

# DESARROLLO DE LOS PROTOCOLOS DE GERMINACIÓN Y VIABILIDAD DE SEMILLAS DE DOS ESPECIES DE INTERÉS PARA LA CONSERVACIÓN EN LA CAPV: UNA RUTÁCEA , *Haplophyllum linifolium* (L.) G. Don fil, Y UNA LILIÁCEA, *Lilium pyrenaicum* Gouan.

**Autor:** Asier Jáñez Ortiz de Landaluce

**Directores:** Agustí Agut Escrig y José Ignacio García Plazaola



Facultad de Ciencia y Tecnología/ZTF. Universidad del País Vasco/EHU, Leioa.

Desarrollado en el Banco de Germoplasma del Jardín Botánico de Olárizu (Centro de Estudios Ambientales-Ayuntamiento de Vitoria-Gasteiz).

Fecha inicio: 27 de Octubre de 2014

Fecha fin: 10 de Septiembre de 2015

Fecha presentación: 15 de Septiembre de 2015. Idioma: Castellano



# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. Resumen.....   | 5  |
| 2. Introducción.....  | 6  |
| 2.1. Contexto.....  | 6  |
| 2.2. Antecedentes.....  | 6  |
| 2.3. Caracterización del germoplasma.....                             | 7  |
| 2.3.1. Ensayos de viabilidad.....                                     | 8  |
| 2.3.1.1. Test de Conductividad.....                                   | 8  |
| 2.3.1.2. Test de Tetrazolio.....                                      | 9  |
| 2.3.1.3. Test de Catalasa.....  | 9  |
| 2.3.2. Ensayos de germinación.....                                    | 9  |
| 3. Interés y objeto de estudio.....                                   | 10 |
| 4. Material y métodos.....  | 11 |
| 4.1. Especies objeto de estudio.....                                  | 11 |
| 4.2. Censos poblacionales <i>Haplophyllum linifolium</i> .....        | 18 |
| 4.3. Ensayos de viabilidad.....                                       | 18 |
| 4.3.1. Test de Tetrazolio: Ajuste del procedimiento experimental..... | 19 |
| 4.3.2. Test de Tetrazolio: Metodología empleada .....                 | 20 |
| 4.3.3. Test de Catalasa: Ajuste procedimiento experimental.....       | 21 |
| 4.3.4. Test de Catalasa: Metodología empleada.....                    | 21 |
| 4.3.5. Test de Conductividad: Ajuste procedimiento experimental.....  | 21 |
| 4.3.6. Test de Conductividad: Metodología empleada.....               | 22 |
| 4.4. Ensayos de germinación.....                                      | 22 |
| 4.4.1. <i>Haplophyllum linifolium</i> y <i>Ruta montana</i> .....     | 22 |
| 4.4.2. <i>Lilium pyrenaicum</i> .....                                 | 24 |
| 4.5. Extracción semillas cámara conservación.....                     | 26 |
| 4.6. Desinfección.....  | 26 |
| 4.7. Medio de cultivo.....  | 26 |
| 4.8. Siembra y seguimiento de los ensayos.....                        | 26 |
| 4.9. Análisis de datos.....   | 27 |
| 4.10. Modelos estadísticos.....                                       | 28 |
| 5. Resultados.....  | 29 |
| 5.1. Censos poblacionales.....  | 29 |
| 5.2. Ensayos de viabilidad.....                                       | 30 |
| 5.2.1. Test de Tetrazolio.....  | 30 |
| 5.2.1.1. <i>Haplophyllum linifolium</i> y <i>Ruta montana</i> .....   | 31 |
| 5.2.1.2. <i>Lilium pyrenaicum</i> .....                               | 31 |

|   |    |
|---|----|
| 5.2.2. Test de Catalasa.....  | 33 |
| 5.2.2.1. <i>Haplophyllum linifolium</i> y <i>Ruta montana</i> ..... | 33 |
| 5.2.2.2. <i>Lilium pyrenaicum</i> .....                             | 34 |
| 5.2.3. Test de conductividad.....                                   | 34 |
| 5.2.3.1. <i>Haplophyllum linifolium</i> y <i>Ruta montana</i> ..... | 34 |
| 5.2.3.2. <i>Lilium pyrenaicum</i> .....                             | 35 |
| 5.3. Ensayos de germinación.....                                    | 35 |
| 5.3.1. <i>Haplophyllum linifolium</i> y <i>Ruta montana</i> .....   | 35 |
| 5.3.2. <i>Lilium pyrenaicum</i> .....                               | 38 |
| 5.4. Modelos estadísticos.....                                      | 41 |
| 6. Discusión.....   | 42 |
| 7. Conclusiones.....  | 45 |
| 8. Agradecimientos.....   | 46 |
| 9. Bibliografía.....  | 47 |

## 1. Resumen

*Haplophyllum linifolium* (L.) G. Don fil. subsp. *linifolium* es un endemismo ibérico que alcanza su límite de distribución septentrional en el sur del País Vasco. Esta planta se encuentra en peligro crítico de extinción (CR) en la CAPV, donde crece en terrazas fluviales arenosas, manteniendo una única población conocida en la actualidad.

*Lilium pyrenaicum* Gouan es un endemismo pirenaico-cantábrico, de área restringida y de hábitat muy específico y reducido, sin ningún factor de amenaza grave, pero cuyo estudio cobra especial relevancia al no existir prácticamente información de estudios sobre esta especie.

Los objetivos del estudio son: actualizar los censos poblacionales de *H. linifolium*, establecer la viabilidad de las semillas de ambas especies conservadas *ex situ*, definiendo el test más adecuado para su evaluación y establecer los protocolos óptimos de germinación de ambas especies. Estos datos son imprescindibles para realizar futuras acciones de conservación *in situ* como reintroducciones o refuerzos poblacionales.

En el estudio demográfico se han realizado censos poblacionales por estimación directa, en los que se ha comprobado la extinción de la población de *H. linifolium* de La Serna (Laguardia, Álava) y la persistencia de tan sólo dos individuos en la única población existente en la CAPV (Fontecha, Álava).

Para establecer la viabilidad de las semillas de ambos taxones se realizaron tres pruebas: Test de Tetrazolio, Test de Catalasa y Test de Conductividad. Se ha comprobado que el método más adecuado es el Test de Tetrazolio, obteniendo en *H. linifolium* un 64% de viabilidad y un 84% en *L. pyrenaicum*.

Por otra parte, se establecieron los protocolos óptimos de germinación realizando el análisis estadístico de los resultados, basado en el modelo de regresión binomial logística, mediante el software R. Se obtuvieron porcentajes de germinación de entre 40-45% para *H. linifolium*, en condiciones de 15, 20, 20/10 y 25/15 °C (12h luz/12h oscuridad) previo pretratamiento de estratificación fría (4°C, oscuridad, 60 días) y de 84% para *L. pyrenaicum*, tras combinar una estratificación templada (15°C, oscuridad, 60 días) con una estratificación fría (4°C, oscuridad, 60 días) y realizar una escarificación a los 30 días de introducir las semillas a condiciones de ensayo (15°C, 12h luz/12h oscuridad).

**Palabras clave:** *Haplophyllum linifolium*, *Lilium pyrenaicum*, protocolo óptimo de germinación, test de viabilidad, conservación *ex situ*, Regresión Binomial Logística

## **2.Introducción**

### **2.1 Contexto: biodiversidad vegetal en la Península Ibérica**

La Península Ibérica, con alrededor de 8.000 especies de plantas vasculares representa uno de los principales centros de diversidad del mediterráneo occidental, hecho que se debe tanto a las dimensiones geográficas del territorio como a la combinación de factores climáticos, orográficos, litológicos, y geográficos (Jiménez, 2008).

Las pautas geográficas de diversidad peninsular establecen que Pirineos y la Cordillera Cantábrica, además del Sistema Central, el Ibérico y las Sierras Béticas destacan como las zonas con mayor número de especies de flora vascular (Moreno, 2011). Además de su riqueza florística total, la Península ha sido destacada como el lugar del entorno mediterráneo y europeo que alberga el mayor número de endemismos (Fernández-González et al., 2008).

Tanto a nivel mundial como peninsular, la biodiversidad vegetal está disminuyendo a gran velocidad. La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) ha estimado que alrededor del 12,5% de las plantas vasculares en el mundo se encuentran bajo distintos grados de amenaza (Phartyal et al., 2002).

En España, según datos de la Lista Roja 2008 (Bañares et al., 2008) el número de plantas amenazadas ha ido incrementándose en los últimos años. Así, en 1984 se contabilizaron 1.095 taxones extintos o amenazados, mientras que en la Lista Roja 2000 la cifra aumentaba hasta los 1.149, alcanzando en la Lista Roja 2008 los 1.221, lo que representa casi un 15% de la flora vascular española.

En la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV), territorio de extensión reducida, pero con un patrimonio florístico rico en el ámbito de la comunidad Europea, la biodiversidad de plantas vasculares se ha visto igualmente reducida (Uribe-Echebarría, 2006).

### **2.2 Conservación activa de la biodiversidad vegetal: Bancos de Germoplasma**

Pese a que la mejor opción para proteger a una especie es conservar el hábitat en el que vive (conservación *in situ*), es imprescindible disponer de herramientas complementarias de conservación *ex situ*, es decir, fuera del hábitat natural, con el fin de asegurar a largo plazo y en situaciones de gran/elevada amenaza o peligro de extinción, la conservación de las especies vegetales. Para ello, estos programas de conservación almacenan a largo plazo germoplasma vegetal (Ferrer y Ferrando, 2013), definiendo germoplasma como cualquier material capaz de transmitir los caracteres hereditarios de una generación a otra (Witt, 1985). El germoplasma puede ser cualquier parte de la planta susceptible de ser propagada y/o mantenida a largo plazo, como las semillas, siendo estas las mejores capacitadas para la

recolección, transporte, almacenamiento, reproducción y cultivo debido a que constituyen un estadio del ciclo vital compacto, pequeño, resistente y longevo (Ferrer y Ferrando, 2013). Los centros encargados de conservar la biodiversidad contenida en el germoplasma reciben el nombre de Bancos de Germoplasma (Bachetta et al., 2008). En este contexto, el Jardín Botánico de Olárizu constituyó el Banco de Germoplasma Vegetal, que comenzó su actividad en el año 2011 con el objetivo de conservar a largo plazo la flora silvestre amenazada, endémica singular y rara de la Comunidad Autónoma del País Vasco (Agut, 2012). Para la consecución de este objetivo se conservan *ex situ* semillas de diferentes especies, como las especies objeto estudio de este trabajo.

### **2.3 Caracterización del germoplasma**

En los bancos de germoplasma existen dos tipos de colecciones, la colección base y la colección activa. La colección base tiene como objetivo la conservación de las semillas a largo plazo, mientras que la activa tiene como objetivo la disponibilidad de semillas para su uso a corto o medio plazo para ensayos de viabilidad, germinación y producción de planta, así como para el intercambio con otros bancos de germoplasma (conservación a medio plazo) (Bachetta et al., 2008). Las condiciones de almacenamiento del banco activo son de 12,5°C y 15% HR, mientras que las condiciones del banco base son -18°C y 5-10% HR.

A su vez, una de las funciones más importantes de estos centros es caracterizar el germoplasma conservado en los mismos. Los métodos principales que permiten caracterizarlo son los tests o ensayos de viabilidad y los ensayos de germinación.

Los primeros son métodos rápidos, indirectos y que no requieren grandes cantidades de semillas y permiten evaluar el estado fisiológico de las semillas almacenadas, mientras que los segundos requieren mayores cantidades de semillas e implican la germinación directa de las semillas, por lo que implican mayores períodos de tiempo.

Además de la caracterización del germoplasma, la obtención de los protocolos de germinación a partir de estos ensayos es un elemento sustancial en el proceso de conservación de las especies, ya que permite definir procedimientos susceptibles de repetición futura con suficientes garantías de éxito para la obtención de nuevas plantas (Ferrer y Ferrando, 2013).

### **2.3.1 Ensayos de viabilidad**

Las semillas viables son aquellas capaces de producir plántulas normales en un ensayo de germinación bajo condiciones favorables, después de que se haya roto la dormición y, si están afectadas por enfermedades, tras desinfectar las semillas (ISTA, 2003).

Pero las semillas sufren un envejecimiento continuo (principalmente oxidativo) que se acrecienta por factores como la humedad relativa, la temperatura y la atmósfera de almacenamiento. El envejecimiento de las semillas se produce incluso en los bancos de germoplasma, donde las condiciones de conservación tienden a ser las óptimas: humedad cercana al 5%, temperatura baja, ausencia de oxígeno. Este proceso se traduce en una pérdida progresiva de la viabilidad y por lo tanto, en una disminución de la eficiencia de germinación de los lotes de semillas conservados *ex situ* (Demirkaya et al., 2010).

Resulta por tanto patente la importancia de desarrollar métodos rápidos e indirectos de evaluación de viabilidad de las semillas, que eviten la necesidad de una prueba de germinación, particularmente en aquellos casos en que se estudian semillas latentes o que requieren un largo período para las pruebas germinativas.

Por otra parte, estas pruebas también tienen el objetivo de determinar la viabilidad de aquellas semillas no germinadas durante la prueba germinativa *ex situ* (Phartyal et al., 2002) y establecer la causa que explica por qué una muestra no presenta alto porcentaje de germinación, permitiendo conocer si las semillas presentan dormición, si están inhibidas o si están deterioradas y no van a ser capaces de germinar (Rodríguez et al., 2008).

Los métodos que han demostrado ser los más eficientes para analizar la viabilidad de las semillas conservadas en bancos de germoplasma son: Test de Tetrazolio, Test de Catalasa, Test de Electrolitos o Conductividad, Test de coloración con yoduro de potasio y yodo, Test de Índigo-carmín, y Test con diacetato de fluorescencia (Bachetta et al., 2008).

De ellos en el presente trabajo se optimizan y adecúan a nuestras condiciones experimentales: un indicador de actividad metabólica como el Test del Tetrazolio, un indicador de daño/integridad como el Test de la Conductividad y un indicador de actividad enzimática como el Test de la Catalasa.

#### **2.3.1.1 Test de Conductividad:**

La prueba de la conductividad eléctrica evalúa, mediante la determinación de iones lixiviados hacia la solución de imbibición, el grado de integridad de las membranas celulares (Soto y Valiengo, 2011). Cuanto mayor es la velocidad con la que la semilla es capaz de restablecer su integridad de la membrana, menor es la lixiviación de iones. Por lo tanto, el incremento en la conductividad eléctrica de la solución de imbibición medida a partir de

semillas de alta viabilidad será menor que la medida a partir de semillas de baja viabilidad (Casteillón, 2008; Milosevic et al., 2010).

#### 2.3.1.2 Test del Tetrazolio

El Tetrazolio es un indicador redox empleado para diferenciar tejidos metabólicamente activos de aquellos inactivos (Berridge et.al., 2005). Las células vivas del embrión de las semillas respiran activamente por lo que las deshidrogenasas, enzimas implicadas en la respiración celular, reaccionan con la solución de Tetrazolio, formando un compuesto insoluble de color rojo, que permite diferenciarlas de las células muertas que hay en la semilla, en las cuales el Tetrazolio conserva su color blanco o incoloro (Rodríguez et al., 2008).

La prueba topográfica del Tetrazolio es una prueba bioquímica que se emplea para evaluar de forma rápida la viabilidad de la semilla cuando (ISTA, 2003):

- Las semillas presentan latencia profunda.
- Las semillas son de germinación lenta.
- En casos donde se requiere una estimación muy rápida del potencial de germinación.
- Para determinar la viabilidad de las semillas al final de una prueba de germinación.

#### 2.3.1.3 Test de la Catalasa

La Catalasa es una enzima localizada en los peroxisomas cuya función es detoxificar el peróxido de hidrógeno que se produce como subproducto del metabolismo. Con el ensayo de la catalasa lo que se pretende es, por tanto, utilizar esta actividad enzimática de fácil determinación para evaluar el estado de la maquinaria bioquímica de las semillas objeto de estudio. Por tanto una disminución de esta actividad enzimática está correlacionada con una disminución de la viabilidad de las semillas, ya que disminuye la capacidad respiratoria y la energía, y por lo tanto, la germinación (Demirkaya et al., 2010).

