivo final de restauración de ecosistemas dunares. Las plántulas obtenidas en el BG-JBA, se han identificado individualmente mediante las siglas que toman las tres primeras letras del nombre del taxón, seguido del código de acceso y el número de la plántula, llegando a obtener un total de 296 plántulas de entre todas las especies a estudiar, salvo de *Ammophila arenaria*, de la cual nos se obtuvo ninguna semilla germinada y no se ha tenido en cuenta para su análisis, es decir, se obtuvo plántula de 9 de las 10 especies a estudiar.

Se tomó turba como sustrato único para todas las especies. Se optó por este tipo de sustrato debido a que posee gran cantidad de humedad y es capaz incluso de mantenerla pasado cierto tiempo, además de proporcionar las condiciones físico-químicas necesarias para las plántulas (Muñoz-Perez, Ley Vega de Seoane et al. 2011). Este sustrato, se ha tenido en cuenta únicamente para hacer crecer las plántulas en un primer momento las cuales, pasado cierto tiempo, deberían ser trasplantadas a otro tipo de sustrato cuyo contenido hídrico fuese menor y contuviese cierto porcentaje de arena y sal. Para realizar el repicado de las plántulas, se han utilizado bandejas semillero de 28 alveolos cada una, cuyas dimensiones por alveolo son de 6,5 x 6,5 x 6 cm y con una capacidad de 360 mL cada uno. Los alveolos, se han separado de forma individual para llevar un control más exhaustivo de cada plántula, es decir, para aleatorizar la posición de las mismas en el invernadero. Una vez realizado el repicado, se colocaron los

alveolos en una bandeja con agua, para realizar el riego por imbibición y ayudar a mantener la humedad en las primeras fases de adaptación de las plántulas. Posteriormente, se colocaron bajo un tejadillo en el invernadero para garantizar una temperatura y humedad adecuadas. El tipo de riego ha sido por aspersion una vez a la semana, ya que, a pesar de tener estadios muy iniciales de desarrollo, se trata de especies que habitan ambientes caracterizados por déficit hídrico, por lo que no se regaron muy a menudo.

El experimento se realizó entre el 3 de diciembre de 2014 y el 5 de marzo de 2015. El 5 de marzo de 2015, se valoró la supervivencia de cada una de las 296 plántulas obtenidas. Debido a que no se consiguió el mismo número de plántulas para todas las especies a estudiar, únicamente se han tenido en cuenta los porcentajes de supervivencia para cada una en función del total de plántula obtenida por especie y no se ha realizado análisis estadísticos de estos datos.

