

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

PROGRAMA DOCTORADO:  
ECOLOGÍA Y GESTIÓN DE LOS RECURSOS VIVOS MARINOS  
(BIENIO 2002/2004)

SUFICIENCIA INVESTIGADORA

**Inducción de la  
germinación y  
propagación *in vitro*  
de semillas de  
*Cymodocea nodosa***

MAITE ZARRANZ ELSO  
2005

**INDICE**

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. BIOLOGÍA DE LA FANERÓGAMA MARINA <i>CYMODOCEA NODOSA</i> ..	3
1.1.1. Órganos vegetativos.....	4
1.1.2. Órganos reproductores.....	6
1.1.3. El proceso de germinación .....	9
1.2. ANTECEDENTES SOBRE EL ESTUDIO DE LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS EN LAS FANERÓGAMAS MARINAS.....	11
1.2.1. Observaciones de germinación de semillas de fanerógamas marinas “in situ”.....	11
1.2.2. Observaciones de germinación de semillas de <i>Cymodocea nodosa</i> “in situ”.....	12
1.2.3. Experiencias de germinación con semillas de fanerógamas marinas en el laboratorio (“ex situ”).....	13
1.2.4. Experiencias de germinación con semillas de <i>Cymodocea nodosa</i> en el laboratorio (“ex situ”).....	16
1.2.5. La dormancia de las semillas en las fanerógamas marinas.....	16
1.2.6. La dormancia de las semillas en <i>Cymodocea nodosa</i> .....	18
1.3. EL HÁBITAT FORMADO POR LAS FANERÓGAMAS MARINAS: IMPORTANCIA, PROBLEMÁTICA Y GESTIÓN.....	19
1.3.1. Importancia de las praderas de fanerógamas marinas. ....	19
1.3.2. Regresión de las praderas de fanerógamas marinas y su protección. ....	20
1.3.3. Rehabilitación y programas de restauración. ....	21
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAL Y MÉTODOS. ....	25
3.1. RECOGIDA DE SEMILLAS.....	25
3.2. ESTERILIZACIÓN DE LAS SEMILLAS .....	25
3.3. EL MEDIO DE CULTIVO.....	26
3.4. GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS .....	29
3.4.1. Disminución de la salinidad .....	29
3.4.2. Tratamiento con Frío. ....	31
3.5. FASE DE ACLIMATACIÓN.....	32

---

3.6. TRASPLANTE AL MAR .....	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
4.1. SALINIDAD .....	36
4.2. TRATAMIENTO CON FRÍO.....	38
4.3. FASE DE ACLIMATACIÓN.....	40
4.4. TRASPLANTE AL MAR .....	47
5. CONCLUSIÓN .....	49
6. BIBLIOGRAFÍA .....	51



## 1. INTRODUCCIÓN

Todas las plantas son por definición eucariotas multicelulares que ocupan un nivel trófico como seres autótrofos con capacidad fotosintética. Un grupo de plantas, las angiospermas, es decir las plantas con flores que dan semillas (del griego, Angio contenedor con referencia al ovario y Sperma, semilla), presentan la mayor diversidad con 235.000 especies conocidas y ocupan todo tipo de ecosistemas terrestres y en menor medida hábitats acuáticos (Sánchez-Jerez, 2003).

De acuerdo con Den Hartog (1970), las hierbas marinas están presentes en todas las regiones del Globo, excepto en la Antártida y forman una parte importante de los ecosistemas de zonas costeras protegidas.

Estas plantas forman praderas submarinas en fondos arenosos bien iluminados generalmente desde la orilla hasta los 40 metros de profundidad (Fig. 1), y a pesar de tener una importante función ecológica y ser un recurso económico muy provechoso, están sometidas a diversos impactos ambientales.



Fig. 1. Pradera densa de *Cymodocea nodosa*.

Estas especies provienen evolutivamente de ancestros terrestres, y son todas ellas angiospermas monocotiledóneas que pertenecen a la división Magnoliophyta, y a la clase Liliopsida, por lo que morfológica y anatómicamente son muy complejas en comparación con las algas (Sánchez-Jerez, 2003).