### **2.4 Ensayos de germinación**

Además de la conservación, los Bancos de Germoplasma se encargan de desarrollar los protocolos de germinación (Ferrer y Ferrando, 2013), con los siguientes objetivos:

1. Elaborar el protocolo óptimo de germinación para cada taxón, que permita cultivar la planta en el laboratorio, para futuros planes de recuperación y reforzamiento poblacional optimizando el aprovechamiento de semillas (Gómez-Campo, 1985).
2. Determinar el potencial de germinación máximo de los lotes de semillas conservados en el Banco (ISTA, 2003).
3. Determinar la presencia de dormiciones que pueden presentar las semillas conservadas y la forma de romperlas (Agut et al., 2012).

4. Conocer mejor la fenología y ecología de la especie objeto de estudio, explicar las características de su ciclo reproductivo y su relación con las condiciones ambientales específicas que permiten su germinación (Agut et al., 2012).

### 3. Interés y objetivo de estudio

En este estudio se establecen los protocolos de germinación y los protocolos para el estudio de la viabilidad de semillas de dos especies de interés para la conservación en la CAPV: una Rutácea, *Haplophyllum linifolium* (L.) G. Don fil. y una Liliácea, *Lilium pyrenaicum* Gouan. En el caso de *H. linifolium* se ha estudiado como referencia otra especie perteneciente a la misma familia y con la que comparte hábitat y ecología en el País Vasco y sobre la cual no existe ningún tipo de amenaza actual: *Ruta montana*(L.) L.

Por una parte, *Haplophyllum linifolium* es un endemismo mediterráneo ibérico que se encuentra en peligro crítico de extinción (CR) en el País Vasco, donde persiste una única población con tan solo 2 individuos. De ahí la importancia de su conservación *ex situ* y el estudio de su protocolo de germinación y la viabilidad de sus lotes de semillas, cuestiones imprescindibles para poder realizar acciones de conservación *in situ* como reintroducciones o refuerzos poblacionales que aseguren la pervivencia de la única población vasca en la actualidad.

Por otra parte, *Lilium pyrenaicum* es un endemismo pirenaico-cantábrico, de área restringida y de hábitat muy específico y reducido, sin ningún factor de amenaza grave, pero cuyo estudio cobra especial relevancia al no existir prácticamente información de estudios germinativos, de viabilidad y sobre su conservación *ex situ* previos, a diferencia de los estudios existentes sobre otras especies europeas del género *Lilium* (Paric et al., 2008).

En cambio, *Ruta montana* es un taxón común, y de amplia distribución que no está amenazados ni protegido ni tienen ninguna dificultad para cerrar su ciclo vital. Comparte hábitat y ecología con *H. linifolium* y sus semillas tienen características morfológicas y fisiológicas similares, el cuál fue estudiado con el objetivo de comparar los resultados con *H.linifolium* para establecer las causas por las que este taxón tiene más dificultades germinativas y una distribución más restringida.

## **4. Material y métodos**

### **4.1. Especies objeto de estudio**

#### **4.1.1 *Haplophyllum linifolium* (L.) G. Don fil.**

-Familia: *Rutaceae*

-Género *Haplophyllum*

El género *Haplophyllum* pertenece a la familia *Rutaceae*. Más de 70 especies de este género crecen desde la región mediterránea hasta el este de Liberia. En cambio, sólo 8 pueden encontrarse en Europa, y, en concreto, *Haplophyllum linifolium* (L.) G. Don fil. es endémica de España (Iñigo et al., 2002; Navarro et al., 2004).

-Descripción



**Figura 1:** *H. linifolium* en Cabriana (Miranda de Ebro). Fuente: elaboración propia

Mata o pequeño arbusto de 26-82cm. Tallos erectos, en general pelosos con pelos blanquecinos, finos y ensortijados. Hojas elípticas, a veces lanceoladas, sésiles o cortamente pecioladas, en general enteras, a veces trifidas con 2 pequeños segmentos en la base. Inflorescencia de 4-55 flores, en cima, corimbiforme. Ovario peloso. Cápsula 4-6mm, con frecuencia de aspecto rugoso debido a las glándulas, de ápice peloso. A diferencia de otras especies del género *Ruta*, que tienen estambres lapiños, los estambres de *H. linifolium* tienen filamentos pelosos en la base (Uribe-Echebarría, 2006; Castroviejo, 2005).

### -Ecología

Habita en claros secos, coscojares y romerales, bordes de camino, cultivos, pastos pedregosos, claros y orlas de encinar. Preferencia por substratos básicos y en ocasiones en suelos nitrificados, con rango altitudinal de 400-700m. (Aizpuru et.al., 1999).

### -Fenología

|                |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Floración      | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |
| Fructificación | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |

Fuente: (Aizpuru et.al., 1999)

### -Área de distribución

Se extiende por la región mediterránea occidental, área de la que es endémica. En la Península Ibérica se reparte por áreas mediterráneas con clima continentalizado, ocupando especialmente las depresiones interiores sedimentarias. En la gran depresión del Ebro alcanza su límite de distribución NW. En el País Vasco existían dos poblaciones en Fontecha y Laserna San Rafael (Álava), existiendo una localidad intermedia en los alrededores de Miranda de Ebro (Burgos).

La población de Fontecha, cuya existencia ha confirmado la Diputación Foral de Álava en 2013, se encuentra a escasos metros del límite de la ZEC río Ebro (BOPV, 2011; Gobierno Vasco, 2014).

La otra población ubicada en Laserna-San Rafael (Laguardia, Álava) se da por desaparecida.



**Figura 2:** Arriba) área distribución de la especie en la Península. Fuente: GBIF. Abajo: área distribución de la especie en la CAPV. Fuente: BOPV, 2001.

### -Amenazas y figuras de protección

Es una de las plantas vasculares más amenazadas de la CAPV. La desaparición de una de las dos poblaciones conocidas en Álava y el grave retroceso experimentado por la segunda población avalan el que se considere la planta como en previsible riesgo de extinción local a corto o medio plazo. En 1999 se censaron 6 ejemplares en un área de 10 m<sup>2</sup> en la localidad de Fontecha, mientras que en 2001 y 2008 se contaron 2 ejemplares en el mismo lugar. En 2013 realizamos el censo desde el Jardín Botánico de Olárizu y tan solo persistían dos individuos. Al ser una población tan pequeña, puede verse afectada por las actividades de la zona (acumulación de leñas, aparcamiento de vehículos, quema de rastrojos, roturaciones)

(BOPV, 2011). La Diputación Foral de Álava ha efectuado actuaciones de protección (cercamiento) entorno a esta población de *H. linifolium* presente en Fontecha. Fruto de estas actuaciones, una planta ha florecido y fructificado en 2012 y 2013, habiéndose procedido a la recogida de semillas con destino al Banco de Germoplasma del Jardín Botánico de Olárizu, con la finalidad de futuras germinaciones y posibles siembras y reintroducciones en el hábitat (Gobierno Vasco, 2014).


En cuanto a las figuras de protección, esta especie está catalogada en el Catalogo Vasco de Especies Amenazadas como especie **En peligro crítico de extinción (CR)**, en la LISTA ROJA DE LA CAPV (CATEGORIAS REGIONALES UICN) como **especie en peligro crítico de extinción** (Fecha catalogación 02/2010) y en la Lista de especies de interés prioritario en la CAPV: conocimiento bajo (BOPV, 2011).

#### -Requerimientos germinativos

Ante la ausencia de pruebas germinativas de esta especie, se ha recopilado información de especies del mismo género y con características similares. Algunos autores (Baskin y Baskin, 2014) mencionaban como para una especie de *Haplophyllum*, era necesario realizar una estratificación como pretratamiento germinativo, con el objetivo de romper una dormición fisiológica.

#### -Características de las semillas:

Las semillas de *H.linifolium* empleadas para la realización de este estudio pertenecen al Banco activo. Estas semillas fueron recolectadas en la población de *H.linifolium* más cercana a la CAPV, localizada en Cabriana (Miranda de Ebro).

|   |  |
|---|--|
| <b>Talla</b>  | 1.2x1.8mm.   |
| <b>Estado de conservación</b>   | Banco activo   |
| <b>Contorno</b>   | Reniforme  |
| <b>Ornamentación</b>  | Foveolada  |
| <b>Color</b>  | Marrón   |
| <b>Sección</b>  | Circular   |
| <b>Número de cotiledones</b>  | Dicotiledónea  |
|  |  |

**Fuente:** elaboración propia, Jardín Botánico de Olárizu

#### 4.1.2 *R. montana* (L.) L.

-Familia: *Rutaceae*

-Género: *Ruta*

-Descripción



Figura 3: *R. montana*. Fuente: Herbario digital

Hierba perenne, leñosa en la base, hasta de 70 cm, de color verde-azulado, ± pálido o grisáceo. Hojas en general agrupadas en la base de las ramas formando una roseta, glabras y ± pruinosas. Inflorescencia densa, con glándulas esferoidales y pelos glandulíferos; rama terminal con (3)6-10(12) flores. Receptáculo con disco anular de 1-1,4 mm de diámetro. Sépalos (1,6)2,2-3,4 × 0,6-1,4 mm, triangular-lanceolados, enteros, de ápice agudo, con glándulas y algunos pelos glandulíferos. Pétalos 3,0-6,5 mm, erectos, de enteros a ligeramente ondulados, de amarillos a verdosos, con glándulas más grandes en torno al nervio central. Estambres con filamentos de 3,0-4,9 mm.

(Castroviejo, 2005).

-Ecología

Habita en pastos secos con poco suelo en claros de carrascal y quejigal, y en terrazas fluviales. Rango altitudinal 250-750m (Aizpuru et.al.,1999).

-Fenología

|                |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Floración      | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |
| Fructificación | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |

Fuente: (Castroviejo, 2005, Aizpuru et.al.,1999)

-Área de distribución


Especie frecuente en gran parte de la Península Ibérica, escasa en Baleares y en el tercio norte, ausente en la Cornisa Cantábrica y en las regiones costeras de Galicia (Castroviejo, 2005).



**Figura 4:** área distribución de la especie. Fuente:GBIF

-Características de las semillas

Las semillas de Ruta empleadas para la realización de este estudio pertenecen al Banco activo

|   |               |
|---|---------------|
| Talla   | 1.3x1.9mm     |
| Estado de conservación  | Banco activo  |
| Contorno  | Reniforme     |
| Ornamentación   | Foveolada     |
| Color   | Marrón        |
| Sección   | Circular      |
| Número de cotiledones   | Dicotiledónea |
|  |               |

Fuente: elaboración propia, Jardín Botánico de Olárizu

#### **4.1.3 *Lilium pyrenaicum* Gouan**

-Familia: *Liliaceae*

-Género: *Lilium*

El género *Lilium* abarca a 100 especies distribuidas en el Hemisferio Norte (Paric et al., 2008). Las semillas de las especies de este género poseen dormiciones fisiológicas profundas, y varios son los autores que han explicado la dificultad de estas semillas para obtener germinaciones (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Paric et al., 2008;. Dhyani et al., 2013).

## -Descripción



**Figura 5:** *L.pyrenaicum* en Castillo (Álava). Fuente: elaboración propia

Hierba perenne, bulbosa. Bulbo de 3-8cm de diámetro, globoso; escamas rosadas. Tallo 30-110 cm, verde, glabro. Hojas todas primaverales, alternas, muy próximas entre si, de linear-lanceoladas a estrechamente lanceoladas, glabras, papilosas en el margen, brillantes; las de la parte media 6-12 x 0,4-1,2cm; las de los extremos algo menores, más aplicadas; las de la base de la inflorescencia opuestas o verticiladas.

Racimo con 1-8(12) flores, alternas, opuestas o verticiladas, péndulas en la antesis; brácteas solitarias, en parejas o grupos más numerosos, semejantes a las hojas, algo reducidas, glabras, papilosas en el margen; pedicelos patentes, recurvados en el extremo en la floración. Flores no aromáticas. Perianto estrellado; tépalos 25-40 x 10-21mm, marcadamente recurvados, anchamente lanceolados, amarillos, en ocasiones verdosos o anaranjados, con manchas negras, brillantes; nectario negro. Filamentos estaminales 30-40 mm, verdes; anteras 8-10mm, verdes, con polen de un rojo-anaranjado oscuro, no aromático (Castroviejo, 2005).

## -Ecología

Crece en herbazales frescos así como en megaforbios de pies de roquedos y cantiles (Remón et al., 2009), claros de bosques de hoja caduca, siempre con cierta humedad edáfica. No soporta la sombra densa, habita en suelos muy secos, básicos (pH mayor de 6) y pobres en nitrógeno.

Es una planta característica de la orden *Fagetalia sylvaticae*, comunidades dominadas por mesofanerófitos caducifolios, creadores de un ambiente nemoral (bosques), mesófilas y ombrófilas propias de suelos meso-eútrofos y de óptimo eurosiberiano. Rango altitudinal: 0-2400 m (Castroviejo, 2005; Asturnatura, 2004).

#### -Fenología

|                |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Floración      | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |
| Fructificación | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |

Fuente: ( Aizpuru et.al., 1999)

#### -Área de distribución

Se distribuye por el sur de Francia y norte de la Península Ibérica. En la Península Ibérica se distribuye por el Pirineo y Montes Cantábricos, con buena presencia en el este del País Vasco. En los Pirineos se distribuye en ambas vertientes, principalmente en los macizos montañosos, faltando en las tierras próximas al mar mediterráneo (Atlas de la Flora de Aragón, 2005; Aizpuru et.al., 1999).



**Figura 6:** área distribución especie.  
Fuente: GBIF

#### -Amenazas y figura de protección



Endemismo pirenaico-cantábrico (Aizpuru et.al., 1999; Llamas et al., 2007), catalogada como “de atención preferente” en el anexo III del Catálogo de Flora Protegida de Castilla y León (Decreto 63/2007).

#### -Requerimientos germinativos

Debido a la ausencia de estudios germinativos de esta especie, se han recopilado datos de distintas pruebas germinativas realizadas por otros autores para especies del mismo género y con hábitats y características similares, además de los datos recopilados en la base de datos de Seed Information Data Base of the Royal Botanic Gardens (Seed Database, 2008). Varios autores (Nikolaeva, 1977; Baskin y Baskin, 1989; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Paric. et.al., 2008; Baskin y Baskin, 2014; Dhiany et al., 2014) confirman la existencia de una dormición morfo fisiológica profunda (MPD) en especies de este género. A su vez, proponen como método para romper esta dormición y posibilitar así la germinación la combinación de dos estratificaciones, una fría, simulando las temperaturas invernales (4°C aprox.) y una templada, simulando temperaturas otoñales (15°C).

### -Características de las semillas.

Las semillas de *Lilium* empleadas para la realización de este estudio pertenecen tanto al banco activo como al banco base.

|   |  |
|---|--|
| <b>Talla</b>  | 6-8 x 5-7mm  |
| <b>Características Morfológicas</b>   | Circumalada  |
| <b>Estado de conservación</b>   | Banco activo y Banco base  |
| <b>Contorno</b>   | Obtriangular   |
| <b>Ornamentación</b>  | Ruminada   |
| <b>Color</b>  | Marrón   |
| <b>Sección</b>  | Plana  |
| <b>Número de cotiledones</b>  | Monocotiledónea  |
|  |  |

**Fuente:** elaboración propia, Jardín Botánico de Olárizu.

### **4.2. Censos poblacionales de *Haplophyllum linifolium***

Se realizaron censos poblacionales por estimación directa en la población más cercana a la CAPV (Cabriana, Miranda de Ebro), así como en la población de Fontecha (Álava) y en la otra población de la CAPV, ubicada en La Serna-San Rafael (Laguardia, Álava).

### **4.3. Ensayos de viabilidad**

Los ensayos de viabilidad se realizaron con las semillas originales (T0) tanto del banco activo como del banco base. Con el fin de obtener información adicional se emplearon también las semillas no germinadas al finalizar los tratamientos control de los ensayos de germinación (T1) y con las semillas no germinadas al finalizar el ensayo de germinación a los diferentes pretratamientos y termoperiodos (T2).

Debido al número disponible de semillas finalizado el control (T1), se midió la conductividad para cada uno de las temperaturas de ensayo. En cambio, la conductividad de las semillas no germinadas durante el ensayo (T2) se realizó seleccionando una muestra aleatoria.

#### **4.3.1. Test de Tetrazolio: Ajuste del procedimiento experimental**

En primer lugar se optimizó el protocolo experimental (ISTA, 2003) empleando semillas de lentejas (*Lens culinaris*) de producción ecológica. Con el fin de evaluar adecuadamente la viabilidad de las semillas mediante esta prueba, es necesario exponer el embrión y otras estructuras esenciales a la sal de tetrazolio. En este caso, al tratarse de una leguminosa, se realizó una escarificación manual, la cual consistió en una abrasión con lija de los tegumentos externos para permitir de este modo la imbibición de las semillas (Rao et.al., 2007).