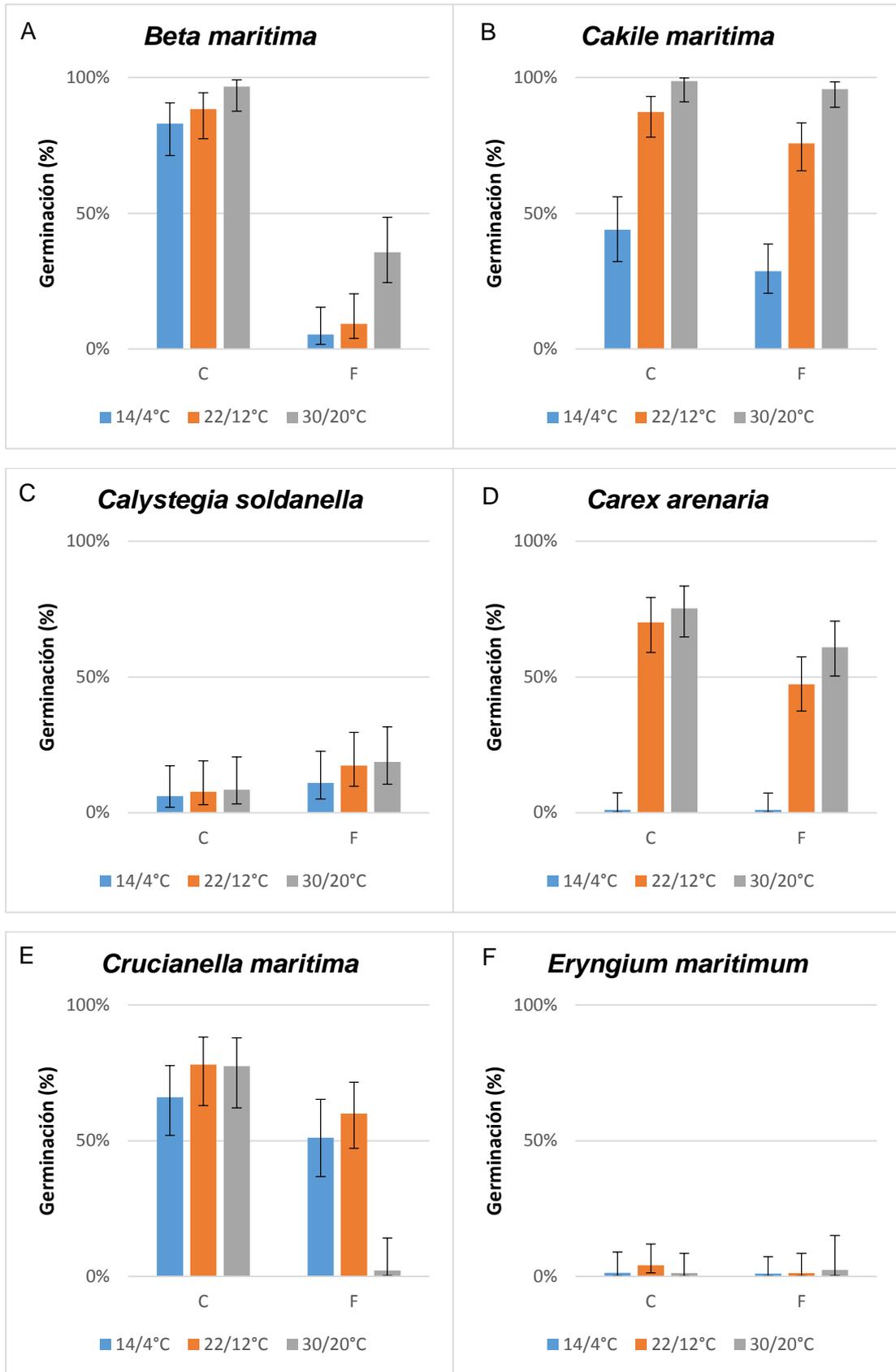
2.4. Análisis estadístico

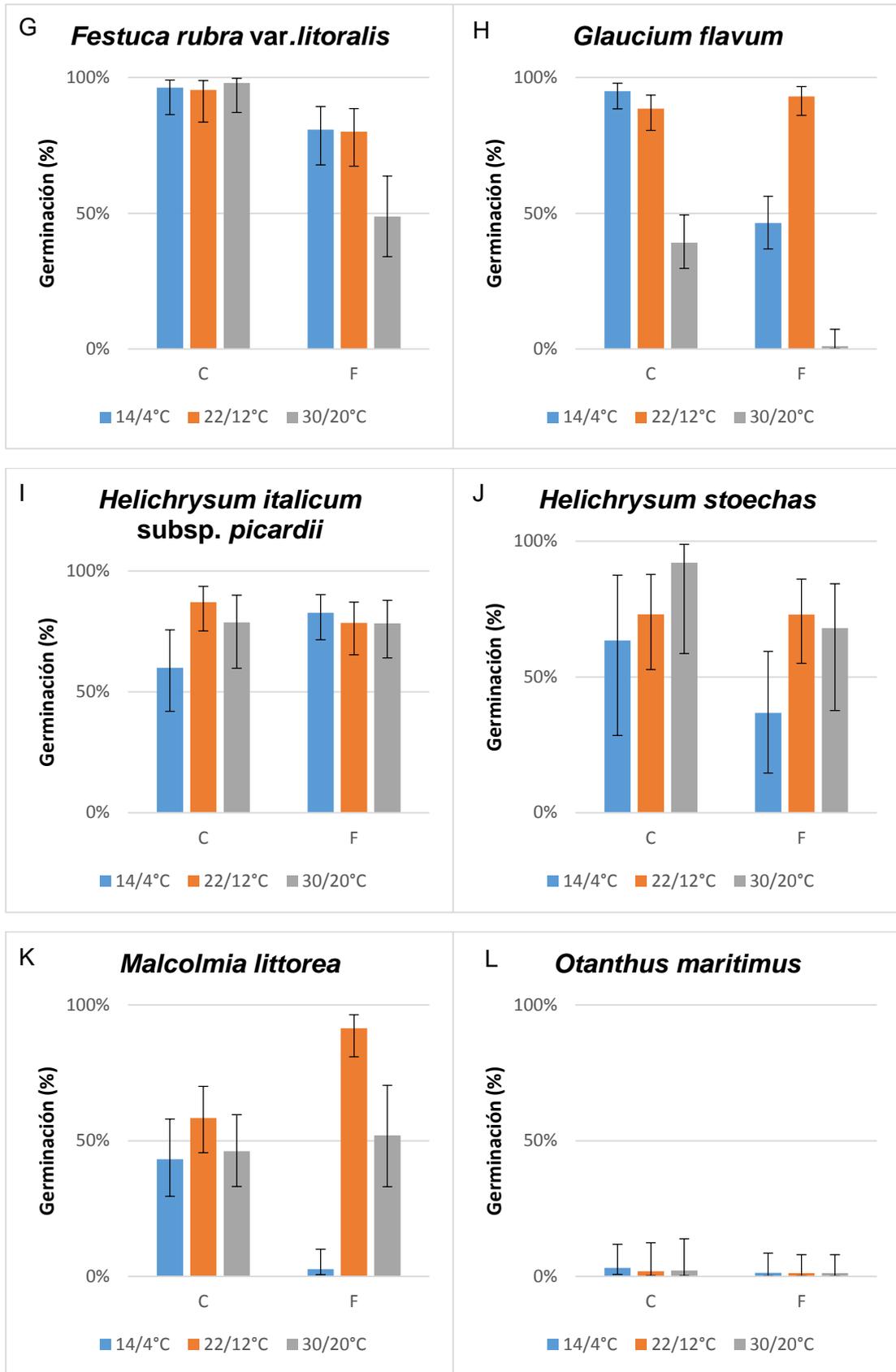
Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico *R Studio* (Studio 2014)(Versión 0.98.1091, *R Studio, Inc.*) de código abierto disponible en <http://www.rstudio.org/>. Para analizar el efecto de los distintos tratamientos sobre los porcentajes de germinación de las semillas de cada especie, se ajustaron Modelos Mixtos Lineales Generalizados (GLMM) con distribución del error binomial y función de enlace *logit* mediante el paquete "*lme4*" (Linear mixed-effects models using Eigen and S4) (Douglas, Maechler et al. 2014). En estos modelos, se incluyó como factor aleatorio la placa de Petri, para tener en cuenta la pseudorreplicación producida por el hecho de utilizar una única cámara por termo-periodo (Morrison and Morris 2000). Para determinar la significación de los factores temperatura y estratificación, así como de su interacción, se construyeron tablas ANOVA de tipo III basadas en la χ^2 de Wald mediante el paquete "*car*" (*Companion to Applied Regression*) (Fox and Weisberg 2010). Finalmente, se calcularon las medias estimadas y el intervalo de confianza binomial del 95% para cada tratamiento mediante el paquete "*effects*" (Fox 2003).

3. Resultados y discusión

3.1. Germinación de semillas

A pesar de que existe una tendencia general a germinar a temperaturas bajas, existen diferencias en las necesidades ambientales que requieren cada una de las especies analizadas para poder germinar, tal y como se puede observar en la Figura 3.1. Analizando conjuntamente la Tabla 3.1., se puede concluir si esas diferencias en las respuestas de germinación, son significativas en función del factor estratificación, del factor temperatura o debido a la interacción de ambos factores.