Actualmente, Kuo and den Hartog (2001), basándose en la monografía de Den Hartog (1970) y en estudios taxonómicos posteriores, reconocen 60 especies y 12 géneros, tal y como muestra el siguiente esquema (Fig.2):

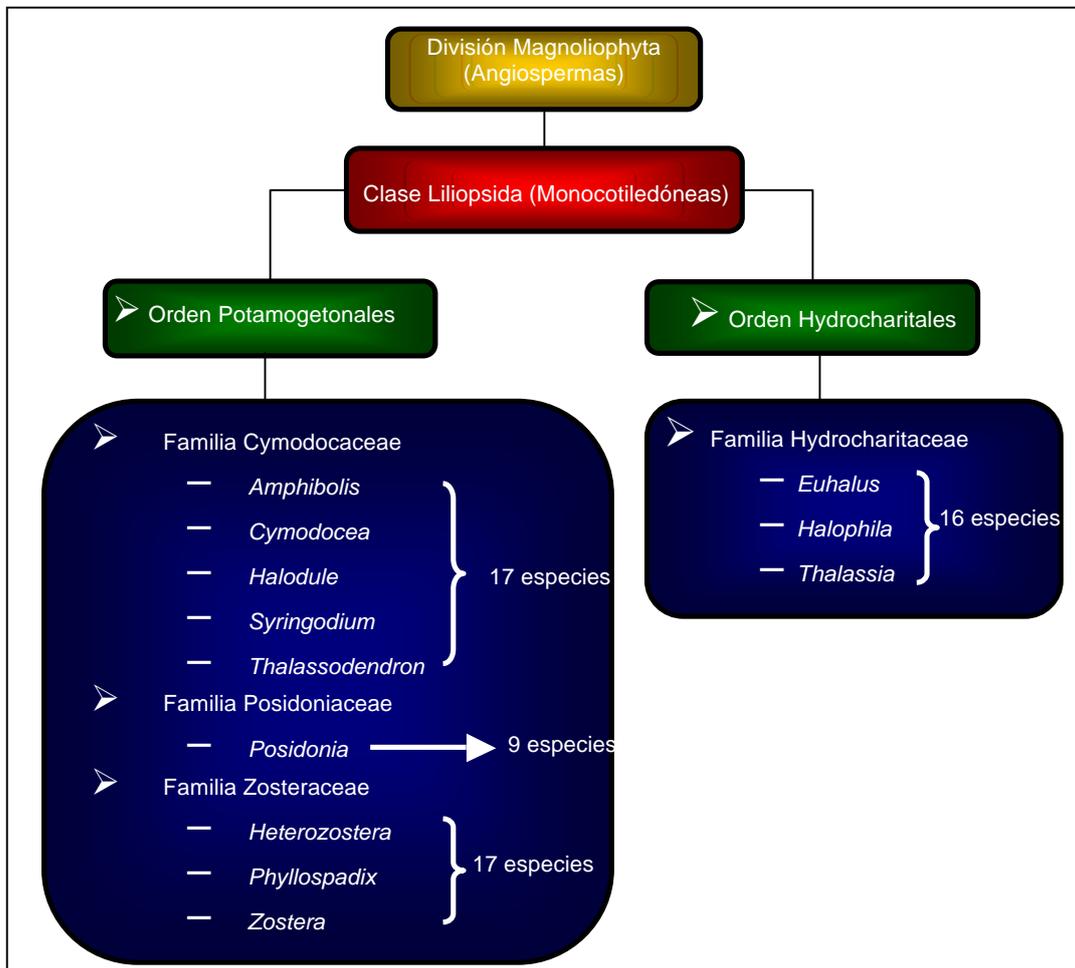


Fig. 2. Clasificación taxonómica de las fanerógamas marinas.

De los 12 géneros reconocidos hasta el momento, 7 son considerados típicamente tropicales (*Halodule*, *Cymodocea*, *Syringodium*, *Thalassodendron*, *Enhalus*, *Thalassia* y *Halophila*), mientras que 5 son de aguas templadas (*Zostera*, *Phyllospadix*, *Heterozostera*, *Posidonia* y *Amphibolis*) aunque las fronteras no son claras y dependen de la dinámica de corrientes (Sánchez-Jerez, 2003).