-Posteriormente, las semillas se hidrataron durante 24 horas con agua destilada.

-Tras este período, las semillas se sumergieron en una solución 1% de 2,3,5- Cloruro de trifetil tetrazolio a temperatura ambiente durante 18 horas (ISTA, 2003).

Con el fin de determinar el efecto de la luz se realizaron 8 réplicas de 25 semillas cada una, la mitad de las cuales se mantuvieron en oscuridad y la otra mitad en condiciones de iluminación

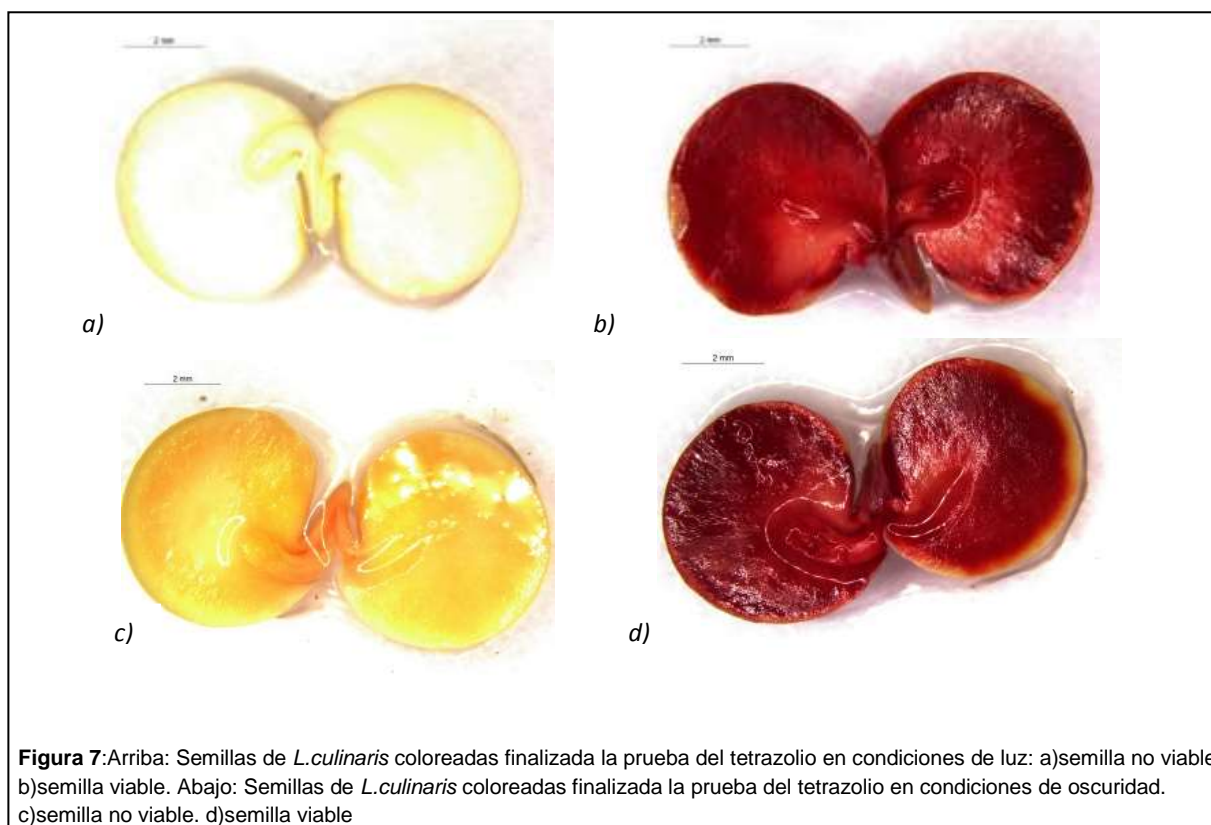
-Cada una de las réplicas fue embebida en 25 ml de la solución 1% de tetrazolio (Bachetta et al., 2008; ISTA, 2003).

-Pasadas 6 horas, se evaluó la viabilidad de las semillas siguiendo los criterios de la International Seed Test Assotiation (ISTA, 2003), comparando las áreas del embrión coloreadas en cada casao y, clasificando las semillas en las siguientes categorías:

- viables: (embrión y endospermo teñidos uniformemente de rojo, brillante y lustroso en su cara interna)

-no viables: (embriones blancos o con la radícula y/o el endospermo completamente blancos)

-viabilidad limitada: semillas cuya tinción no pueden encuadrarse en ninguno de los grupos anteriores (cuando las semillas tienen manchas blancas o claras distribuidas irregularmente por el endospermo o en el embrión, o cuando el rojo es poco intenso)



#### 4.3.2. Test de Tetrazolio: metodología empleada

Finalizado el ensayo para establecer el procedimiento experimental, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se optó por realizar el test en condiciones de oscuridad, con las especies objeto de estudio, puesto que la coloración en estas condiciones fue mejor. Se siguió el protocolo descrito anteriormente pero el tratamiento con Tetrazolio se prolongó durante 24 horas, para obtener una coloración más completa.

Para exponer el embrión y demás estructuras a la solución de Tetrazolio, en las semillas de *H. linifolium* y *R. montana*, se realizó un corte transversal empleando una lupa microscópica y bisturí. En cambio, para exponer el embrión de las semillas de *Lilium pyrenaicum* se realizó una escarificación de la testa.

Pasadas las 24 horas de imbibición, se realizó la evaluación de cada una de las semillas empleando un equipo de microscopía estereoscópica apocromática Leica S8APO, obteniendo las imágenes digitales mediante el software asociado a dicho equipo, Leica LAS. Los criterios de identificación visual fueron los propuestos por la International Seed Association (ISTA, 2003) para especies del género *Lilium* y *Ruta*.

#### **4.3.3. Test de Catalasa: Ajuste procedimiento experimental**

Ante la ausencia de protocolos estandarizados para la realización de este test para las especies objeto de estudio, se realizaron pruebas con semillas de lenteja (*Lens culinaris*) de producción ecológica hasta establecer el procedimiento experimental.

La actividad de la enzima catalasa se mide mediante la reducción del peróxido de hidrógeno. En los lotes viables, el peróxido se debería reducir en 6-12 horas, mientras que en los no viables no se elimina incluso después de 18-24 horas (Bachetta et al., 2008).

Previamente a la realización de los ensayos, se empleó un baño de hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos para desinfectar las semillas y posteriormente se lavaron con agua destilada. Posteriormente, se preparó la disolución de peróxido 33%p/v, y se embebieron 4 réplicas de 10 semillas cada una en un volumen de 10mL de esta disolución.

La concentración de peróxido se midió cada hora durante las 3 primeras horas, hasta que se redujo el peróxido por completo. Para la determinación del peróxido de hidrógeno se emplearon tiras reactivas semicuantitativas Quantofix (1-100mg/L).

En otro ensayo paralelo se determinó la actividad catalasa en un lote de semillas sometidas a un envejecimiento acelerado (3 horas a 90 °C), y observándose que tras la incubación de las 24 horas la concentración de peróxido fue la misma que a tiempo =0.

#### **4.3.4. Test de Catalasa: metodología**

En base a los resultados expuestos anteriormente (4.3.3), se estableció como el protocolo más adecuado para realizar la medida de la actividad catalasa en las especies objeto de estudio, la realización de medidas cada hora (durante las 6 primeras horas) y a las 24, 26 y 28 horas de imbibición.

#### **4.3.5. Test de conductividad: Ajuste del procedimiento experimental**

Para realizar el ajuste experimental se emplearon semillas de lenteja (*Lens culinaris*) de producción ecológica. En primer lugar, se prepararon 8 lotes de 25 semillas cada uno que se pesaron empleando una microbalanza de precisión. A continuación, siguiendo el protocolo de conductividad del Banco de Germoplasma del Jardín Botánico de Olárizu, se incubaron las semillas en viales de vidrio con 10 ml de agua desionizada durante 24 horas. Se realizaron tres tipos de ensayos: Por una parte, se midió la conductividad de 4 lotes en el momento de la imbibición y cada dos horas pasadas las 24 horas, empleando un conductímetro Crison Basic 30.

Por otra parte, para los cuatro lotes restantes, la medida se realizó en el momento de la imbibición, cada dos horas durante las primeras 8 horas de imbibición, repitiendo las medidas pasadas las 24, 48, 72 y 96 horas, a temperatura de 20,9°C.

Finalmente una réplica de estas semillas fue sometida a un envejecimiento acelerado (90°C durante 4 horas). Se midió la conductividad a tiempo cero y a las 24 y 96 horas registrando los mismos valores. La conductividad se incrementó hasta 1400  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , siendo este el valor indicativo de una pérdida completa de la viabilidad. (Soto y Valiengo, 2011).

Finalmente se compararon los resultados de los dos tipos de medida realizados y se estableció como método óptimo para la medida de la conductividad de las especies objeto de estudio la segunda metodología ensayada.

#### **4.3.6. Test de conductividad: metodología**

Una vez comparados los resultados de los dos tipos de medida realizados en el ajuste del procedimiento experimental, se estableció como método óptimo para la medida de conductividad de las especies objeto de estudio la segunda metodología ensayada, que consiste en la medición de la conductividad en el momento de la imbibición, cada dos horas durante las primeras 8 horas de imbibición y pasadas las 24, 48, 72 y 96 horas.

#### **4.4. Ensayos de germinación**

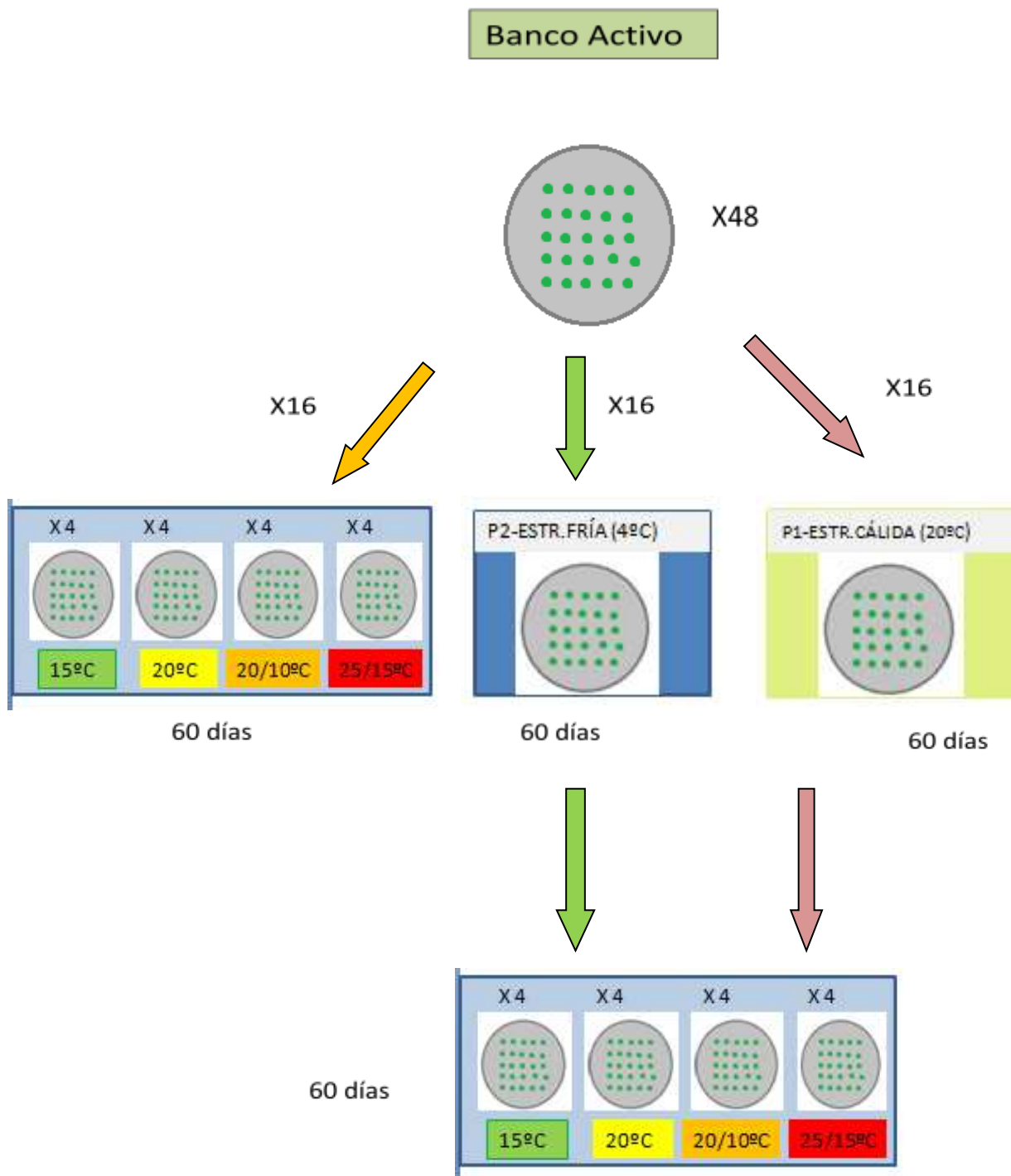
Como paso previo en función, tanto de las características ecológicas de las especies estudiadas como de otros estudios disponibles sobre las mismas especies, o en su defecto, para otras especies cercanas del mismo género en las fuentes bibliográficas consultadas y en la Base de Datos de Semillas del Jardín Botánico de Kew (Seed Database, 2008), se establecieron los pretratamientos y las condiciones de germinación en las que se iban a realizar los ensayos. Teniendo en cuenta los requerimientos germinativos óptimos conocidos y las recomendaciones en cuanto a los pretratamientos necesarios para romper las dormiciones u obtener los mejores resultados.

##### **4.4.1. *Haplophyllum linifolium* y *Ruta montana***

Las semillas de especies del género *Ruta* pueden presentar dormiciones fisiológicas que impiden la germinación, siendo la temperatura de germinación de especies de este género 20-25°C (Baskin y Baskin, 2014).

Con el objetivo de romper esta dormición, se realizaron dos estratificaciones distintas, una fría y otra cálida, para determinar cuál de las dos favorece la germinación. Se sembraron 25 semillas por placa y 4 réplicas por tratamiento para *Ruta montana* y *Haplophyllum linifolium*.

Se establecieron dos condiciones de estratificación y un control: Estratificación cálida (P1) (60 días a 20°C), Estratificación fría (P2) (60 días a 4°C) y Control (sin pretratamiento). Posteriormente las condiciones de ensayo establecidas fueron las cuatro siguientes: 20°C, 15°C, 20/10°C y 25/15°C con fotoperíodo 12/12 h luz/oscuridad en todos los casos (Figura 8).