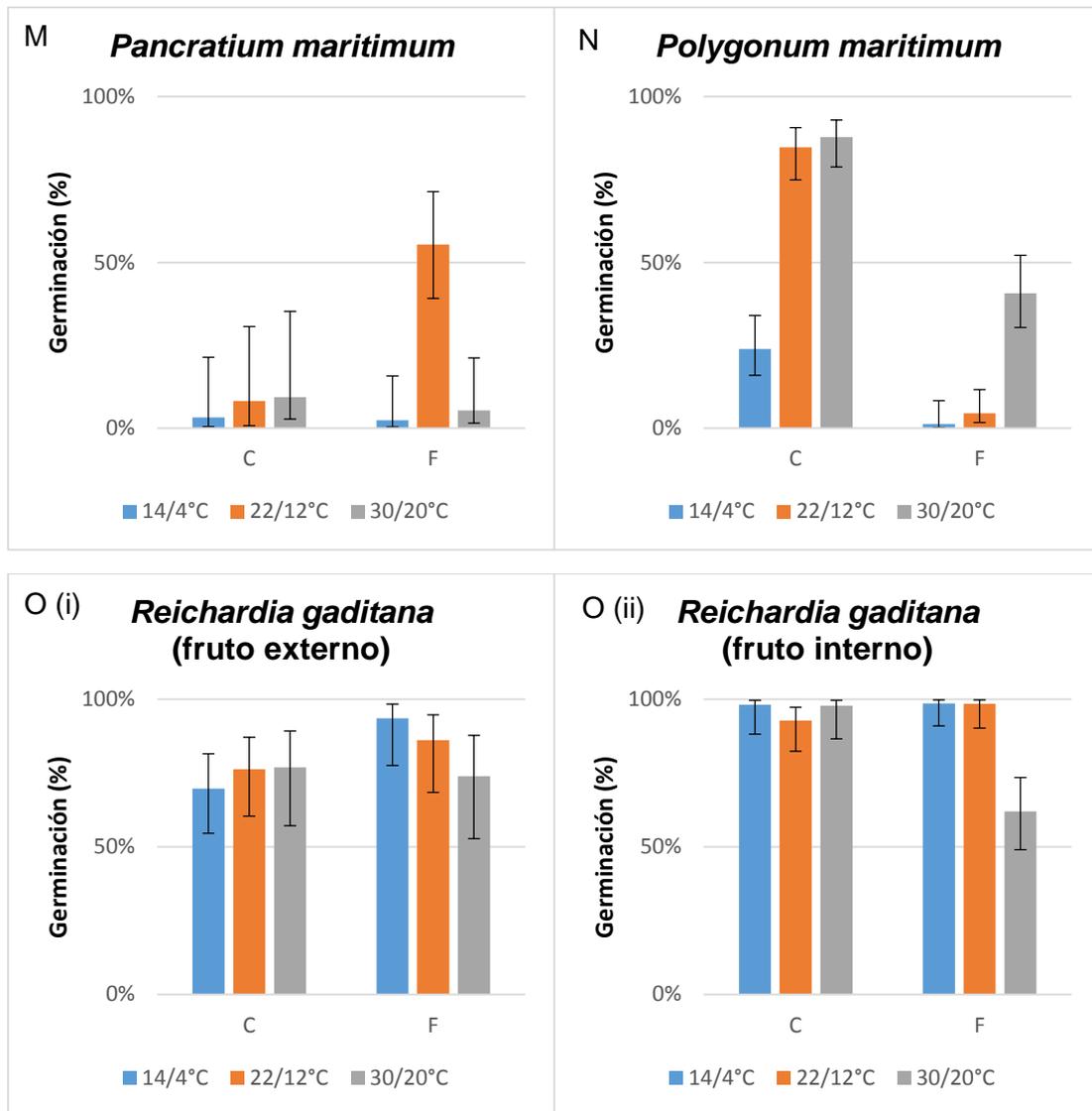


Figura 3.1. Muestra los porcentajes de germinación de las 15 especies estudiadas. Cabe destacar que en el caso de *Reichardia gaditana*, se han realizado pruebas de germinación por separado en función del fruto externo o interno que esta produce, de manera que se han tenido en cuenta como dos especies diferentes. Se representa el efecto del pre-tratamiento: En fresco (F), las semillas han sido incubadas a distintos termoperiodos en las respectivas incubadoras inmediatamente después de la siembra y *estratificación fría* (C), donde las semillas han estado durante 12 semanas a 3°C y en oscuridad, antes de ser incubadas. Los colores representan los 3 termo-periodos diferentes: En azul, el porcentaje de germinación a temperaturas de 14/4°C, en naranja, a temperaturas de 22/12°C y en gris, a temperaturas de 30/20°C, todas ellas con un fotoperiodo de 12 horas luz/ 12 h oscuridad. Las barras representan la media estimada por tratamiento, con el intervalo de confianza binomial del 95%.

Para *Beta maritima*, se puede observar que los porcentajes de germinación son mayores cuando las semillas atraviesan un periodo de *estratificación fría* y a su vez, la respuesta de germinación es mayor al aumentar la temperatura. Estas diferencias son significativas en ambos factores. Por otro lado, a partir de la Figura 3.2., se puede ver que el porcentaje de semillas germinadas durante la *estratificación fría* supera el 50%, evidenciando que esta especie puede germinar en invierno o bajo la nieve. Se puede asociar a *Beta maritima* al "Hábitat 1210 Vegetación anual de arribazón", según la clasificación que se da en el Anexo I de la Directiva Hábitats de 1992, o también, en función de la clasificación EUNIS (Davies, Moss et al. 2004), a los hábitats del límite superior de las playas (Tabla 2.1.), ya que es una especie halonitrófila,

es decir, es capaz de crecer en aquellos ambientes donde la salinidad es elevada y el aporte de materia orgánica por parte del mar genera un ambiente rico en nitrógeno. Es una especie hemicriptófita escaposa (Fernández Prieto, Rodríguez et al. 2014), lo que significa que es una planta perenne cuya parte aérea desaparece en la época desfavorable y el resto de la planta permanece cubierta a ras del suelo. Quizá esta estrategia le permite sobrevivir durante el invierno, a la vez que sus semillas sufren la estratificación y se preparan para la época favorable. Las semillas frescas sólo pueden germinar a temperaturas muy elevadas, que raramente se darán en el momento de la dispersión. La mayoría de la germinación ocurrirá durante el invierno y el principio de la primavera, cuando el estrés hídrico sea menor.

Cakile maritima, es una especie característica del “Hábitat 1210 Vegetación anual de arribazón”, de hecho, la asociación fitosociológica típica de este entorno es la *Cakiletea maritimae* agrupando formaciones de especies anuales o efímeras que ocupan parte de las acumulaciones de materiales procedentes de la deriva costera y de la acumulación de materia orgánica rica en nitratos (Royo and Traveset 2009). Las respuestas a la germinación a los distintos tratamientos, quedan reflejadas en la Figura 3.1 (B). Se puede apreciar un aumento de los porcentajes de germinación a medida que la temperatura de incubación es mayor. Se supera el 50% de las semillas germinadas a temperaturas 22/12°C y a 30/20°C, sin embargo, la respuesta no es del todo elevada a bajas temperaturas. En la Tabla 3.1. se pone de manifiesto que estas diferencias son realmente significativas y ocurre lo mismo para los dos tratamientos de estratificación. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con *Beta maritima*, este hecho no implica que necesariamente se requiera un periodo de estratificación fría para poder germinar, ya que las semillas frescas pueden germinar a temperaturas bajas que se darán en el momento de la dispersión. A modo general, *Cakile maritima* es una especie que coloniza los límites superiores de la marea, zona que presenta unas características ambientales muy duras dentro de los ecosistemas dunares. El efecto de la erosión del viento y la alta influencia de la salinidad, determinan que esta especie esté adaptada a ambientes altamente efímeros y perturbados, de manera que su estrategia sería presentar elevadas tasas de germinación en cualquier condición (Debez, Hamed et al. 2004). Se espera que a poco que mejoren las condiciones ambientales, su crecimiento se dispare.