### 1.1. BIOLOGÍA DE LA FANERÓGAMA MARINA *CYMODOCEA NODOSA*

*Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson (syn: *Cymodocea aequorea*, Koenig) es una fanerógama marina, perteneciente a la familia Cymodoceae.

Es una especie de origen tropical, actualmente localizada en el Mar Mediterráneo y el Atlántico Nororiental, desde el sur de Portugal, hasta las costas de Senegal, incluyendo Madeira y el archipiélago Canario.

En el Archipiélago Canario esta especie forma praderas submarinas en los fondos arenosos bien iluminados, entre la cota de los -2 y -30 metros de profundidad, y localizadas en las zonas abrigadas de las islas, coincidiendo con las costas de la vertiente Sur y Este y son conocidas con el nombre de sebadales (Afonso-Carrillo and Gil-Rodríguez, 1980). Estos ecosistemas se encuentran mejor representados en las islas centro-orientales, preferentemente en las costas de sotavento, semiexpuestas y abrigadas (Wildpret et al, 1987).

Con frecuencia estas praderas son monoespecíficas, formando la asociación *Cymodocetum nodosae* (Pignatti, 1953), pero también pueden ser mixtas, apareciendo acompañada de algunas algas verdes del género *Caulerpa*, como son *Caulerpa prolifera*, *Caulerpa racemosa* o *Caulerpa mexicana*, llegando a formar asociaciones importantes con *Caulerpa prolifera* (Fig. 3).



Fig. 3. *Cymodocea nodosa* con *Caulerpa prolifera*.

### 1.1.1. Órganos vegetativos

La morfología de *Cymodocea nodosa* ha sido descrita con detalle por Bornet (1864) bajo el nombre de *Phucagostis major* Cavolini.

Reyes (1993) define a la especie *Cymodocea nodosa*, como un hidrófito herbáceo marino que presenta un rizoma rampante ramificado de forma monopodial (plagiótropo) del que, a nivel de los nudos, parten las raíces y los rizomas erectos (ortótropos). Estos últimos, ramificados o no, portan a nivel de sus nudos, un solo tipo de hojas agrupadas en haces y con vainas desarrolladas en sus bases (Fig. 4).

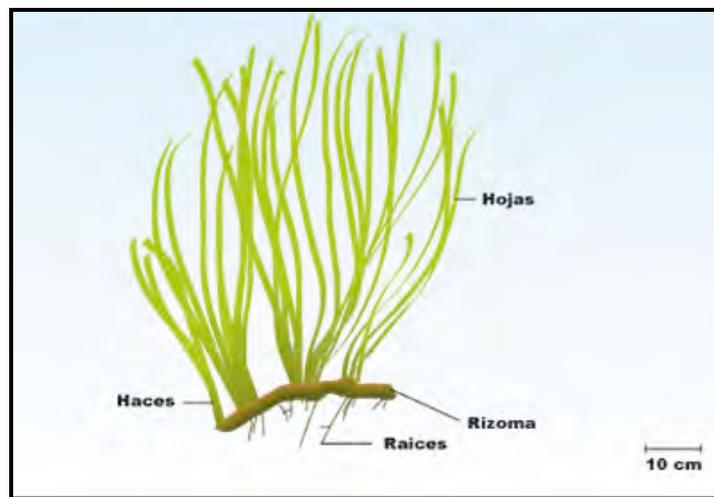


Fig. 4. Esquema general de *Cymodocea nodosa* (Sánchez-Jerez, 2003).

**Las raíces** de *Cymodocea nodosa* son adventicias, como en todas las monocotiledóneas, de color blanquecino y presentan ramificación monopodial. Anatómicamente son iguales al resto de las monocotiledóneas.

**Los rizomas** de *Cymodocea nodosa* son herbáceos, cilíndricos y con ramificación monopodial. Según Caye and Meinesz (1985), éste rizoma presenta un dimorfismo claro que se manifiesta por:

- Un rizoma vegetativo plagiótropo o de crecimiento horizontal (Fig. 5), que produce varias ramificaciones secundarias laterales de crecimiento ortótropo por año, y donde el índice de crecimiento puede alcanzar 1.80 m/año en praderas de baja densidad.