**Figura 8:** tratamientos realizados para los ensayos de germinación en *H.linifolium* y *R.montana*

#### **4.4.2. *Lilium pyrenaicum***

Se sembraron 10 semillas por placa y 5 réplicas por tratamiento. Los ensayos se realizaron con semillas del Banco activo (almacenadas a 12,5°C y 15%HR) y del Banco base (5-10% HR y conservadas a -18°C), con el objetivo de comparar ambos estados de conservación

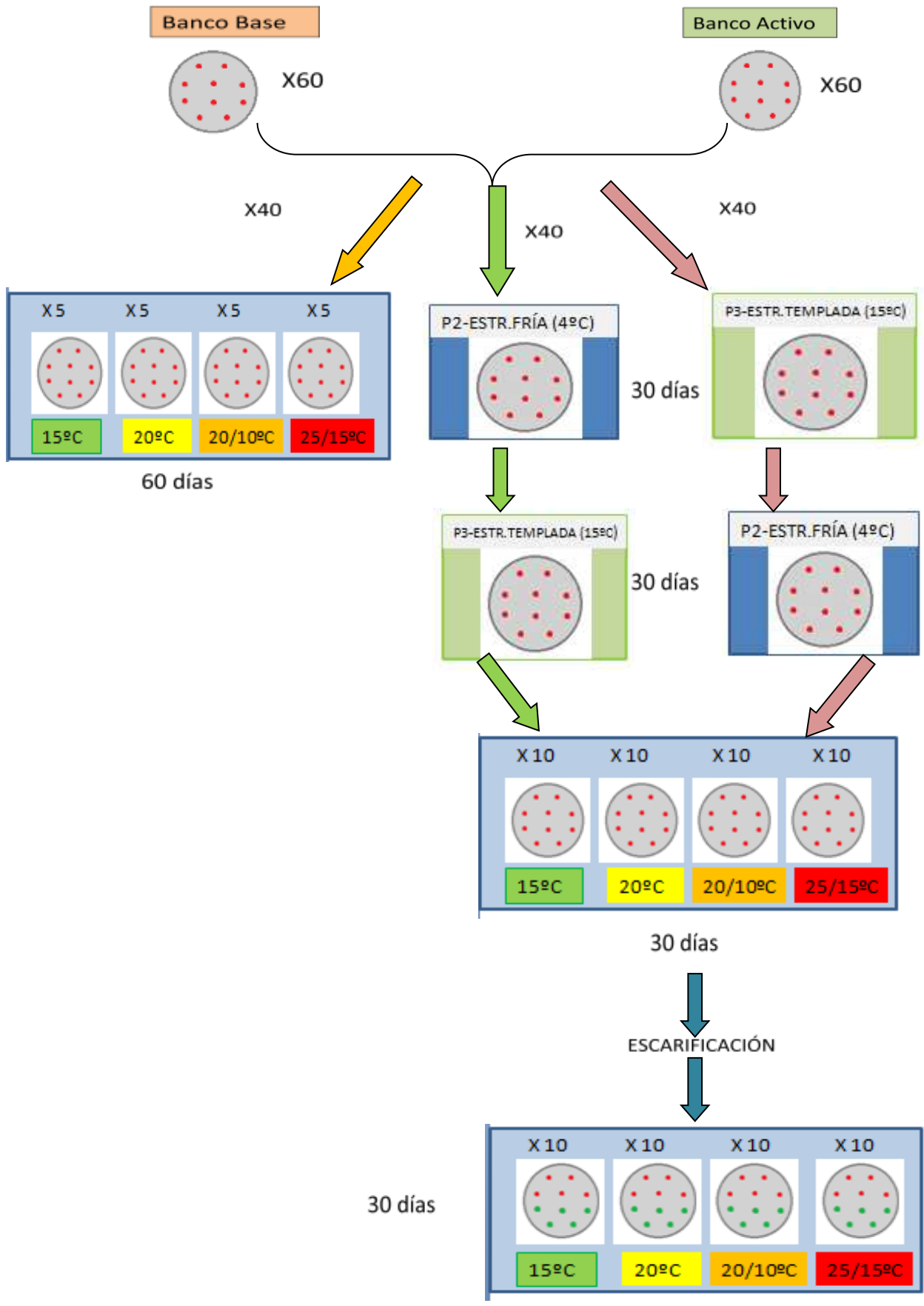
Como se ha descrito en el apartado 4.1.3., las especies del género *Lilium* presentan una dormición morfofisiológica profunda que impide la germinación. Con el objetivo de romper dicha dormición, y según los estudios analizados (Baskin y Baskin, 1989; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Paric et.al., 2008; Baskin y Baskin, 2014) se realizaron pretratamientos germinativos. Estos consistieron en una combinación de estratificaciones como paso previo al ensayo. El esquema seguido en cada caso fue el siguiente (Figura 9):

- Estratificación fría (P2) (4°C/60días) + Estratificación templada (P3) (15°C/60días) + condiciones ensayo(30 días)+escarificación a los 30 días de iniciar condiciones ensayo de la mitad de las semillas

- Estratificación templada (P3) (15°C/60días) + Estratificación fría (P2) (4°C/60días) + condiciones ensayo(30 días) + escarificación a los 30 días de iniciar condiciones ensayo de la mitad de las semillas

- Control (condiciones de ensayo, sin estratificaciones y sin escarificación)

-Las condiciones de ensayo establecidas para las especies fueron las cuatro siguientes: 20°C, 15°C, 20/10°C y 25/15°C con fotoperíodo 12/12 h luz/oscuridad día/noche.



**Figura 9:** tratamientos realizados para los ensayos de *L.pyrenaicum*

#### **4.5.Extracción de semillas de la cámara de conservación:**

Las muestras de semillas de los taxones objeto de estudio conservadas en la cámara de conservación (-18°C) y en la cámara de secado se seleccionaron aleatoriamente. Antes de proceder a las siembras, se realizó un proceso de paulatina rehidratación y atemperamiento de las semillas.

Las semillas conservadas en la sala de conservación se extrajeron y se depositaron en la cámara de secado durante 24 horas (temperatura media 12,5°C y 15% HR). Posteriormente, junto con las semillas ultradesecadas, todas las muestras de semillas se extrajeron de la cámara de secado al laboratorio durante otras 24 horas, en condiciones ambientales de laboratorio, manteniéndolas expuestas a las condiciones ambientales de laboratorio de temperatura y humedad (con valores medios de 20°C y 40% HR) durante otras 24 horas.

Seguidamente, las semillas fueron introducidas en un envase hermético en ambiente saturado de humedad y temperatura ambiental durante otras 24 horas. Finalmente, las semillas fueron sembradas, como se describe a continuación.

#### **4.6. Desinfección**

Con el objetivo de eliminar la contaminación fúngica del medio de cultivo., como paso previo a la siembra, se realizó una desinfección superficial de las semillas empleando hipoclorito de sodio al 1% durante 20 minutos (García et al., 2007; Bachetta et al., 2008; Álvarez et al., 2010). Posteriormente se realizaron varios lavados con agua destilada con el fin de eliminar restos de hipoclorito.

#### **4.7. Medio de cultivo**

El medio de germinación empleado fue Agar al 1% (Bachetta et al., 2008; Agut, 2013). El Agar se esterilizó mediante autoclavado (20 min a 121°C). Se dejó enfriar y se procedió al plaqueado en condiciones asépticas. Para ello, el plaqueado fue realizado en la cabina de flujo laminar. Una vez que se solidificó el Agar, se procedió a sembrar las semillas.

#### **4.8. Siembra en placa de Agar y, seguimiento de los ensayos**

La siembra se realizó en la cabina de flujo laminar en condiciones asépticas en placas Petri con Agar que posteriormente fueron selladas con Parafilm. Los recuentos de germinación se realizaron tres veces por semana ( Lunes, Miércoles y Viernes).

Las semillas germinadas en Agar durante los ensayos se sembraron en bandejas de alveolo forestal con sustrato universal, a excepción de *H. linifolium*, para la cual se realizó un sustrato con las siguientes características debido a su ecología y su hábitat natural: Sustrato universal 60%, Vermiculita 7%, Arena 33%.

Las bandejas se mantuvieron en las cámaras de germinación durante las primeras fases del desarrollo de las plántulas, anotando fechas de emergencia, baja y aparición de hojas verdaderas de las mismas.

Posteriormente, se transportaron al invernadero del Jardín Botánico de Olárizu, con fotoperiodo solar y riego automático.

#### 4.9. Análisis de datos:

Una vez finalizados los ensayos, los resultados se expresaron gráficamente mediante la curva de germinación obtenida en cada una de las condiciones de ensayo y se calcularon los siguientes parámetros germinativos para cada especie, con el objetivo de establecer el protocolo óptimo de germinación.

-Velocidad de germinación ( $T_{50}$ ): corresponde al tiempo necesario para obtener el 50% de la capacidad germinativa del lote (Come, 1970).

$$T_{50} = \frac{[(N/2) - N_1] \cdot (T_2 - T_1)}{N_2 - N_1} + T_1$$

donde: N= porcentaje final de semillas germinadas,  $N_1$ =porcentaje de semillas germinadas por debajo de N/2,  $N_2$ = porcentaje de semillas germinadas por encima de N/2,  $T_1$ = número de días que corresponden a  $N_1$ , y  $T_2$ = número de días que corresponden a  $N_2$ .

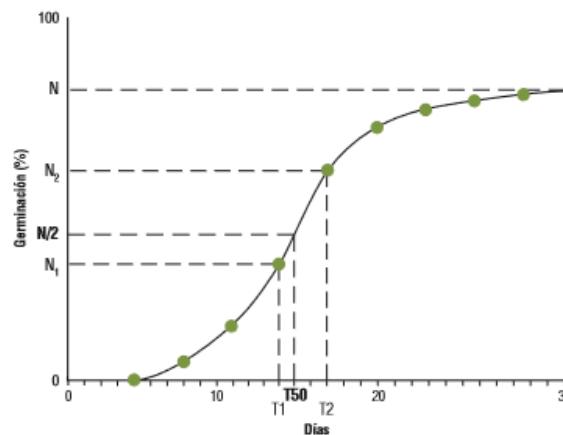


Figura 10: gráfica teórica para el cálculo de  $T_{50}$  ( Ferrer y Ferrando, 2013).

-Retardo germinativo: tiempo necesario para observar la primera semilla germinada (Bachetta *et.al.*, 2008).

-Tiempo medio de germinación (GMT): permite conocer el tiempo medio de germinación de las semillas analizadas (Bachetta *et.al.*, 2008).

$$GMT = \frac{\sum n_i \cdot d_i}{N}$$

Donde:  $n_i$  = nº de semillas germinadas en el día  $d_i$ ,  $n^\circ$  de días desde el inicio del ensayo de germinación, y  $N$  = nº total de semillas germinadas al final del ensayo.

-Valor Pico es el porcentaje de germinación en un punto T respecto al número de días necesario para alcanzar este punto.

$$Vp = \frac{\% \text{Germinación en T}}{\text{Punto T (días)}}$$

Donde el punto T es el punto en que se corta la curva de germinación y una recta tangente a la misma desde el origen, e indica el momento en que la velocidad de germinación comienza a descender (Bachetta *et al.*, 2008).

-Germinación Media Diaria: indica el porcentaje de semillas que germina cada día (Bachetta *et.al.*, 2008).

$$GMD = \frac{\% \text{Germinación total}}{\text{Duración del ensayo}}$$

-Vigor de Germinación o Valor Germinativo: relaciona los parámetros Valor Pico (VP) y Valor de Germinación media diaria (GMD) y mide la calidad germinativa resultante de ambas variables. Un mayor valor indica mejor calidad germinativa (Bachetta *et.al.*,2008).

$$VG = GMD \cdot VP$$

#### **4.10. Herramientas estadísticas**

Los datos empleados para realizar el análisis estadístico fueron los obtenidos de los ensayos de germinación, para conocer si existen diferencias significativas entre unas condiciones de ensayo y otras y entre unos pretratamientos y otros. Estos datos se trataron con el software estadístico R (R Development Core Team, 2015).

El procedimiento seguido atiende a un modelo de ensayo de Bernoulli:

-La variable aleatoria se ajusta a dos resultados posibles: éxito o fracaso, donde  $p$  es la probabilidad de éxito (valor esperado de la variable aleatoria) y su varianza es  $p(1-p)$ .

-El resultado de cada ensayo es independiente de los obtenidos en ensayos anteriores. Por tanto, la germinación o no de cada semilla se considera como un éxito o fracaso respectivamente.

-El cambio de  $p$  se modela a lo largo de un gradiente de temperatura. Dados  $n$  ensayos de Bernoulli (donde  $y_i$   $i=1,2,3,\dots,n$ ), el modelo de regresión logístico con independencia de la probabilidad del éxito  $p_i$  [ $P(Y_i = 1)$ ] en los valores correspondientes a las  $k$  variables explicativas  $x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ik}$  puede ser escrito como (Hosmer y Lemeshow, 1989):

$$\ln\left(\frac{P_i}{1 - P_i}\right) = \alpha + \sum_{j=1}^k \beta_j x_{ij}$$

Las variables explicativas pueden ser continuas o categóricas. En este caso, la variable continua es la temperatura (15°C, 20°C, 20/10°C y 25/15°C) y la categórica el pretratamiento (P1 estratificación cálida, P2 estratificación fría, P2+P3 estratificación fría más templada, y P3+P2 estratificación templada más fría). La relación  $p_i/1-p_i$  es conocida como odds de éxito o simplemente odds  $o$ . El log-odds es también conocido como "logit( $p_i$ )". Por lo tanto, simplificando y expandiendo la parte derecha del modelo se tiene:

$$\ln(odd) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k$$

## **5. Resultados**

### **5.1. Censos poblacionales**

| Localidad       | Fontecha  | Laserna                                 | Miranda de Ebro   |
|-----------------|---|---|---|
| Coordenadas UTM | 30TWN9732   | 30TWN4004                               | 30TWN0227   |
| Altura (m)      | 480   | 400                                     | 470   |
| Hábitat         | Orla de carrasacal-<br>encinar, terraza río<br>Ebro | Carrascal- viñado,<br>terracea río Ebro | Pasto seco sobre<br>sustrato arenoso y<br>suelto, terraza río<br>Ebro |
| Individuos      | 2   | 0                                       | 22  |

**Tabla 1:** resultados obtenidos de los censos poblacionales

Se realizaron censos directos de las dos poblaciones que existían en el País Vasco, así como de la población intermedia a estas en los alrededores de Miranda de Ebro (Burgos) (**Tabla 1**).

En Fontecha (Álava) se contabilizaron 2 individuos, en la parcela vallada por la Diputación con el objetivo de proteger dicha población. La ocupación de dicha población es inferior a 1 m<sup>2</sup>.

A su vez, se comprobó la extinción de la otra población que existía en la CAPV , localizada en Laserna San Rafael (Álava), en la cual el carrasacal en el que se localizaba *H. linifolium*, ubicado en la terraza del río Ebro, ha sido transformado en un viñedo.

Por último, se realizaron 3 censos en la población de Miranda de Ebro: antes de la floración, durante la floración y durante la fructificación de *H. linifolium*. En ellos se contabilizaron 22 individuos, 3 menos que los que se contabilizaron por personal del Banco en el año anterior.

## **5.2 Test de viabilidad**

### ***5.2.1. Test de Tetrazolio***

Tras realizar el corte transversal de las semillas (**Figura 11**) con el objetivo de exponer el embrión y demás estructuras a la sal de Tetrazolio (ISTA, 2003) se establecieron los porcentajes de viabilidad para las semillas de los taxones estudiados en función del estado y/o condiciones de ensayo de las semillas (**Tabla 2**).



|                                | Tratamiento     | Semillas viables | Semillas no viables | Porcentaje viabilidad |
|--------------------------------|-----------------|------------------|---------------------|-----------------------|
| <i>Haplophyllum linifolium</i> | T0              | 16               | 9                   | 64%                   |
|                                | T1              | 16               | 9                   | 64%                   |
|                                | T2              | 15               | 10                  | 60%                   |
| <i>Ruta montana</i>            | T0              | 17               | 8                   | 68%                   |
|                                | T1              | 15               | 10                  | 60%                   |
|                                | T2              | 16               | 9                   | 64%                   |
| <i>Lilium pyrenaicum</i>       | T0 Banco activo | 16               | 9                   | 84%                   |
|                                | T0 Banco base   | 15               | 10                  | 80%                   |
|                                | T1 Banco activo | 17               | 8                   | 78%                   |
|                                | T1 Banco base   | 16               | 9                   | 84%                   |
|                                | T2 Banco activo | 16               | 9                   | 84%                   |
|                                | T2 Banco base   | 15               | 10                  | 80%                   |