En el caso de *Calystegia soldanella*, esta especie se puede encontrar unas veces entre el “Hábitat 2110 Dunas móviles embrionarias” y el “Hábitat 2120 Dunas móviles de litoral con *Ammophila arenaria* (dunas blancas)” del Anexo I de la Directiva Hábitats, según engloba su equivalencia en la clasificación EUNIS (Davies, Moss et al. 2004). Los porcentajes de germinación obtenidos para esta especie, han sido menores, tal y como se puede ver en la Figura 3.1 (C). A partir de los valores de la Tabla 3.1, la única diferencia significativa que se puede apreciar es en función de la estratificación, es decir, germina mejor sin pasar un periodo frío de 3 meses, pero no se puede afirmar lo mismo en el caso de la temperatura. De hecho, en la Figura 3.2. se ve que el porcentaje de germinación durante la estratificación fría ni siquiera alcanza un 25%. Parece que las distintas temperaturas no producen una respuesta significativa en *Calystegia soldanella*. Esto puede deberse a que esta especie empieza a aparecer en el primer cordón dunar embrionario, sin embargo, se consolida su presencia en las dunas secundarias o blancas, donde las condiciones ambientales son algo más estables. En estos ambientes, el aporte de materia inorgánica es mayor (conchas, caparazones...) que dan un color característico blanco a estas dunas. Posiblemente, este aporte de nutrientes, es el que

necesita *Calystegia soldanella* para poder desarrollarse y en cuanto faltan esas condiciones su respuesta germinativa es menor. Sería preciso comprobar la germinación en respuesta al contenido de nitrógeno del medio (Bewley and Black 2013). La posible estrategia de esta especie, que habita en las dunas móviles y que se encuentra sujeta a variaciones del ambiente, es la dispersión de sus semillas a larga distancia y la alta longevidad de las mismas (Arafeh and Kadereit 2006), es decir, aunque no se encuentre en el límite superior de la playa, es una especie pionera, cuya propia biología, hace que necesite colonizar constantemente nuevos ambientes y sus semillas presenten mayores resistencias. Las semillas pueden por tanto presentar una dormición profunda que extienda la germinación en el tiempo. Anatómicamente, su estrategia es la de adaptarse a estos ambientes mediante modificaciones de sus hojas, lo que le permite colonizar entornos que otras especies no podrían ocupar (Daniela, Forino et al. 2009).

En el caso de *Carex arenaria*, se trata de una ciperácea típica de las dunas blancas más estabilizadas, es decir, principalmente se puede encontrar en el “Hábitat 2120 Dunas móviles del litoral con *Ammophila arenaria* (dunas blancas)” (Díaz González, Fernández Prieto et al. 2002). Se trata de una planta geófito con rizoma, es decir, desarrolla un sistema radicular complejo que ayuda a fijar en cierta forma la duna donde se asienta y es capaz de sobrevivir la época desfavorable enterrada (Fernández Prieto, Rodríguez et al. 2014). A partir de la Figura 3.1 (D), se puede observar que existen grandes diferencias a la respuesta germinativa en función de la temperatura de incubación. De hecho, según la Tabla 3.1. estas diferencias son significativas. Esto indica que los mayores niveles de germinación los alcanza a temperaturas de 30/20°C y no soporta temperaturas bajas. Este es un patrón de germinación claramente diferente al resto de taxones estudiados. Ya que esta germinación a temperaturas altas es característica del género *Carex* (Schütz 2000), es posible que sea un carácter heredado. Sin embargo, la estratificación fría no amplía el rango de germinación hacia temperaturas más frías, como ocurre en otros *Carex*. Parece por tanto que *Carex arenaria* sólo podría germinar durante los meses de verano, cuando las temperaturas son más altas.

La *Crucianella maritima* es una especie relativamente abundante en las dunas grises o terciarias (“Hábitat 2130* Dunas costeras fijas con vegetación herbácea”). A partir de los resultados obtenidos en la Figura 3.2 (E), se puede apreciar que las respuestas de germinación han sido mayores tras pasar un periodo de estratificación y a temperaturas mayores y esas diferencias son significativas para los dos tratamientos e incluso para la interacción de los dos, es decir, es una especie que requiere sufrir una estratificación fría y unas temperaturas cerca de los 22/12°C para que la respuesta germinativa sea mayor. La estratificación además cambia la respuesta a la temperatura, permitiendo a las semillas germinar a 14/4 °C. También se puede ver, que más del 50% de las semillas que se trataron a 3°C y a oscuridad durante 3 meses, germinaron, lo que corrobora los requerimientos amplios de esta especie para germinar. La emergencia se produciría durante el otoño y el invierno.

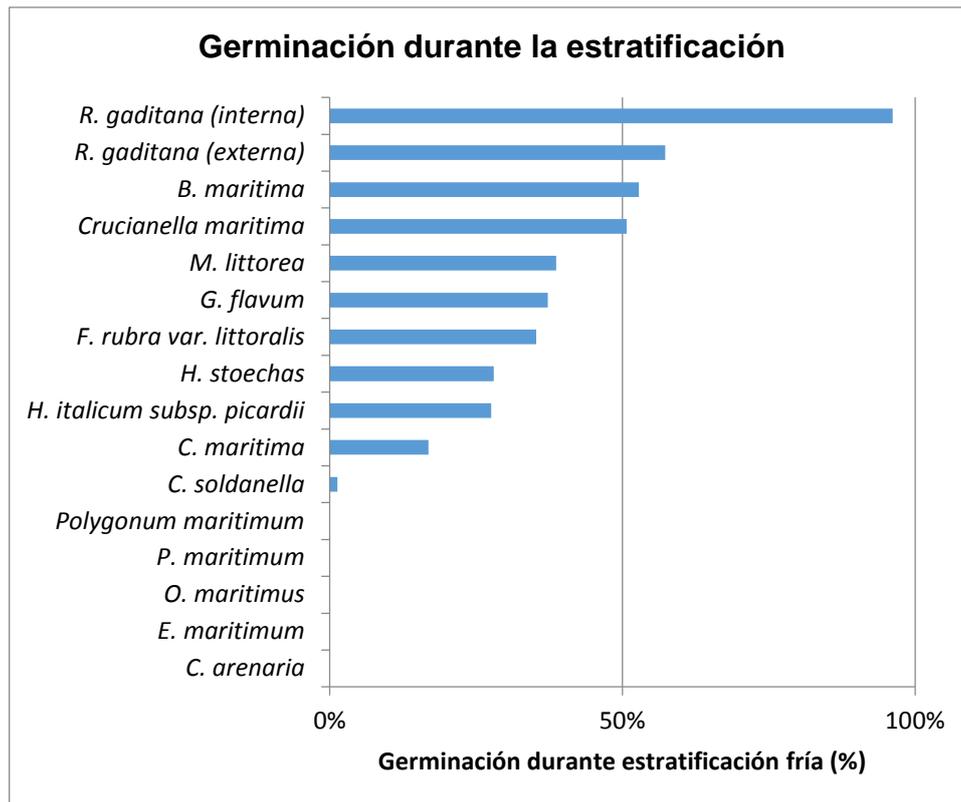


Figura 3.2. Porcentaje de germinación durante la estratificación fría, es decir, el valor del número de semillas germinadas (cipselas en el caso de ambos *Helichrysum*, *Otanthus* y *Reichardia*) en la semana 12, tras pasar 3 meses en oscuridad a 3°C.