- Y ejes ortotrópicos poco ramificados, de crecimiento lento (1-2cm/año) y que producen flores (Fig. 6).

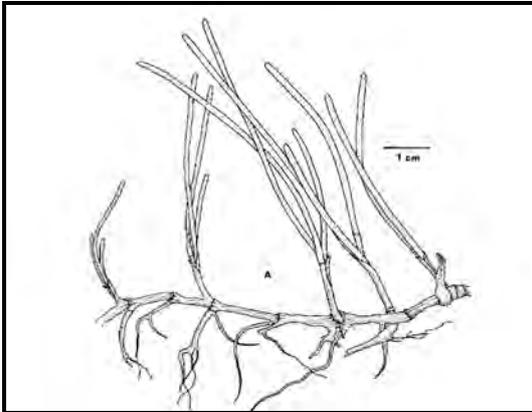


Fig. 5. Rizoma plagiótropo

([www.botany.hawaii.edu/seagrass/spppages/spp\\_cynd.htm](http://www.botany.hawaii.edu/seagrass/spppages/spp_cynd.htm))



Fig. 6. Rizoma Ortotrópico

Este dimorfismo puede cambiar según las condiciones ambientales, ya que el meristemo apical de los 2 ejes no está diferenciado de forma irreversible, y su modo de crecimiento puede cambiar. En poblaciones muy densas, donde hay poco espacio disponible, un rizoma horizontal tiene la capacidad de crecer verticalmente. Además, ejes verticales pueden asumir crecimiento plagiótropo.

Tanto los rizomas plagiótropos como los ortótropos presentan nudos y entrenudos sucesivos donde se producen las ramificaciones y se desarrollan los haces de hojas y las raíces (Fig. 7).



Fig. 7. Rizoma plagiótropo del que parten raíces y haces en cada nudo.

Cada una de las hojas de *Cymodocea nodosa* posee una **vaina** en su base, considerada como una continuación proximal de la lamina foliar. Las hojas en desarrollo quedan protegidas por las vainas de las hojas maduras del mismo haz. La longitud de la vaina es variable y generalmente esta cubierta por el sedimento.

**Las hojas** de *Cymodocea nodosa* se forman a nivel de los nudos de los rizomas, son alternas, dísticas y sus vainas envuelven completamente al rizoma que las porta. El crecimiento es principalmente por medio de un meristemo basal.

**Las láminas foliares** son acintadas, de hasta 51 cm de largo x 4.5 mm de ancho, ligeramente más estrechas hacia el ápice. El ápice de la lámina es redondeado-obtuso, con pequeños dientes marginales, mientras que el resto de la lámina presenta margen entero. En la superficie de la lámina foliar se distinguen 7-9 nervios paralelos, que confluyen en la región apical (Fig. 8).

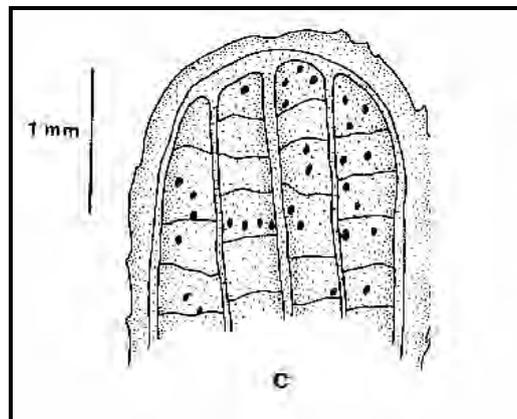


Fig. 8. Detalle de la lámina foliar

([www.botany.hawaii.edu/seagrass/spppages/spp\\_cynd.htm](http://www.botany.hawaii.edu/seagrass/spppages/spp_cynd.htm)).