**Tabla 2:** Porcentajes de viabilidad obtenidos para cada taxón en función de su tratamiento

#### 5.2.1.1 *Haplophyllum linifolium* y *Ruta montana*

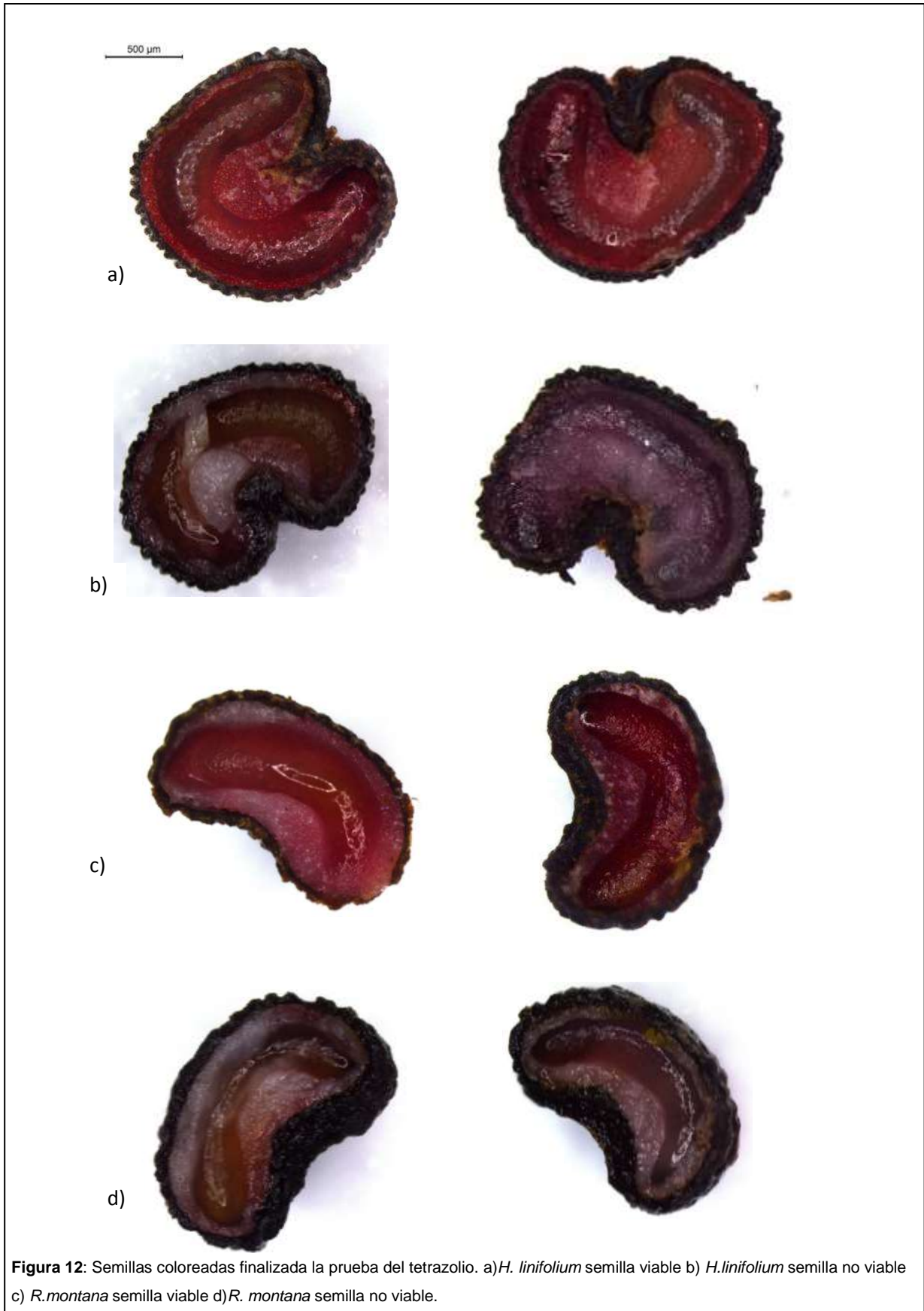
Ante la ausencia de un protocolo estandarizado para realizar las pruebas de tetrazolio con semillas del género *Ruta* así como de la familia *Rutaceae*, se han comparado los resultados obtenidos de las coloraciones con sal de tetrazolio con pruebas para semillas de la familia *Rubiaceae* (género *Galium*) (ISTA, 2003) ya que de los taxones para los cuales existen protocolos sus características morfo-estructurales son las más similares.

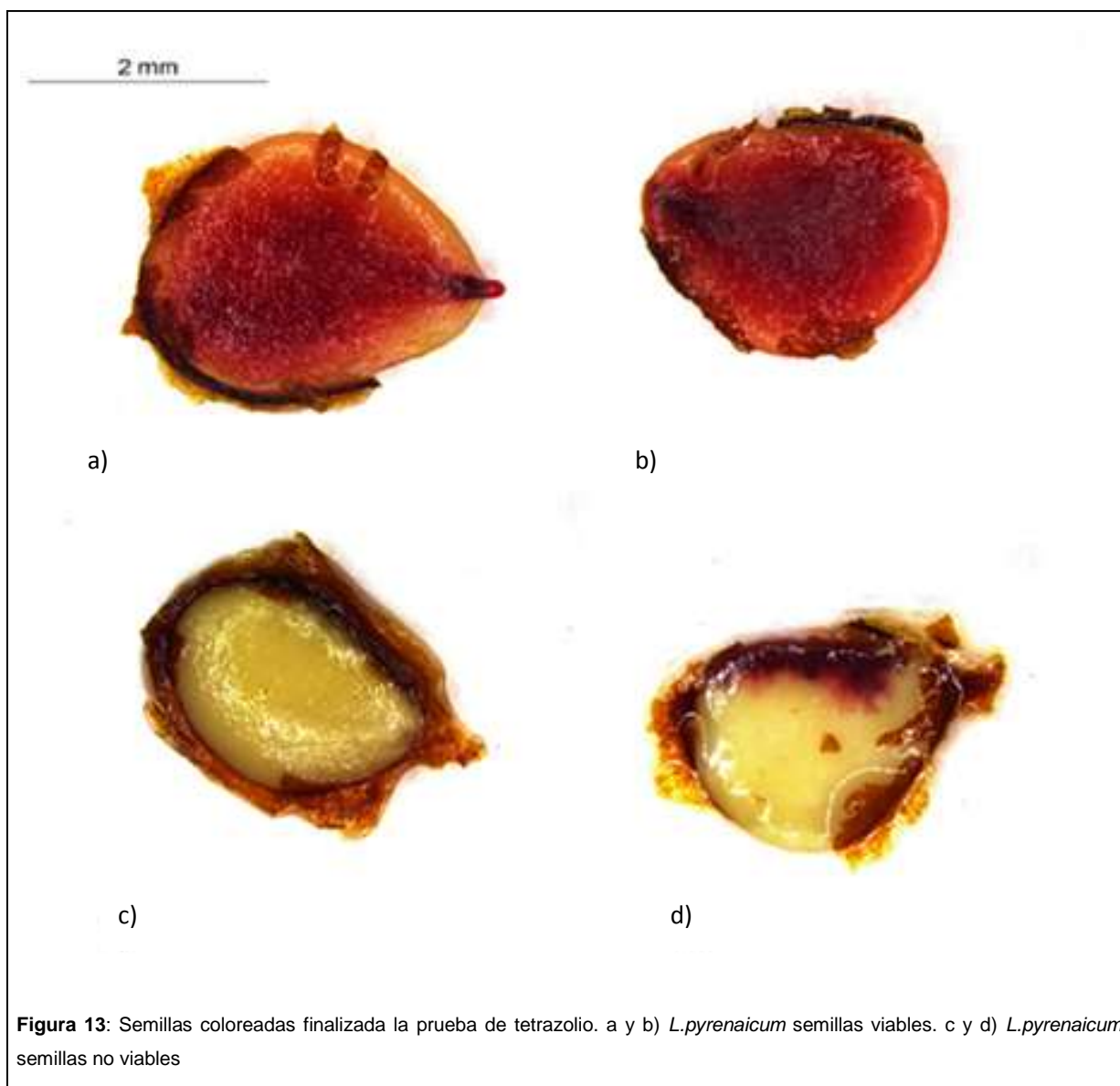
Los patrones de tinción fueron iguales para los dos taxones, adquiriendo un color blanco-morado-lila en las semillas no viables, y rojo en las viables (**Figura 12**), del mismo modo que las semillas del género *Galium* (ISTA, 2003). Se obtuvieron porcentajes de viabilidad similares para ambos taxones y en todos los tratamientos, obteniendo valores de 64 y 68% (**Tabla 2**), una viabilidad elevada en ambos casos y para todos los tratamientos.

#### 5.2.1.2 *Lilium pyrenaicum*

Siguiendo las reglas de la International Seed Association (ISTA, 2003) para semillas de especies de la familia *Liliaceae*, las semillas viables, no pueden tener ningún tejido sin colorear tras la realización de la prueba, a excepción de una pequeña necrosis superficial en la parte exterior del endospermo, sin ninguna relación con la cavidad del embrión. Siguiendo este criterio, en el presente estudio, las semillas viables de *L. pyrenaicum*, adquirieron una coloración completa tanto del embrión como del endospermo, mientras que las no viables no se colorearon (**Figura 13**).

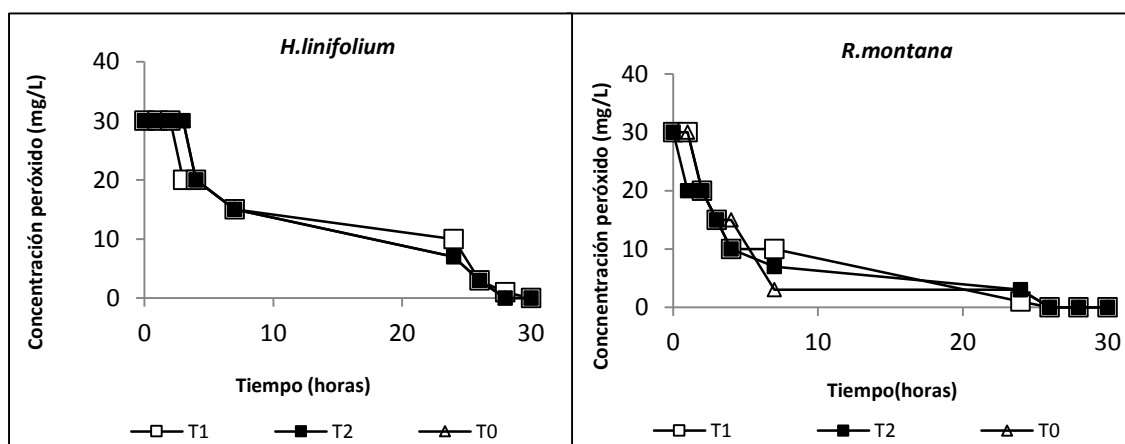
Los porcentajes de viabilidad obtenidos fueron elevados (60-68%) (**Tabla 2**), no observándose diferencias ni entre estados de conservación (Banco base-activo) ni entre tratamientos.





## 5.2.2. Test de Catalasa

### 5.2.2.1. *Haplophyllum linifolium* y *Ruta montana*

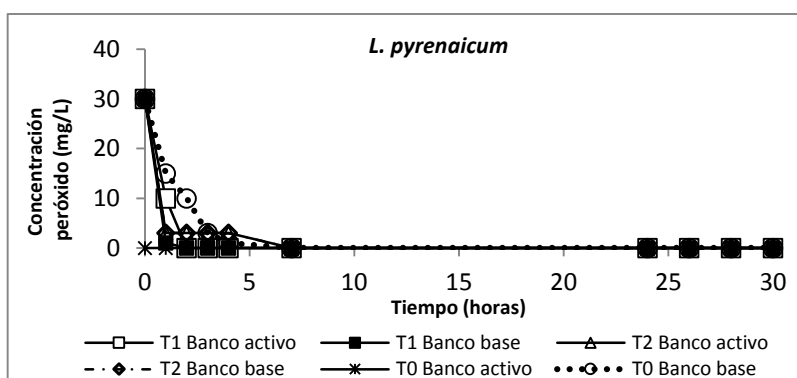


**Figura 14:** Reducción de peróxido de hidrógeno en semillas de *H.linifolium* y *R.montana*.

Los resultados mostraron como la velocidad de reducción de la concentración de peróxido de hidrógeno en la cual estaban embebidas las semillas, siguió la misma tendencia tanto en *H.linifolium* como en *R. montana* (**Figura 14**), resultando algo más rápida al inicio en el caso de *R.montana*, pero reduciéndose por completo al pasar 30 horas desde la imbibición en ambos casos.

#### 5.2.2.2. *Lilium pyrenaicum*

Por otra parte, las semillas de *Lilium*, independientemente del tratamiento y/o estado de conservación, reducían el peróxido antes de las primeras 6 horas (**Figura 15**).



**Figura 15:** Reducción de peróxido de hidrógeno en semillas de *L.pyrenaicum*

Estas diferencias entre las *Rutáceas* y *L.pyrenaicum* son debidas principalmente a la forma, tamaño, estructura y composición de la testa de las semillas. Pese a tardar diferentes períodos de tiempo para reducir la concentración de peróxido de la solución, las semillas de los 3 taxones se consideraron viables, ya que se redujo por completo el peróxido, debido a la actividad catalasa, mientras que en lotes de semillas de *Lens culinaris* no viables analizados en el presente estudio (tras someterlos a envejecimiento acelerado) el peróxido no se redujo incluso pasadas las 48 horas, lo cual indicaba una disminución de la actividad catalasa (Reff, 1980).

### **5.2.3 Test de Conductividad**

De forma general, en todos los lotes de semillas se observó un aumento progresivo de los lixiviados a medida que transcurría el período de imbibición (Soto y Valiengo, 2011).

#### 5.2.3.1. *Haplophyllum linifolium* y *Ruta montan*

En las semillas originales, conservadas en el banco activo (T0), se obtuvieron valores de 32  $\mu\text{S/cm}$  para *Haplophyllum linifolium* y 43  $\mu\text{S/cm}$  para *Ruta montana* (**Figura 16**). En el caso de las semillas sometidas a tratamiento (T2) se obtuvieron valores de 26,2  $\mu\text{S/cm}$  para *Haplophyllum* y 23,3  $\mu\text{S/cm}$  para *Ruta*. Por último, los valores de conductividad menores en ambos taxones se obtuvieron tras el tratamiento control (T1), con valores de entre 14 y 15  $\mu\text{S/cm}$  para *Haplophyllum* y 15,5 y 16  $\mu\text{S/cm}$  para *Ruta*.

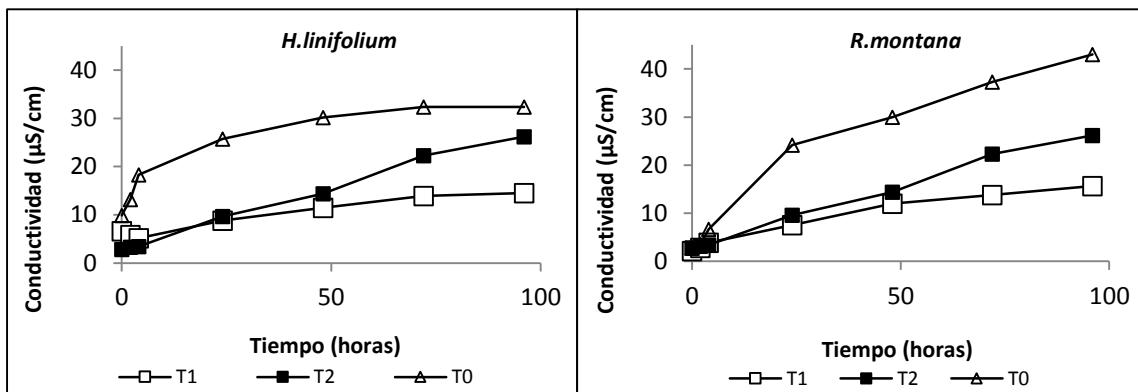


Figura 16: resultados conductividad *H.linifolium* y *R.montana*

### 5.2.3.2 *Lilium pyrenaicum*

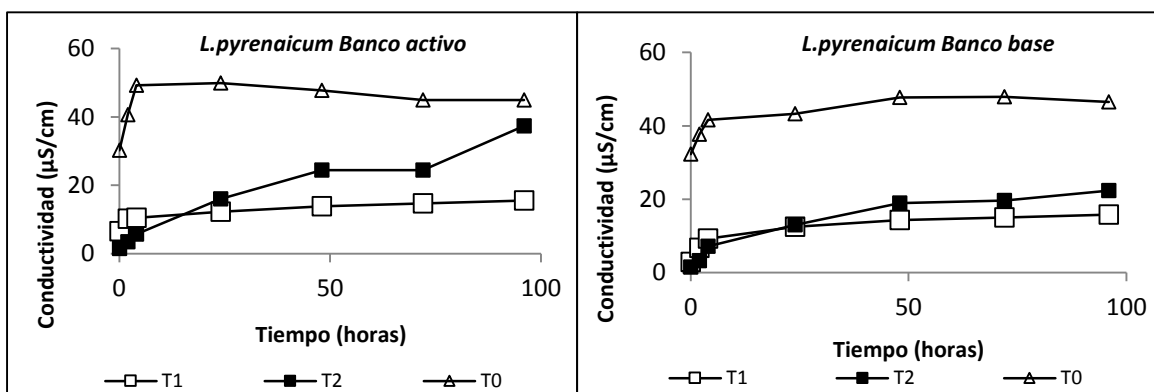


Figura 17: resultados conductividad *L.pyrenaicum*

En cuanto a *L.pyrenaicum*, los resultados de conductividad para los dos tratamientos de conservación mostraron patrones similares (Figura 17). Las semillas sometidas al tratamiento control (T1) en los dos estados de conservación, mostraron los menores valores de conductividad, seguido de las semillas sometidas a tratamiento (T2). En cuanto a las semillas originales (T0) tanto del Banco base como del Banco activo, fueron las que obtuvieron valores más altos de conductividad.