Eryngium maritimum es una especie característica de las dunas embrionarias y también la podemos encontrar abundantemente en el cordón dunar secundario (Díaz González, Fernández Prieto et al. 2002, Isermann and Rooney 2014). Se puede observar que los resultados de germinación no han sido demasiado altos en ninguno de los tratamientos (Figura 3.2 F), y a partir de la Tabla 3.1, tampoco se desprende una conclusión suficiente para determinar qué tratamiento influye mejor en la respuesta germinativa. Esto puede que se deba a que la recolecta de las semillas ha sido fuera de plazo y la mayoría se encontrasen inmaduras. A pesar de los resultados obtenidos y no poder llegar a ninguna conclusión, *Eryngium maritimum* se caracterizaría por presentar una estrategia de planta pionera, que coloniza las dunas secundarias más ricas en nitrógeno por lo que habría que estudiar si este elemento es necesario para romper su dormición (Bewley and Black 2013).

Festuca rubra var. littoralis, es una gramínea que, al igual que *Carex arenaria*, aparece también en las dunas blancas más estabilizadas. Los porcentajes de germinación que se pueden ver en la Figura 3.2 (G), comparados con los valores de la Tabla 3.1, muestran que las semillas de esta especie germinan mejor tras pasar un periodo de estratificación fría, sin embargo, no existe una temperatura preferida, de manera que se pone de manifiesto la amplitud de nicho de germinación por parte de esta especie. Es probable que se deba, al igual que las especies que habitan este entorno, a que la fragilidad de las dunas móviles le obliga a germinar en cualquier condición.

En cuanto a *Glaucium flavum*, en la Tabla 3.1, se puede observar que existen diferencias significativas en todos los tratamientos, es decir, la diferencia de temperatura de incubación y el efecto de la estratificación generan diferentes respuestas germinativas en esta especie. Cabe destacar, que se requiere una estratificación previa y unas temperaturas que varían entre los 14/4°C y los 22/12°C (Figura 3.1 H), ya que esta especie no tolera altas temperaturas de germinación. Esta papaverácea es típica de los ambientes más cercanos al mar, es decir, se puede encontrar en el “Hábitat 1210 vegetación anual de arribazón”, pero también es frecuente verla crecer en las dunas blancas entre el “barrón de playa” (*Ammophila arenaria*) (Díaz González, Fernández Prieto et al. 2002). La estrategia de esta especie sería presentar altas tasas de germinación en otoño e invierno para aprovechar la ventana de menor estrés hídrico. En cuanto a las adaptaciones, esta especie presenta respuestas fisiológicas muy adaptadas a la salinidad, ya que en los bordes superiores de la playa, las concentraciones de sal son muy elevadas. La adaptación, por tanto, es otra estrategia que le permite sobrevivir en ambientes donde otras especies no lo harían (Cambrollé, Redondo-Gómez et al. 2011).

Tanto *Helichrysum picardii* como *Helichrysum stoechas*, serían dos especies que habitan las dunas fijas o grises (2130*) (Díaz González, Fernández Prieto et al. 2002). A partir de los datos de la Figura 3.1 (I, J) y analizando la Tabla 3.1, se aprecia que en el caso de *Helichrysum picardii*, la interacción entre la estratificación y la temperatura es significativo, es decir, requiere pasar un periodo frío y ciertas temperaturas para alcanzar buenos resultados de germinación. Sin embargo en el caso de *Helichrysum stoechas*, las diferencias no han sido significativas y no se puede asegurar que requiera ciertos tratamientos para germinar. En ambas especies, la germinación ocurriría también en otoño e invierno.

Tabla 3.1. Valores de χ^2 de Wald, donde se muestran los dos factores: “estratificación” y “temperatura” además de la interacción de ambos. Los p-valores a un nivel de significación del 5%. En negrita, los valores significativos.

Especies	Estratificación		Temperatura		Interacción	
	χ^2 (1)	p	χ^2 (2)	p	χ^2 (1)	* p
<i>B. maritima</i>	112.041	<0.001	16.408	<0.001	0.242	0.885
<i>C. maritima</i>	4.533	0.033	96.057	<0.001	0.214	0.898
<i>C. soldanella</i>	4.616	0.031	1.090	0.579	0.102	0.950
<i>C. arenaria</i>	1.204	0.272	52.788	<0.001	0.699	0.704
<i>Crucianella maritima</i>	27.177	<0.001	13.214	0.001	14.730	<0.001
<i>E. maritimum</i>	0.116	0.732	0.514	0.773	0.998	0.607
<i>F. rubra</i> var. <i>littoralis</i>	22.965	<0.001	0.412	0.813	3.387	0.183
<i>G. flavum</i>	27.965	<0.001	70.132	<0.001	32.386	<0.001
<i>H. italicum</i> subsp. <i>picardii</i>	0.309	0.578	2.874	0.237	6.309	0.042
<i>H. stoechas</i>	3.000	0.083	5.332	0.069	2.069	0.355
<i>M. littorea</i>	1.001	0.317	49.284	<0.001	32.003	<0.001
<i>O. maritimus</i>	0.706	0.400	0.113	0.945	0.059	0.970
<i>P. maritimum</i>	1.250	0.263	6.730	0.034	7.317	0.025
<i>Polygonum maritimum</i>	66.673	<0.001	49.483	<0.001	11.456	0.003
<i>R. gaditana</i> (semilla externa)	3.590	0.058	1.556	0.459	3.681	0.158
<i>R. gaditana</i> (semilla interna)	0.454	0.500	5.508	0.063	11.204	0.003

Malcolmia littorea, es otra especie característica de las dunas fijas o grises y figura en la lista de plantas protegidas del Principado de Asturias catalogada como “en peligro de extinción” (Díaz González, Fernández Prieto et al. 2002). Analizando conjuntamente los valores de la Figura 3.1 (K) juntos con los de la Tabla 3.1, se puede observar que los mayores niveles de germinación ocurren a temperaturas 22/12°C de manera significativa. Además, para alcanzar mayor porcentaje de germinación requieren atravesar estratificación fría, que le permite germinar a temperaturas bajas, incluso a 3°C.

En cuanto a *Otanthus maritimus*, esta especie se puede encontrar asociada la gran diversidad que presentan las dunas blancas. Como en estos ambientes las condiciones son más inestables, aparecen diferentes especies que se encuentran adaptadas y son capaces de sobrevivir aquí. Le ocurre a *Otanthus* en cuanto a la adaptación anatómica de sus hojas, ya que presenta un denso tomento de pelos blancos que la recubre para evitar la pérdida de agua (Díaz González, Fernández Prieto et al. 2002, Daniela, Forino et al. 2009). De esta manera, cabría esperar que el nicho de germinación de esta especie fuese amplio, sin presentar ninguna preferencia por las condiciones, tal y como se desprende de los valores de la Tabla 3.1. Sin embargo, los bajos resultados obtenidos en el experimento (Figura 3.1 L), puede que se deban a que las condiciones de las semillas recogidas no fueron las más adecuadas.

Los resultados de *Pancratium maritimum*, indican en la Figura 3.1 (M) que el mayor porcentaje de germinación se da a temperaturas de 22/12°C, sin embargo, analizando la Tabla 3.1, se obtienen valores significativos para el factor temperatura y la interacción con la estratificación. Las semillas sólo germinan en fresco a 22/12 °C, y la estratificación reduce la germinación, quizás porque produce la entrada en dormición secundaria. Esta especie germinaría inmediatamente después de la dispersión, y las semillas que se dispersan tarde, cuando la temperatura es ya demasiado baja, entran en una profunda dormición que las mantendría a largo plazo en el banco de semillas del suelo. Al tratarse de una especie que habita en las dunas móviles y pertenecer a la familia de los narcisos (presenta un bulbo subterráneo) (Díaz González, Fernández Prieto et al. 2002, Fernández Prieto, Rodríguez et al. 2014), quizá la estrategia de esta especie, sea la de sobrevivir la época desfavorable bajo tierra y presenta ciertos requerimientos germinativos que le han ayudado a adaptarse a ese ambiente (Grassi, Cazzaniga et al. 2005).

Por otro lado, *Polygonum maritimum* es una especie típica de los límites superiores del arenal de la playa (“Hábitat 1210 vegetación anual de arribazón”) y se encuentra perfectamente adaptada a estos medios caracterizados por el estrés hídrico y las altas concentraciones de salinidad. De esta manera, *Polygonum maritimum* es capaz de conservar la mayor cantidad de agua posible gracias a sus flores y hojas presentan los bordes enrollados para evitar la pérdida de agua (Seçkin Dinler and Aksoy 2014). De los datos de germinación obtenidos en la Figura 3.1 (N), se desprende que los mayores porcentajes corresponden a temperaturas de entre 22/12°C y 30/20°C, pero además, esas diferencias son significativas para la interacción, lo que significa que las semillas de esta especie también presenta dormición fisiológica. Tras el paso del invierno, sus semillas pueden germinar en un rango más amplio, lo que llevaría a la germinación en primavera, a diferencia de la mayoría de las especies estudiadas.

Por último, *Reichardia gaditana* no presenta diferencias en la germinación entre las semillas internas y externas. De manera general, se puede observar que presentan un amplio rango de germinación a diferentes temperaturas, a pesar de vivir en los ambientes más estables (Hábitat 2130* dunas fijas o grises). Las semillas de ambos tipos germinarían rápidamente después de dispersarse o durante el invierno.

3.2. Supervivencia de plántulas

Después de 3 meses de crecimiento de las plántulas que germinaron en el Banco de Germoplasma, se analizó la supervivencia de cada una de las especies tras el paso de agar a condiciones más duras de sustrato (turba). En la Figura 3.3, aparecen los porcentajes de supervivencia y los valores del tamaño muestral de cada una de las especies. Teniendo en cuenta que no todas las especies germinaron de igual manera en la primera parte del experimento, cabe destacar que algunas de ellas tienen unos tamaños de muestra muy pequeños y que posiblemente los niveles de supervivencia no sean demasiado representativos.

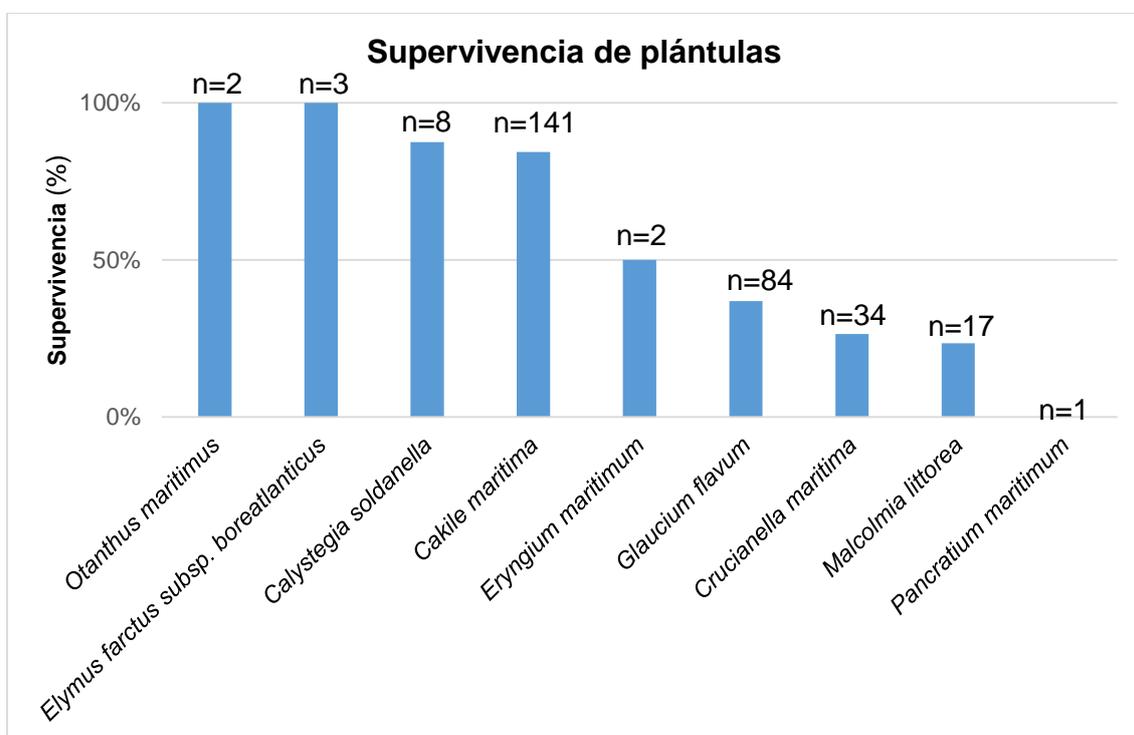


Figura 3.3. Porcentaje de supervivencia por especie, de las plántulas obtenidas de cada una tras las pruebas de germinación. Encima de cada barra se indica el número de plántulas inicialmente sembradas.

En cualquier caso, se puede observar que existen 5 especies que superaron el 50% de supervivencia una vez sacadas de los germinadores a las condiciones más duras, entre las cuales están *Otanthus maritimus*, *Elymus farctus* subsp. *boreatlanticus*, *Calystegia soldanella*, *Cakile maritima* y *Eryngium maritimum*. Por otro lado, *Glaucium flavum*, *Crucianella maritima*, *Malcolmia littorea* y *Pancratium maritimum*, no lo superan.

De entre todas las especies que mejor toleran el paso de agar a sustrato, la que mejores resultados da sería *Cakile maritima*. De hecho, se obtuvieron 141 plántulas en

las pruebas de germinación, de las cuales sobrevivieron cerca del 85%. Esto puede deberse a que *Cakile* es una especie característica de los entornos dunares más cercanos a la costa, es decir, a la zona de vegetación anual de arribazón, lo que le confiere una elevada capacidad germinativa en cualquier condición y además una elevada supervivencia a los cambios ambientales, tal y como se refleja en el paso de agar a sustrato.