## 5.3. Ensayos de germinación

### 5.3.1. *Haplophyllum linifolium* y *Ruta montana*

Los porcentajes de germinación más elevados para *H.linifolium* se obtuvieron tras las cuatro condiciones de ensayo estudiadas (15,20,20/10 y 25/15°C, 12/12h luz/oscuridad) previo pretratamiento de estratificación fría (4°C, oscuridad, 60 días). Estos porcentajes fueron de entre 43 y 45% (Figura 18).

| <i>H.linifolium</i>                 |            |               |               |       |            |    |        |                  |
|-------------------------------------|------------|---------------|---------------|-------|------------|----|--------|------------------|
| PRETRATAMIENTO                      | Tª<br>(°C) | T50<br>(días) | GMT<br>(días) | VP    | GMD<br>(%) | RG | VG     | GERM± E.S<br>(%) |
| P1 Estratificación<br>cálida (20°C) | 15         | -             | 9.75          | 0.2   | 0.18       | -  | 0,036  | 11 ± 1           |
|                                     | 20         | 13            | 13.89         | -     | 0.41       | -  | -      | 24 ± 4,3204      |
|                                     | 20/10      | 12.5          | 11.35         | 0.5   | 0.46       | -  | 0,23   | 28 ± 5,416       |
|                                     | 25/15      | 12.37         | 13.33         | -     | 0.45       | -  | -      | 27 ± 3,4156      |
| P2 Estratificación<br>fría (4°C)    | 15         | 4.87          | 12.73         | 6     | 0.72       | 5  | 4,32   | 43 ± 7,5498      |
|                                     | 20         | 4.19          | 7.41          | 6     | 0.72       | 5  | 4,32   | 43 ± 7,5498      |
|                                     | 20/10      | 6.2           | 12.75         | 1.87  | 0.73       | 5  | 1,36   | 45 ± 13,564      |
|                                     | 25/15      | 4.29          | 7.84          | 5.83  | 0.75       | 5  | 4,36   | 44 ± 5           |
| Control                             | 15         | -             | 0             | -     | 0          | 0  | -      | 0 ± 0            |
|                                     | 20         | 42            | 36            | 0.021 | 0.03       | 42 | 0,0063 | 2 ± 1,6329       |
|                                     | 20/10      | 33            | 11.12         | 0.067 | 0.07       | 33 | 0,0047 | 4 ± 2            |
|                                     | 25/15      | 51            | 50.5          | 0.035 | 0.13       | 37 | 0,0045 | 8 ± 1,6329       |

(-ESTE PARAMETRO NO SE HA PODIDO CALCULAR DEBIDO A LAS GERMINACIONES DURANTE EL PRETRATAMIENTO).

**Tabla 3:** resultados obtenidos de parámetros germinativos para *H.linifolium*

Comparando los parámetros germinativos de las 4 condiciones de ensayo a las que se han obtenido los porcentajes germinativos más elevados, es difícil establecer cuál de los 4 es el más favorable. Y es que los resultados de estos parámetros son prácticamente similares para los cuatro termoperiodos. Todos ellos presentan la misma Germinación Media Diaria, y tardan el mismo número de días en germinar finalizada la estratificación (mismo valor de Retardo Germinativo). En cuanto al tiempo necesario de las semillas para alcanzar el 50% de germinación (T50), las diferencias entre termoperiodos son mínimas, necesitando 6 días para 20/10 y casi 5 días para el resto (**Tabla 3**).

Atendiendo a la gráfica de porcentajes de germinación totales y los errores estándar (**Figura 18**) se observa que parece significativa la diferencia en los termoperiodos 20°C y 25/15°C (temperatura media de 20°C), es decir que parecen más favorables para alcanzar los porcentajes máximos obtenidos estas temperaturas elevadas frente a las temperaturas medias (15°C y 20/10°C), donde el solapamiento de los errores nos indica que en este caso puede que no siempre se lograrían estos resultados para estos termoperiodos.

Con todo ello, el protocolo óptimo de germinación de *H.linifolium* debe contemplar una estratificación fría como pretratamiento, seguido de temperaturas elevadas.

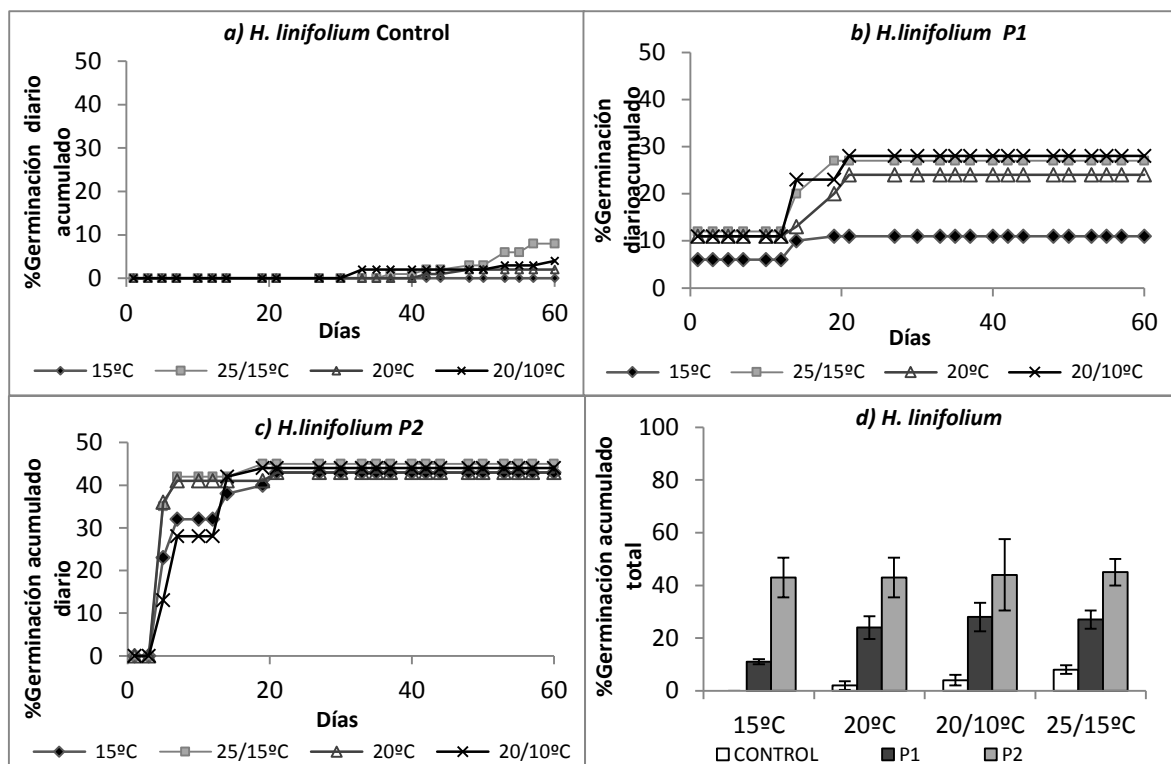


Figura 18: a,b y c) resultados de germinación acumulada diaria frente a días. d) resultados de germinación acumulada

En cambio, para el taxón *R. montana* los porcentajes germinativos más elevados se obtuvieron durante la estratificación cálida (20°C, oscuridad, 60 días), alcanzando porcentajes del 88% (Tabla 4). Finalizada esta estratificación, y tras 60 días a los 4 diferentes termoperiodos, las semillas de *R. montana* no incrementaron su porcentaje de germinación (Figura 19).

| <b><i>R. montana</i></b>         |         |            |            |      |         |           |      |                |
|----------------------------------|---------|------------|------------|------|---------|-----------|------|----------------|
| PRETRATAMIENTO                   | Tª (°C) | T50 (Días) | GMT (Días) | VP   | GMD (%) | RG (Días) | VG   | GERM ± E.S (%) |
| P1 Estratificación cálida (20°C) | 15      | -          | -          | -    | -       | -         | -    | 72± 4          |
|                                  | 20      | -          | -          | -    | -       | -         | -    | 79± 7,123      |
|                                  | 20/10   | -          | -          | -    | -       | -         | -    | 88± 0          |
|                                  | 25/15   | -          | -          | -    | -       | -         | -    | 86± 2,581      |
| P2 Estratificación fría (4°C)    | 15      | 6,40       | 13,62      | 13,6 | 0,22    | 5         | 2,99 | 13± 1,914      |
|                                  | 20      | 4,03       | 14,09      | 6,5  | 0,67    | 5         | 4,35 | 40± 10,708     |
|                                  | 20/10   | 4,52       | 11,06      | 4,83 | 0,73    | 5         | 3,53 | 44± 7,302      |
|                                  | 25/15   | 4,38       | 9,08       | 0,87 | 0,67    | 5         | 0,58 | 40± 5,656      |
| Control                          | 15      | 16,5       | 17,98      | 0,59 | 0,36    | 10        | 0,21 | 16± 1,632      |
|                                  | 20      | 11,38      | 11,08      | 1,75 | 0,66    | 12        | 1,15 | 29± 9,712      |
|                                  | 20/10   | 16,25      | 12,21      | 1,25 | 0,84    | 12        | 1,05 | 37± 5          |
|                                  | 25/15   | 11,07      | 15,15      | 2,3  | 1,41    | 10        | 3,24 | 62± 8,082      |

(-ESTE PARAMETRO NO SE HA PODIDO CALCULAR DEBIDO A LAS GERMINACIONES DURANTE EL PRETRATAMIENTO).

Tabla 4: resultados obtenidos de parámetros germinativos para *R. montana*

Analizando el resto de tratamientos realizados con *R. montana*, se observó la necesidad de temperaturas altas para que germinen sus semillas, y es que en el tratamiento control a termoperiodo 25/15°C, se obtuvo un 62% de germinación, mientras que los resultados obtenidos en la Seed Data Base del Kew Royal Botanic Gardens (Seed Data Base, 2008) fueron del 76% para termoperiodo de 33/19°C y 12h luz/12h oscuridad.

A su vez, durante la estratificación fría, no germinó ninguna semilla, y finalizado dicho pretratamiento, los porcentajes más altos se obtuvieron nuevamente a los termoperiodos más elevados, siendo en todo caso inferiores respecto a los obtenidos durante la estratificación cálida.

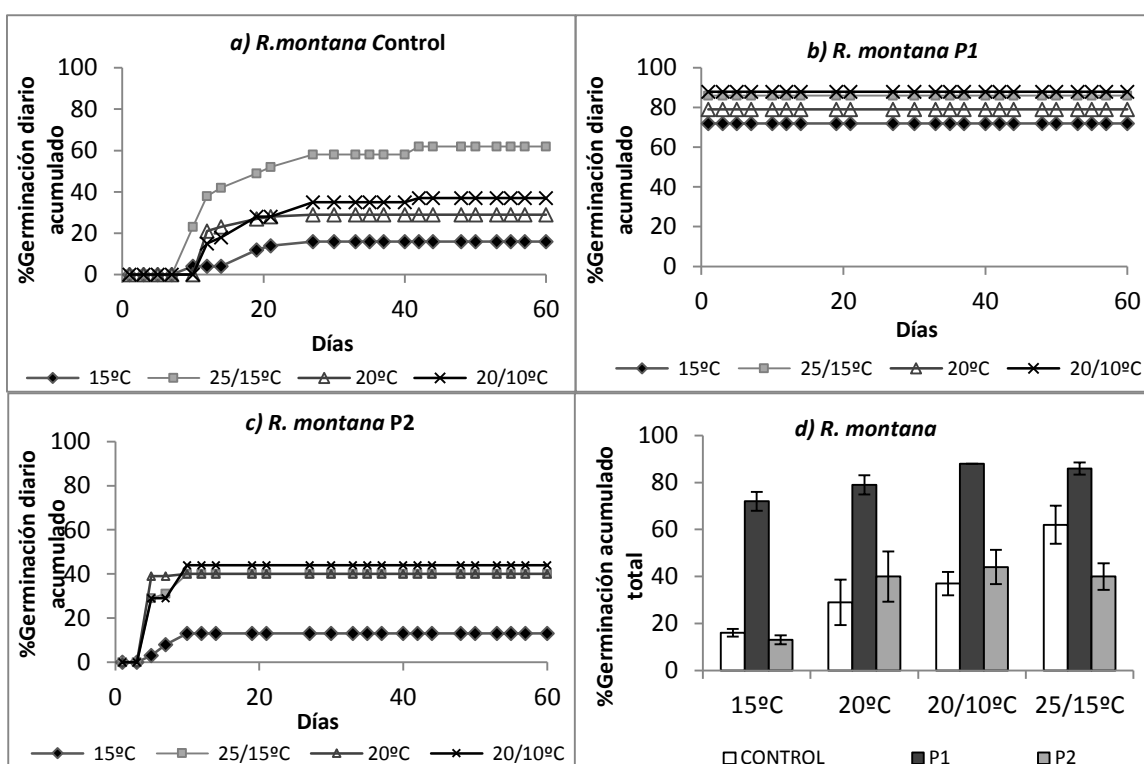


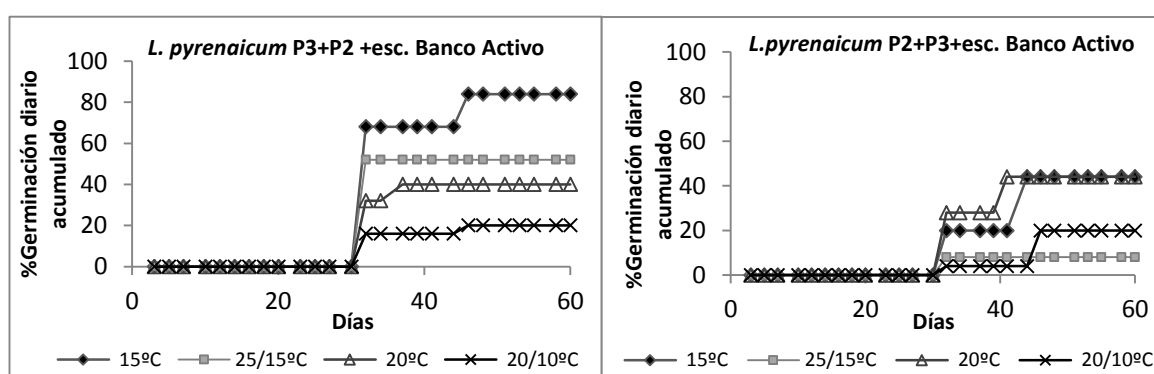
Figura 19: a,b y c) resultados de germinación acumulada diaria frente a días. d) resultados de germinación acumulada

### 5.3.2. *Lilium pyrenaicum*

Los mayores porcentajes germinativos se obtuvieron realizando la escarificación, ya que en aquellas semillas no escarificadas, sólo germinaron las sometidas al pretratamiento estratificación templada seguida de la fría (P3+P2) y a condiciones de ensayo de 15°C y 20/10°C en semillas del banco activo, con porcentajes de 16 y 20% respectivamente (datos no mostrados). En cambio, en las semillas escarificadas, se obtuvieron porcentajes de germinación en todos los tratamientos y termoperíodos, alcanzando los más elevados en todos los casos a temperatura de ensayo de 15°C (Tabla 5, Figura 20 y 21).

| SEMILLAS BANCO ACTIVO                  |         |            |            |      |         |           |        |                |
|--|---------|------------|------------|------|---------|-----------|--------|----------------|
| PRETRATAMIENTO                         | Tª (°C) | T50 (Días) | GMT (Días) | VP   | GMD (%) | RG (Días) | VG     | GERM± E.S. (%) |
| P3 (15°C)+P2 (4°C)+<br>escarificación  | 15      | 1.235      | 5.12       | 34   | 3       | 2         | 102    | 84± 7,483      |
|  | 20      | 1.25       | 2.43       | 16   | 1.428   | 2         | 22.72  | 40± 10,954     |
|  | 20/10   | 1,25       | 2.2        | 8    | 0.714   | 2         | 5.71   | 20± 8,944      |
|  | 25/15   | 1          | 2          | 26   | 1.85    | 2         | 48.1   | 52± 4,898      |
| P2 (4°C) + P3<br>(15°C)+escarificación | 15      | 2.2        | 6.8        | 1.71 | 1.466   | 2         | 2.51   | 44± 11,661     |
|  | 20      | 1.57       | 3.58       | 14   | 1.466   | 2         | 20.524 | 44± 16         |
|  | 20/10   | 14.75      | 10         | 0.75 | 0.667   | 2         | 0.501  | 20± 0          |
|  | 25/15   | 1          | 0.4        | 4    | 0.267   | 2         | 1.068  | 8± 8           |

**Tabla 5:** resultados obtenidos de parámetros germinativos de *L.pyrenaicum*-Banco Activo



**Figura 20:** resultados de germinación acumulada diaria frente a días

El óptimo germinativo se obtuvo tras la escarificación, combinando la estratificación templada (60días a 15°C, P3) con la fría (60 días a 4°C, P2) y temperatura de ensayo de 15°C. Realizando este tratamiento, se obtuvo un 84% de germinación. Además, Los parámetros germinativos nos indican que con este tratamiento, la germinación de *L. pyrenaicum* es más rápida. Y es que, cuando la velocidad de germinación comienza a descender (VP), las semillas que se encuentran a esta temperatura han alcanzado un mayor porcentaje de germinación que el resto de tratamientos (34%). A su vez , las semillas alcanzan el 50% de germinación en un día y logran la Germinación Media Diaria más alta (3días) de todos los tratamientos realizados. Estos datos, junto con el Vigor de Germinación más elevado obtenido, afianzan el hecho de que este tratamiento (15°C) es el más favorable para la germinación de las semillas de *L.pyrenaicum* (**Tabla 5**).

| SEMILLAS BANCO BASE                    |         |            |            |      |         |           |        |                |
|--|---------|------------|------------|------|---------|-----------|--------|----------------|
| PRETRATAMIENTO                         | Tª (°C) | T50 (Días) | GMT (Días) | VP   | GMD (%) | RG (Días) | VG     | GERM± E.S. (%) |
| P3 (15°C)+P2 (4°C) +<br>escarificación | 15      | 1.33       | 4.04       | 24   | 2.133   | 2         | 51.192 | 64± 11,662     |
|  | 20      | 1.5        | 1.5        | 12   | 1.2     | 2         | 14.4   | 36±12          |
|  | 20/10   | 1.25       | 1.73       | 8    | 0.667   | 2         | 5.336  | 20±12,64       |
|  | 25/15   | 1.33       | 2.5        | 12   | 1.066   | 2         | 12.79  | 32± 16         |
| P2 (4°C) + P3<br>(15°C)+escarificación | 15      | 4          | 4.8        | 18   | 2.4     | 2         | 43.2   | 72± 13,56      |
|  | 20      | 10         | 2.2        | 1.09 | 0.4     | 2         | 0.436  | 12± 12         |
|  | 20/10   | 9.88       | 10.4       | 3.27 | 1.33    | 2         | 4.349  | 40± 6,325      |
|  | 25/15   | 4.75       | 2.05       | 2.28 | 0.8     | 2         | 1.824  | 24± 16         |

Tabla 6: resultados obtenidos de parámetros germinativos para *L.pyrenaicum*-Banco Base

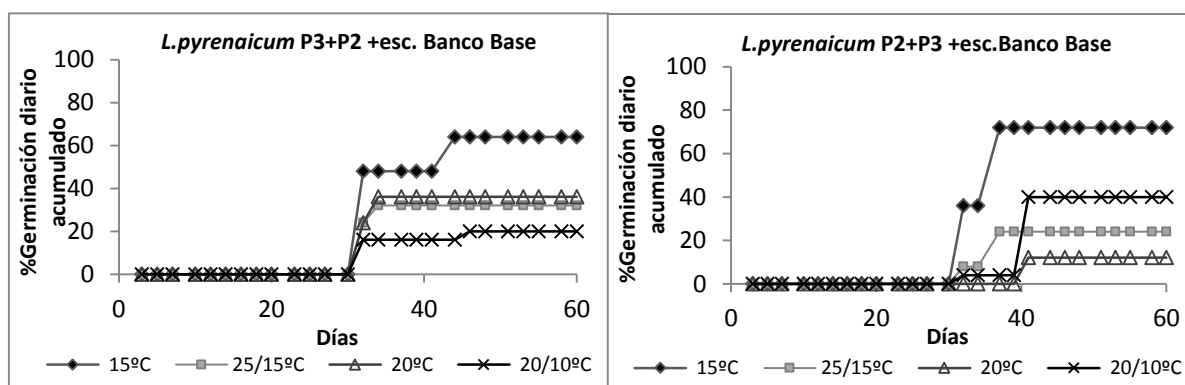


Figura 21: resultados de germinación acumulada diaria frente a días

En cuanto a los diferentes estados de conservación, hay que destacar que con las semillas procedentes del Banco Activo el porcentaje más alto se obtuvo tras combinar la estratificación templada (60 días a 15°C, P3) con la fría (60 días a 4°C, P2) mientras que en semillas del Banco Base, el más elevado se obtuvo tras realizar primero la estratificación fría y posteriormente la templada (Tabla 6).

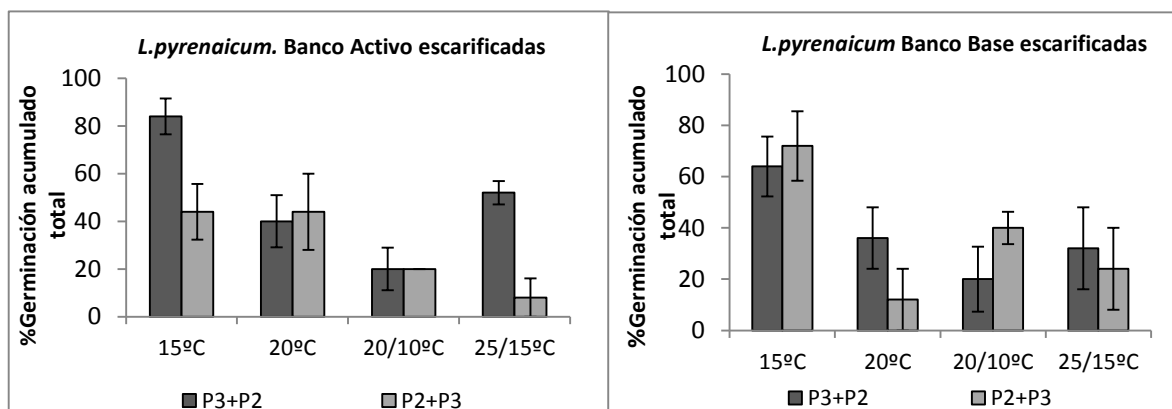


Figura 22: resultados de germinación acumulada

#### 5.4. Modelos estadístico

Para la comparación entre las semillas de los controles y las sometidas a los pretratamientos, se han definido los modelos estadísticos de las germinaciones obtenidas en cada uno de los ensayos, según el Modelo de Regresión Binomial Logístico.

**Tabla 7:** Modelo de Regresión Binomial Logístico para *Haplophyllum linifolium*

|   | Parámetros estimados | Error estándar | Valor de z | Pr(> z )    |
|---|----------------------|----------------|------------|-------------|
| $\beta_0$   | -1,014075            | 1,185031       | -0,856     | 0,392       |
| $\beta_1(\text{pret})$  | -0,552942            | 0,088075       | -6,278     | 3,43e-10*** |
| $\beta_2(\text{temp})$  | 0,667411             | 1,773109       | 0,376      | 0,707       |
| $\beta_3(\text{temp}^2)$  | -0,137251            | 0,777257       | -0,177     | 0,860       |
| $\beta_4(\text{temp}^3)$  | 0,008901             | 0,102702       | 0,087      | 0,931       |
| LnOdds= $\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{pret} + \beta_2 \cdot \text{temp} + \beta_3 \cdot \text{temp}^2 + \beta_4 \cdot \text{temp}^3$ |                      |                |            |             |
| LnOdds=-1,014075-0,552942*pret+0,667411*temp-0,137251*temp2+0,008901*temp3  |                      |                |            |             |

\*\*\*Nivel de significancia de 0,001

**Tabla 8:** Modelo de Regresión Binomial Logístico para *Ruta montana*

|   | Parámetros estimados | Error estándar | Valor de z | Pr(> z )    |
|---|----------------------|----------------|------------|-------------|
| $\beta_0$   | -4,46732             | 1,07743        | -4,146     | 3,38e-05*** |
| $\beta_1(\text{pret})$  | 1,03631              | 0,08276        | 12,522     | <2e-16***   |
| $\beta_2(\text{temp})$  | 2,15642              | 1,60615        | 1,343      | 0,179       |
| $\beta_3(\text{temp}^2)$  | -0,62333             | 0,70848        | -0,880     | 0,379       |
| $\beta_4(\text{temp}^3)$  | 0,06797              | 0,09407        | 0,723      | 0,470       |
| LnOdds= $\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{pret} + \beta_2 \cdot \text{temp} + \beta_3 \cdot \text{temp}^2 + \beta_4 \cdot \text{temp}^3$ |                      |                |            |             |
| LnOdds=-4.46732+1.03631*pret+2.15642*temp-0.62333*temp2+0.06797*temp3   |                      |                |            |             |

\*\*\*Nivel de significancia de 0,001

**Tabla 9:** Modelo de Regresión Binomial Logístico para semillas de *L.pyrenaicum* Banco Activo

|   | Parámetros estimados | Error estándar | Valor de z | Pr(> z )    |
|---|----------------------|----------------|------------|-------------|
| $\beta_0$   | 4,0093               | 1,4861         | 2,698      | 0,00698**   |
| $\beta_1(\text{pret})$  | -0,9527              | 0,1608         | -5,924     | 3,14e-09*** |
| $\beta_2(\text{temp})$  | 2,3735               | 2,0192         | 1,175      | 0,23981     |
| $\beta_3(\text{temp}^2)$  | -1,7733              | 0,9088         | -1,951     | 0,05101.    |
| $\beta_4(\text{temp}^3)$  | 0,2854               | 0,1224         | 2,332      | 0,01968*    |
| LnOdds= $\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{pret} + \beta_2 \cdot \text{temp} + \beta_3 \cdot \text{temp}^2 + \beta_4 \cdot \text{temp}^3$ |                      |                |            |             |
| LnOdds=4,0093-0,9527*pret+2,3735*temp-1,7733*temp2+0,2854*temp3   |                      |                |            |             |

\*\*\* Nivel de significancia de 0,001 \*\*Nivel de significancia de 0,01 \*Nivel de significancia de 0,05

**Tabla 10:** Modelo de Regresión Binomial Logístico para semillas de *L.pyrenaicum* Banco Base

|   | Parámetros estimados | Error estándar | Valor de z | Pr(> z )    |
|---|----------------------|----------------|------------|-------------|
| $\beta_0$   | 8,3742               | 1,5133         | 5,534      | 3,14e-08*** |
| $\beta_1(\text{pret})$  | -0,2949              | 0,1512         | -1,950     | 0,051164    |
| $\beta_2(\text{temp})$  | -9,1930              | 2,0381         | -4,511     | 6,47e-06*** |
| $\beta_3(\text{temp}^2)$  | 3,2620               | 0,8966         | 3,638      | 0,000275*** |
| $\beta_4(\text{temp}^3)$  | -0,3584              | 0,1184         | -3,028     | 0,002461**  |
| $\text{LnOdds} = \beta_0 + \beta_1 * \text{pret} + \beta_2 * \text{temp} + \beta_3 * \text{temp}^2 + \beta_4 * \text{temp}^3$ |                      |                |            |             |
| $\text{LnOdds} = 8,3742 - 0,2949 * \text{pret} - 9,1930 * \text{temp} + 3,2620 * \text{temp}^2 - 0,3584 * \text{temp}^3$      |                      |                |            |             |

\*\*\*Nivel de significancia de 0,001 \*\*Nivel de significancia de 0,01 \*Nivel de significancia de 0,05

Los modelos estadísticos señalan como para *H.linifolium* y *R.montana* el pretratamiento es el parámetro significativo para lograr la germinación, y no las temperaturas (**Tabla 7 y 8**). En cambio, estos modelos, no nos indican que para las semillas de *R.montana*, las temperaturas más elevadas son las más favorables para lograr la germinación.

En cuanto a las semillas de *L.pyrenaicum* procedentes del Banco Activo, los modelos indican nuevamente que el pretratamiento es el parámetro significativo (**Tabla 9**), y en menor significancia pero importante es el efecto de las temperaturas de ensayo, afianzando que el tratamiento de 15°C favorece la germinación de *L.pyrenaicum* respecto al resto de tratamientos. En cambio, en las semillas de *L.pyrenaicum* procedentes del Banco Base, los modelos indican significatividad de las condiciones de ensayo y no del pretratamiento para lograr la germinación (**Tabla 10**).

## **6. Discusión**

La conservación *ex situ* de especies amenazadas en Jardines Botánicos y Bancos de Germoplasma resulta fundamental para la ejecución de planes de restauración y/o de recuperación de poblaciones (Godefroid et al., 2011). En los Bancos de Germoplasma, el material depositado es de gran valor, y por ello resulta fundamental la evaluación periódica de su calidad propagativa, dado que la viabilidad de las semillas se reduce con el tiempo y las condiciones de almacenamiento (Probert et al., 2009). Para ello la mejor opción es, una vez que se establecen las condiciones precisas para cada especie, la realización de pruebas de germinación. El principal inconveniente de estas pruebas es que son muy costosas tanto en tiempo como en recursos e implican la utilización de una gran cantidad de material propagativo, en este caso semillas. En cambio, la realización de pruebas de viabilidad se presenta como una alternativa más rápida y económica a la realización de ensayos de germinación, en la que se establece la calidad del material en base a la realización de pruebas que reflejen alguna actividad biológica. Sin embargo, al igual que los ensayos de germinación, las pruebas de viabilidad exigen su optimización para cada especie. En el presente trabajo se ha puesto a punto los protocolos de germinación y estudio de la

viabilidad para *Haplophyllum linifolium* y *Lilium pyrenaicum*, especies de interés para la conservación y sobre las que es urgente el desarrollo de estos protocolos ya que no existe a día de hoy ninguna información de partida al respecto.

En el caso de *H.linifolium* se obtuvo un porcentaje de germinación elevado que alcanzó el 45% tras la realización de una estratificación fría. Estos porcentajes son muy superiores a los obtenidos por otros autores (Genmedoc, 2014) para este taxón, quienes sólo obtuvieron un 1% de germinación en semillas, a 20/10°C y 12 horas luz/12 horas oscuridad.

Estos resultados resaltan la necesidad de realizar un pretratamiento de estratificación fría. Y es que, siguiendo la ecología de la especie, la estratificación fría es la señal que esperan las semillas de *Haplophyllum linifolium* para activar la germinación tras el invierno, de cara a la primavera y sus lluvias.

Por el contrario, pese a que *R.montana* comparte hábitat con *H.linifolium* y sus semillas morfológicamente son parecidas, su comportamiento germinativo fue diferente a *Haplophyllum*, ya que los porcentajes germinativos más elevados se obtuvieron durante la estratificación cálida (20°C, oscuridad, 60 días), alcanzando porcentajes del 88%. Finalizada esta estratificación, y tras 60 días a los 4 diferentes termoperiodos, las semillas de *R.montana* no incrementaron su porcentaje de germinación. Estas diferencias sugieren que existen diferencias sutiles en la ecología de ambas especies, que justifican sus diferentes requerimientos térmicos (Arana et al., 2015), al mismo tiempo que evidencian la necesidad de desarrollar protocolos de germinación optimizados para cada especie.

En resumen, en ambas Rutáceas, se observó como el pretratamiento es el parámetro significativo a la hora de establecer el protocolo de germinación (**Tabla 7 y 8**), mientras que las diferentes condiciones de ensayo no influyeron significativamente en la germinación.

En el caso de *Lilium pyrenaicum*, las condiciones de propagación de este género han sido muy estudiadas dado su uso ornamental pero ningún trabajo se refiere de modo específico a esta especie, únicamente a especies con características ecológicas similares (Seed Database, 2008; Paric et al., 2008).

Finalizado el ensayo, se observó que la eliminación de la testa de la semilla fue el factor indispensable para alcanzar un buen porcentaje de germinación, además de la combinación de estratificaciones (ya que en los controles, sin escarificación, la germinación fue del 0%). Al igual que Paric et al. (2008) y JiaJun et al. (2009), en este estudio se observó que la presencia de la testa inhibe la germinación de esta especie, estableciendo una dormancia mecánica.

Igualmente es destacable que mientras que en semillas del Banco activo el pretratamiento es crucial para obtener porcentajes altos, en las del Banco base es la temperatura pero no el pretratamiento el principal factor que determina el porcentaje de germinación (**Tabla 9 y 10**). En resumen, en las semillas de *L.pyrenaicum* se consiguió eliminar las dormiciones morfológicas profundas características así como las físicas, que en otros estudios realizados en el Banco habían impedido la germinación. Con todo ello se estableció como protocolo óptimo de germinación la combinación de una estratificación templada (P3, 15°C) y posteriormente una fría (P2, 4°C), seguido de unas condiciones de ensayo de 15°C y una estratificación de 30 días después de finalizar las estratificaciones, alcanzando con este tratamiento un 88% de germinación.