También coinciden de forma general, los altos niveles de supervivencia en especies características de las dunas embrionarias y dunas móviles como *Otanthus maritimus*, *Elymus farctus* subsp. *boreatlanticus*, *Calystegia soldanella* y *Eryngium maritimum*. Esto se puede deber a que estas especies, al igual que *Cakile*, presentan adaptaciones a los ambientes más duros de los sistemas dunares y por tanto, no resultaría ningún problema el trasplantarlas a la hora de producir plántula. Es destacable que precisamente *Otanthus maritimus*, *Calystegia soldanella* y *Eryngium maritimum* fueron especies que presentaron porcentajes de germinación muy bajos. De esta forma, parece que cada uno de los eventos de germinación que ocurren en estas especies tiene una alta probabilidad de conducir a un establecimiento, ya que las plántulas parecen ser especialmente resistentes. Para estos casos, sería recomendable la producción de planta en agar, ya que se podrían representar mejor las condiciones de germinación, una vez sean conocidas.

En el extremo opuesto están, *Crucianella maritima* y *Malcolmia littorea*, dos especies características de las dunas fijas o grises, donde las condiciones ambientales son mucho más estables. En consecuencia, la supervivencia de sus plántulas en condiciones estresantes parece ser mucho menor. En este caso, el número de plántulas obtenidas, ha sido suficiente para demostrar que el paso de las mismas de agar a sustrato no es lo más idóneo. La decisión más razonable, especialmente teniendo en cuenta la facilidad de su germinación, sería sembrar las semillas directamente en el sustrato donde van a crecer, en lugar de trasplantarlas.

Algo parecido ocurre con *Glaucium flavum*, una especie típica de la vegetación anual de arribazón, pero que también se encuentra asociada a las dunas móviles. Esta especie, no ha demostrado altos niveles de supervivencia pero sí de germinación, y por lo tanto, lo mejor sería producirla directamente en sustrato.

Pancratium maritimum, no ha dado unos valores representativos de supervivencia, debido a que sólo se ha podido obtener una semilla germinada durante las pruebas de germinación, por tanto, a partir de estos resultados, no podemos afirmar que la supervivencia sea nula o del 100%. Habría que repetir el experimento en otras condiciones.

4. Conclusiones

A partir de este trabajo, se ha podido llegar a unas conclusiones generales que han ayudado a comprender mejor la biología de las semillas de especies dunares y por tanto, a establecer unos protocolos de cultivo de las mismas en futuros proyectos de restauración.

En primer lugar, no se pueden relacionar claramente las distintas estrategias que presentan las especies con el hábitat en el que viven. La mayoría de especies, tanto las que tienden a ocupar las dunas móviles (*Cakile maritima*, *Festuca rubra* var. *littoralis*, *Glaucium flavum*) como las de dunas fijas (*Crucianella maritima*, ambos *Helichrysum*, *Reichardia gaditana*), germinan rápidamente con las temperaturas habituales del otoño, con lo cual, emergerían poco después de la dispersión para aprovechar la temporada de menor estrés hídrico. *Beta maritima* y *Malcolmia littorea* no germinarían durante el otoño, pero si lo harían durante el invierno. La germinación durante el otoño y el invierno permitiría a las plántulas establecerse durante la época de menor estrés hídrico, con lo cual las especies dunares parecen seguir lo que se ha llamado la estrategia mediterránea de germinación (Doussi and Thanos 2002). Todas estas especies presentan una germinación amplia y oportunista, por lo cual sería posible aportar semillas directamente a las dunas en proceso de restauración, preferiblemente a finales del verano. Un caso de germinación rápida más particular es el del *Pancratium maritimum*, que sólo germinaría en el caso de semillas dispersadas en pleno verano, mientras que las demás parecen entrar en el banco de semillas a largo plazo. Por otro lado, *Carex arenaria* y *Polygonum maritimum* son las únicas dos especies que parecen tener claramente dormición fisiológica y necesitar el paso del invierno a la primavera o incluso el verano para germinar. Debido a ello, estas semillas deberían de tratarse previamente a su introducción en la duna, o germinarse en vivero bajo condiciones simuladas de primavera/verano. Finalmente, en el caso de *Calystegia soldanella*, *Eryngium maritimum* y *Otanthus maritimus*, los bajos porcentajes de germinación no permiten establecer conclusiones claras. Existen tres posibilidades para estas especies: una baja germinabilidad natural de las semillas, una dormición fisiológica profunda, o un requerimiento de nitrógeno para germinar. En el caso de *Calystegia soldanella*, también es posible que la escarificación de las semillas no se realizara correctamente, y se mantuviera la dormición física (Di Sacco and Bedini 2014). Esclarecer estas posibilidades debería de ser el objeto de estudios futuros.

En segundo lugar, las especies presentan diferencias en su tolerancia al paso del agar al cultivo. En algunos caso, como *Cakile maritima* y *Calystegia soldanella*, el paso no representa una gran mortalidad, y la planta puede producirse en placa de Petri cuando sea necesario. En otras especies, como la protegida *Malcolmia littorea*, el paso de la placa al sustrato conlleva una gran pérdida de plantas, con lo cual la siembra debería de realizarse preferentemente en semillero o directamente en la duna.

En cualquier caso, la restauración de los sistemas dunares es una tarea compleja para la que hay que tener en cuenta experiencias pasadas (Gallego-Fernández, Sánchez et al. 2011). La restauración de una duna depende de la diversidad vegetal que se pretende reintroducir, ya que cada una de las especies que componen las comunidades vegetales de duna requiere de una serie de tratamientos específicos a su biología. El desarrollo de protocolos de restauración debe de hacerse siempre de

acuerdo con el ciclo de vida y los caracteres funcionales de las especies que se pretenden reintroducir.

5. Referencias bibliográficas

Arafeh, R. and J. W. Kadereit (2006). Long-distance seed dispersal, clone longevity and lack of phylogeographical structure in the European distributional range of the coastal *Calystegia soldanella* (L.) R. Br.(Convolvulaceae). *Journal of Biogeography* **33**(8): 1461-1469.

Assessment, M. E. (2005). *Ecosystems and human well-being: wetlands and water*. World Resources Institute, Washington, DC.

Bacchetta, G., Fenu, G., Mattana, E., Bueno Sánchez, A., Jiménez-Alfaro, B., Piotto, B., Virevaire, M. (2008). *Conservación ex situ de plantas silvestres*, Jardín Botánico Atlántico, La Caixa: 378p.

Bewley, J. D. and M. Black (2013). *Seeds: Physiology of Development and Germination*, Springer US: 296p.