A su vez, en este trabajo se ha estudiado la aplicabilidad de tres test de viabilidad (Tetrazolio, Conductividad y Catalasa) a las especies objeto de estudio. En las semillas de *R.montana* el Test de Tetrazolio subestima la viabilidad ligeramente ya que se obtuvieron porcentajes de germinación superiores a los porcentajes de viabilidad mediante el Test de Tetrazolio. En cambio, con *H.linifolium*, se sobrestima, ya que los porcentajes de viabilidad fueron superiores a los de germinación, lo que sugiere que el tratamiento germinativo no ha sido el óptimo aunque ha mejorado lo descrito por otros autores que obtuvieron porcentajes de viabilidad similares a los obtenidos en el presente trabajo (Genmedoc, 2014). En cuanto *L.pyrenaicum*, los porcentajes de viabilidad y germinación fueron similares y ligeramente más elevado en las semillas conservadas en el Banco Activo. Esta similitud entre viabilidad y germinación nos indica que los tratamientos empleados para establecer los protocolos germinativos han sido adecuados y que el test es adecuado para semillas de esta especie.

En concordancia con el papel fundamental de la catalasa en la fisiología de la semilla, el Test de Catalasa fue también un buen indicador de viabilidad. En el presente estudio las semillas de *R.montana* resultaron ser un buen modelo para conocer la viabilidad de *H.linifolium* puesto que el comportamiento de ambas fue similar. Sin embargo, este test no es comparativo entre especies de distintos géneros, ya que se observaron diferencias en el tiempo de reducción del peróxido entre las Rutáceas y *L.pyrenaicum*. Estas diferencias son debidas principalmente a la forma, tamaño y estructura de la testa de las semillas. Pese a las cinéticas de desaparición del peróxido de la solución difirieron entre especies, las semillas de los 3 taxones se consideraron viables, ya que se redujo el peróxido debido a la actividad catalasa, mientras que en lotes de semillas de *Lens culinaris* no viables analizados en el presente estudio (tras someterlos a envejecimiento acelerado) el peróxido no se redujo incluso pasadas las 48 horas, lo cual indicaba una ausencia de actividad catalasa (Reff, 1980).

Se ha descrito que la disminución en la actividad catalasa muestra una relación directa con la eficiencia de germinación. En ausencia de actividad de esta enzima, no se eliminan los radicales libres y se acumulan en las semillas, resultando en la pérdida completa de la viabilidad de la semilla (Bailly et al., 1996).

En comparación con los dos tests anteriores, que se basan en actividades metabólicas, el Test de la Conductividad se basa en la medida del nivel de daño de los tejidos de las semillas, que se manifiesta en forma de mayor o menor capacidad de retención de electrolitos. Los resultados mostraron patrones similares en la lixiviación de iones de las dos rutáceas. En ambos casos, no se observó ningún lote con una conductividad elevada, a diferencia de lo descrito por otros autores (Soto y Valiengo, 2011), donde los lotes de semillas no viables presentaban elevadas cantidades de iones lixivados en comparación con los viables. Por lo tanto, se estableció que las semillas de estos dos taxones eran viables. Además, se observó una estabilización de la cantidad de iones lixivados a medida que avanzaban las horas, debido a la reorganización de las membranas, parámetro que es igualmente indicativo de que las semillas son viables (Salinas et al., 2001).

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en los valores de conductividad de *L.pyrenaicum* comparando los dos estados de conservación, en ambos casos, se observó una estabilización de los iones lixivados a medida que avanzaban las horas, una vez finalizado el pico alcanzado durante las primeras horas. Tanto los valores bajos de conductividad, como la estabilización de los mismos a medida que transcurre el período de imbibición mostraron patrones similares. Finalmente, ambos lotes se consideraron viables, ya que su conductividad inicial era elevada y a medida que transcurrían las horas, comenzó a estabilizarse indicativo de la reorganización de las membranas que ocurre en semillas viables (Soto y Valiengo, 2011).

## **7. Conclusiones**

- Los test de viabilidad deben formar parte de la rutina de los Bancos de Germoplasma para respaldar su actividad de conservación *ex situ* por su rapidez, inmediatez y poco requerimiento de semillas. El Test de la Conductividad como método no destructivo debe ser implementado y mejorado aunque resulta más objetivo el resultado de otros test como la Catalasa y sobre todo el Tetrazolio.
- Los Bancos de Germoplasma deben aportar los resultados de sus test de viabilidad a bancos de datos biológicos para poder evaluar los resultados sobre muchas de las

especies, géneros y familias de plantas silvestres que todavía no cuentan con protocolos estandarizados para dichas pruebas.

- Es interesante relacionar los resultados de los test de viabilidad y germinación para ajustar los procedimientos experimentales en ambos casos, recíprocamente.
- Se ha definido un protocolo óptimo de germinación para *Haplophyllum linifolium*, endemismo ibérico y especie amenazada en la CAPV. A su vez, se ha definido el protocolo óptimo de germinación de *Lilium pyrenaicum*, una especie de elevado interés para la conservación que nunca antes había sido estudiada. Del mismo modo, se han definido los protocolos para estudiar la viabilidad de estas dos especies con los métodos propuestos.

## **8. Agradecimientos**

En primer lugar, del Banco de Germoplasma del Jardín Botánico de Olárizu, agradecer a Agustí Agut, responsable su acogida y aceptación para la realización de este proyecto, su implicación y dedicación a lo largo del mismo y su inestimable ayuda en los momentos necesitados. En segundo lugar, a Jon Ruiz de Sabando y Santi Ruiz de Galarreta, por haberme ayudado en los momentos que necesitaba durante la realización de este proyecto. Por otra parte, a José Ignacio García Plazaola, director del proyecto desde la UPV/EHU, agradecerle su ayuda, paciencia e implicación en todo momento, gracias al cual he podido llevar a cabo este proyecto a lo largo del curso.

Por otro lado, quería tener una mención especial a Gonzalo García-Baquero por su inestimable ayuda con los análisis estadísticos para llevar a cabo este proyecto.

Por último, agradecer a mi familia y amigos, por su apoyo incondicional y cariño en los momentos más difíciles durante la realización de este Trabajo Fin de Máster.

## **9. Bibliografía**

Agut, A. (2012). El Banco de Germoplasma Vegetal del Jardín Botánico de Olárizu. *Biogaia*, 6-7.

Agut, A., Del Canto, A. y Mira, S. (2012). *Memoria final del proyecto programa de conservación y reintroducción de la flora amenazada y característica de los robledales isla de la Llanda Alavesa*. Banco de Germoplasma Vegetal, Centro de Estudios Ambientales, Vitoria-Gasteiz, 114pp.

Agut, A. y González de Arrilucea, G. (2013). *Desarrollo de mejoras e innovación en el protocolo de ensayos de germinación de semillas del Banco de Germoplasma del Jardín Botánico de Olárizu*. Banco de Germoplasma Vegetal, Centro de Estudios Ambientales, Vitoria-Gasteiz.

Aizpuru, I., Aseginolaza, C., Uribe-Echebarría, P.M., Urrutia, P. y Zorrakin, I. (1999). *Claves ilustradas de la flora del País Vasco y territorios limítrofes*. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco, Vitoria-Gasteiz, 831pp.

Álvarez, M., Silva, J.J., Viera, Y., y Troyo, E. (2010). Desinfección de semillas maduras de maíz (*Zea mays* (L.) para su establecimiento *in vitro* y caracterización de hongos contaminantes. *Revista Electrónica Granma Ciencia*, 14 (1): 1-5.

Arana, M.V., Gonzalez-Polo, M., Martinez-Maier, A., Gallo, L.A., Bench-Arnold, R., Sánchez, R.A. y Batlla, D. (2015). Seed dormancy responses to temperature relate to *Nothofagus* species distribution and determine temporal patterns of germination across altitudes in Patagonia. *New Phytologist*, 1: 1-14.

Bachetta, G., Bueno, A., Fenu, G., Jimenez, B., Mattana, E., Piotto, B., y Virevaire, M. (2008). *Conservación ex situ de plantas silvestres*. La Caixa, Principado de Asturias, 378pp.

Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F., y Côme, D. (1996). Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiologia Plantarum*, 97: 104-110.

Bañares, A., Blanca, G., Güemes, J., Moreno, J.C., y Ortiz, S. (2010). *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España*. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino. Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas. Madrid, 170pp.

Baskin, J.M. y Baskin, C.C. (1989). Seed Germination Ecophysiology of *Jeffersonia diphylla*, a Perennial Herb of Mesic Deciduous Forest. *American Journal of Botany*, 76 (7): 1073-1080.

Baskin, J.M. y Baskin, C.C. (2014). *Seeds. Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Elsevier, USA, 1586 pp.

Berridge, M.V., Herst, P.M. y Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11: 127-152.

BOPV/EHAA(2011) *Orden 10 de Enero de 2011, de la Consejera de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca, por la que se modifica el Catálogo Vasco de Especies Amenazadas de la Fauna y Flora Silvestre y Marina y se aprueba el texto único*. Vitoria-Gasteiz (Nº37ZK) Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco.

Castellón, L. (2008). Procesos de deterioro y mecanismos de protección y reparación involucrados en la pérdida diferencial de la viabilidad durante el almacenamiento de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd. *Universidad de Buenos Aires*, 118pp.

Castroviejo, S. (1986-2012). *Flora iberica*. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid, 1-21.

Côme, D. (1970). *Les obstacles a la germination*. Masson, París, 162 pp.

Decreto 63/2007, de 14 de junio, por el cual se establece el Catálogo de Flora Protegida de Castilla y León (BOCL de 20 de junio de 2007).

Demirkaya, M., Dietz, K.J. y Sivritepe, H.O. (2010). Changes in Antioxidant Enzymes during Ageing of Onion Seeds. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38 (1): 49-52.

Dhyani, A., Sharma, G., Bhagwati, P.N. y Mohan, C.N. (2014). Propagation and conservation of *Lilium polyphyllum* D. Don ex Royle. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 1: 144-147.

Fernandez-Gonzalez, F., Loidi, J., y Moreno, J.C. (2004). Impactos sobre la biodiversidad vegetal. *Impactos del Cambio Climático en España*, 183-247.

Ferrer, PP., Ferrando, I., Gago, C., y Laguna, E. (2013). *Manual para la conservación de germoplasma y el cultivo de la flora valenciana amenazada*. Colección Manuales Técnicos Biodiversidad, 3. Conselleria d'infraestructures, Territori i Medi Ambient. Generalitat Valenciana. Valencia. 85pp.

Finch-Savage, W.E. y Leubner-Metzger G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171 (3): 501-523.

García, Y., Freire, M., Tejeda, M. y Reyes, M. (2007). Germinación in vitro de semillas de *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees. *Bioteconología Vegetal*, 7 (1): 41-44.

Genmedoc. Un réseau interrégional de banques de semences de la méditerranée. (2014). *Haplophyllum linifolium* (L.) G. Don subsp. *linifolium*, fiche germination.

<http://seedbank.genmedoc.org/public/schedagerminazione.aspx?id=264>

Gobierno Vasco (2014). *Designación de la Zona Especial de Conservación ES2110008 Río Ebro/ Ebro Ibaia*. Documento de información ecológica y objetivos de conservación. 60pp.

Gómez-Campo, C. (1985). *Plant conservation in the mediterranean area*. W. Junk Publishers, Dordrecht, Holland, 269pp.

Godefroid, S., Rivière, S., Waldren, N., Boretos, R., y Vanderborght, T. (2011). To what extent are threatened European plant species conserved in seed banks? *Biological conservation*, 144 (5): 1494-1498.

Hosmer, D.W. y Lemeshow, S. (1989). *Applied Logistic Regression*. John Wiley y Sons, 392pp.

Iñigo, A., Pala-Paúl, J., Pérez-Alonso, M.J. y Velasco-Neguereuela, A. (2002). A Essential Oil composition from the aerial parts of *Haplophyllum linifolium* (L.) G. Don fil. *Botanica Complutensis*, 26: 79-83.

ISTA. (2003). *Working Sheets on Tetrazolium Testing. Agricultural, Vegetable and Horticultural Species*. International Seed Association, 176pp.

Jimenez, B. (2008). *Biología de la conservación de plantas vasculares en la Cordillera Cantábrica. Prioridades y casos de estudio*. Universidad de Oviedo, 274pp.

JiaJun, L., Lan, p., Yifei, L., y JingZhu, G. (2009). Embryo culture of interspecific hybrids from *Lilium lancifolium* Thunb. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 40 (1): 84-87.

Llamas, F., Acedo, C., Lence, C., Alonso R., Molina, A. y Castro, V. (2007). Flora Cantábrica de Interés en Castilla y León. *Naturalia Cantabrica*, 3: 57-78

Moreno, J.C. (2011). La diversidad florística vascular española. *Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural* 9: 75-107

Milosevic, M., Vujakovic, M., y Karagic, D. (2010). Vigour tests as indicators of seed viability. *Genetika*, 42 (1): 103-118.

- Navarro, F.B., Suárez-Santiago, V.N. y Blanca G. (2004). A New Species of *Haplophyllum* A. Juss. (Rutaceae) from the Iberian Peninsula: Evidence from Morphological, Karyological and Molecular Analyses. *Annals of Botany*, 94 (4): 571-582.
- Nikolaeva, M.G. (1977). Factors controlling the seed dormancy pattern: 51-74. En: Khan A.A.(ed). *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination* North-Holland Publ. Co., Amsterdam.
- Paric, A., Hindija, J., Muratovic, N., Pojskic, N., y Bajrovic, K. (2008). Breaking dormancy of two endemic *Lilium* species: *Lilium bosniacum* (G.Beck) Beck ex Fritsch and *Lilium martagon* L. var. *cattaniae*. *Vis. Seed Science and Technology*, 36 (3): 788-791.
- Phartyal, S.S., Thapliyal, R.C., Koedman, N., Godefroid, S. (2002). *Ex situ* conservation of rare and valuable forest tree species through seed-gene bank. *Current Science*, 83: 1351-1357.
- Probert, R.J., Daws, M.I. y Hat, R.F. (2009). Ecological correlates of *ex situ* seed longevity: a comparative study on 195 species. *Annals of Botany*, 104 (1): 57-69.
- Rao, N.K., Hanson, J., Dullo, K., Ghosh, K., Navell, D., y Larinde, M. (2007). *Manual para el manejo de semillas en Bancos de Germoplasma*. Bioversity International, Roma, 164pp.
- Reff, G.O. (1980). Peroxide Levels and the Activities of Catalase, Peroxidase, and Indoleacetic Acid Oxidase during and after Chilling Cucumber Seedlings. *Plant Physiol*, 65: 407-408.
- R Development Core Team (2015). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria.
- Remón, J.L., Gómez, D. y García-González, R. (2009). Megaforbios eútrofos e higrófilos de las orlas de llanura y de los pisos montano a alpino. En: VV.AA, *Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario en España*. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal, Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, Madrid, 76pp.
- Rodríguez, I., Guilles, A., Durán, J.M. (2008). Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas. *Agricultura: Revista Agropecuaria*, 78 (1): 836-842.
- Salinas, A.R., Yoldijan, A.M., Cracviotto, R.M. y Bisaro, V. (2001). Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36 (2): 371-379.
- Seed Information.Database (2008). Royal Botanic Gardens, Kew. <http://data.kew.org/sid/>

Soto, J.L. y Valiengo, S. (2001). Electrical conductivity test in the evaluation of physiological quality in seeds of *Zeyheria tuberculosa*. *Bosque*, 32 (2): 197-202.

Uribe-Echebarría, P.M., Zorrakin, I., Campos, J.A., y Dominguez, A. (2006). *Flora vascular amenazada de la Comunidad Autónoma del País Vasco*. Departamento de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio del Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz.

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

Páginas web consultadas:

Portal de datos de GBIF [base de datos en Internet].Nodo Nacional de Información en Biodiversidad.Dirección electrónica: <http://www.gbif.org/participation/summary>

<http://www.asturnatura.com/> Asturnatura. Especies de la flora y fauna del litoral de Galicia, Asturias, Cantabria y el País Vasco.

<http://proyectos.ipe.csic.es/floragon/index.php> Atlas de la flora de Aragón. Instituto Pirenaico de Ecología y Gobierno de Aragón