Cambrollé, J., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Luque, T., Figueroa, M.E. (2011). *Physiological responses to salinity in the yellow-horned poppy, *Glaucium flavum**. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**(2): 186-194.

Carboni, M., Santoro, R., Acosta, A.T.R.(2010). Are some communities of the coastal dune zonation more susceptible to alien plant invasion? *Journal of Plant Ecology*: rtp037.

Ciccarelli, D., Bacaro, G., Chiarucci, A. (2012). Coastline dune vegetation dynamics: evidence of no stability. *Folia Geobotanica* **47**(3): 263-275.

Daniela, C., Florino, L.M.C., Balestri, M., Pagni, A.M. (2009). Leaf anatomical adaptations of *Calystegia soldanella*, *Euphorbia paralias* and *Otanthus maritimus* to the ecological conditions of coastal sand dune systems. *Caryologia* **62**(2): 142-151.

Davies, C. E., Moss, D., Hill, M.O. (2004). *EUNIS habitat classification revised 2004*. Report to: European Environment Agency-European Topic Centre on Nature Protection and Biodiversity: 127-143.

de Seoane, C. L. V., Gallego-Fernández, J.B., Pascual, C.V. (2007). *Manual de restauración de dunas costeras*, Dirección General de Costas: 251p.

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**(1-2): 179-189.

Defeo, O., McLachlan, A., Schoeman, D.S., Schlacher, T. A., Dugan, J., Jones, A., Lastra, M., Scapini, F. (2009). *Threats to sandy beach ecosystems: a review*. Estuarine, Coastal and Shelf Science, Elsevier. **81**: 1-12.

Di Sacco, A. and G. Bedini (2014). *Demography and reproductive performance of Calystegia soldanella on a sandy seashore in Tuscany, Italy*. Botany **93**(2): 101-108.

Díaz González, T. E. (2009). *Caracterización de los Hábitats de Interés Comunitario (Red NATURA 2000) existentes en el Principado de Asturias. I: Hábitats litorales halófilos (Dunas, acantilados y marismas)*. Bol. Cien. Nat. R.I.D.E.A. **50**: 223-280.

Díaz González, T. E., Fernández Prieto, J.A. (2002). *Flora y vegetación de las playas y dunas litorales. Paisaje vegetal del noroeste ibérico*, Trea: 35-81.

Douglas, B., Maechler, M. Bolker, B. Walker, S. (2014). *lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4*. R package version: 1-1.

Doussi, M. A. and C. A. Thanos (2002). *Ecophysiology of seed germination in Mediterranean geophytes. 1. Muscari spp.* Seed Science Research **12**(03): 193-201.

Feagin, R. A., Sherman, D.J., Grant, W.E. (2005). *Coastal erosion, global sea-level rise, and the loss of sand dune plant habitats*. Frontiers in Ecology and the Environment **3**(7): 359-364.

Fernández Prieto, J. A., Rodríguez Cires, E., Bueno Sánchez, A., Vázquez, V.M., Nava Fernández, H.S. (2014). *Catálogo de las plantas vasculares del Principado de Asturias*, Documentos del Jardín Botánico Atlántico (Gijón) **11**: 7-267.

Flor, G., Flor-Blanco, G., Flores-Soriano, C. (2015). *Cambios ambientales por los temporales de invierno de 2014 en la costa asturiana (NO de España)*. Trabajos de Geología **34**(34).

Fox, J. (2003). *Effect displays in R for generalised linear models*. Journal of Statistical Software **8**(15): 1-27.

Fox, J. and S. Weisberg (2010). *An R companion to applied regression*, Sage: 424p.

Gallego-Fernández, J. B., Sánchez, I.A., de Seoane, C.L.V. (2011). *Restoration of isolated and small coastal sand dunes on the rocky coast of northern Spain*. *Ecological Engineering* **37**(11): 1822-1832.

Grassi, F., Cazzaniga, E., Minuto, L., Peccenini, S., Barberis, G., Basso, B. (2005). *Evaluation of biodiversity and conservation strategies in *Pancratium maritimum* L. for the Northern Tyrrhenian Sea*. *Biodiversity & Conservation* **14**(9): 2159-2169.

Grime, J. P. (1977). *Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory*. *American naturalist*: 1169-1194.

Isermann, M. and P. Rooney (2014). *Biological Flora of the British Isles: *Eryngium maritimum**. *Journal of Ecology* **102**(3): 789-821.

Jiménez-Alfaro, B., Marcenò, C., Guarino, R., Chytrý, M. (2014). *Regional metacommunities in two coastal systems: spatial structure and drivers of plant assemblages*. *Journal of Biogeography*.

Kim, D. and K. B. Yu (2009). *A conceptual model of coastal dune ecology synthesizing spatial gradients of vegetation, soil, and geomorphology*. *Plant Ecology* **202**(1): 135-148.

Martínez, M. L., Maun, M.A., Psuty, N.P. (2004). *The fragility and conservation of the world's coastal dunes: geomorphological, ecological and socioeconomic perspectives*. *Coastal Dunes*, Springer: 355-369.

Moreno-Casasola, P. (1986). *Sand movement as a factor in the distribution of plant communities in a coastal dune system*. *Vegetatio* **65**(2): 67-76.

Morrison, D. A. and E. C. Morris (2000). *Pseudoreplication in experimental designs for the manipulation of seed germination treatments*. *Austral Ecology* **25**(3): 292-296.

Muñoz-Perez, J. J., de Seoane, C.L.V., Navarro-Pons, M. (2011). *Métodos generales de restauración de sistemas dunares*. *Sociedad española de Geomorfología*: 641-659.

Navarro-Pons, M., Román-Sierra, J., Caballero, I., Muñoz-Perez, J.J., Gómez-Pina, G., Fages-Antiñolo, L. (2010). *La importancia del estudio espacio-temporal para la*

gestión sostenible de las dunas móviles. X Jornadas Españolas de Costas y Puertos: 493-502

Prieto, F. J. G. (2009). *2120 Dunas móviles de litoral con Ammophila arenaria (dunas blancas)*. VV.AA., Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario en España. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino: 48p.

Prieto, F. J. G. and J. C. M. Reinoso (2009). *2130 Dunas costeras fijas con vegetación herbácea (Dunas grises)*. Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario en España. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino: 40p.

Royo, L. and A. Traveset (2009). *1210 Vegetación efímera sobre desechos marinos acumulados*. Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitats de interés comunitario en España, Madrid: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino: 68p.

Schütz, W. (2000). Ecology of seed dormancy and germination in sedges (*Carex*). *Perspectives in plant ecology, evolution and systematics* **3**(1): 67-89.

Seçkin Dinler, B. and M. Aksoy (2014). "Drought tolerance of knotgrass (*Polygonum maritimum* L.) leaves under different drought treatments."

Studio, R. (2014). "Integrated development environment for R (Version 0.98.1091)."

Tsoar, H. (2005). "*and dunes mobility and stability in relation to climate*. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **357**(1): 50-56.