De acuerdo con las observaciones de Caye and Meinesz (1985), el desarrollo de las hojas esta sujeto a un crecimiento rítmico estacional. Las praderas de *Cymodocea nodosa* de el Médano (Tenerife) mostraron su máxima vigorosidad en Mayo-Julio, que se manifestó en la densidad de haces por unidad de superficie, en el número de hojas por haz y en la longitud y ancho de las hojas (Reyes, 1993). A partir de otoño estos valores disminuyeron y, en invierno, fue cuando se alcanzaron valores mínimos de densidad, de número

de hojas por haz y de longitud y ancho de las mismas. En otras fanerógamas marinas, como en *Posidonia oceanica*, también han sido observadas variaciones estacionales en su crecimiento (Ott, 1980; Panayotidis and Giraud, 1981; Caye and Rossignol, 1983; entre otros).

### **1.1.2. Órganos reproductores**

De acuerdo con Bornet (1864), **las flores** de *Cymodocea nodosa* son solitarias, unisexuales y aclamídeas. Al igual que en el resto de Cymodoceae, *Cymodocea nodosa* es una especie dioica. Las plantas masculinas y femeninas pueden crecer entremezcladas aunque generalmente tienden a formar grandes manchas sólo constituidas por individuos de uno u otro sexo.

Reyes (1993) describió **la morfología del fruto y de la semilla** en *Cymodocea nodosa*. Esta especie produce pares de frutos drupáceos, con epicarpio carnoso de color amarillento y pequeñas manchas oscuras (Figs. 9 y 10), y endocarpio duro, seco y frágil, en principio blanquecino aunque posteriormente se vuelve pardo (Fig. 10). El epicarpio carnoso se descompone, muchas veces cuando el fruto está aun unido a la planta, y únicamente permanece el endocarpio protegiendo la semilla.



Fig. 9. Pares de frutos de *Cymodocea nodosa*.

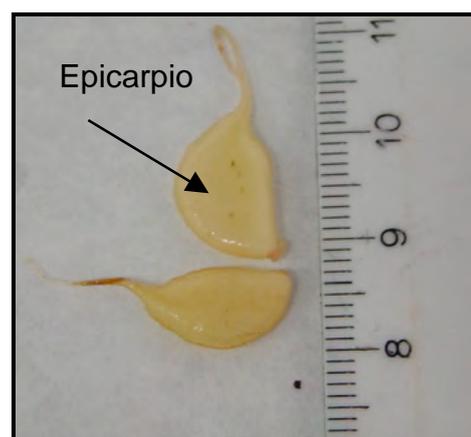


Fig. 10. Detalle de frutos.

Tanto en el borde dorsal como el ventral se reconocen, entonces, unas crestas prominentes endurecidas. La cresta dorsal es crenulada y recorre toda

la longitud dorsal del endocarpio, siendo ésta la línea de dehiscencia por donde se produce la germinación (Fig. 11).

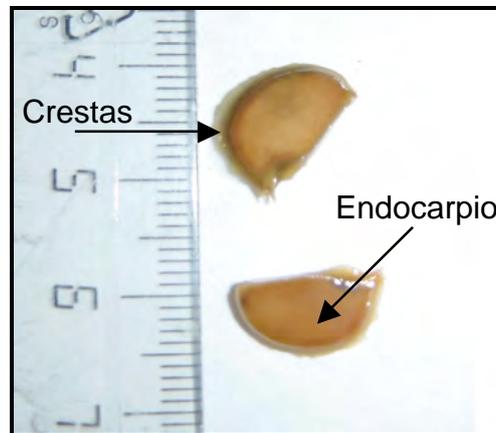


Fig. 11. Detalle semillas.

La cresta ventral, sin embargo, es recta y algo más gruesa. En la cavidad limitada por el endocarpio se encuentra la semilla, cubierta por una fina membrana. En octubre los frutos ya están maduros, se separan de la planta, el epicarpio se pudre y la semilla permanece enterrada en el sedimento (Caye and Meinesz, 1986; Reyes, 1993).

Reyes (1993) observó en la costa sureste de Tenerife (El Médano) que las flores fueron abundantes de principios de abril a finales de mayo y desaparecieron en junio. Los frutos comenzaron a desarrollarse a finales de abril y en mayo se encontraron los primeros haces con frutos maduros. Los frutos se mantuvieron en los haces hasta diciembre, aunque progresivamente fueron desprendiéndose y depositándose en el sedimento. Una pauta similar fue observada en distintas localidades del Mediterráneo (Lipkin, 1977; Mazzella et al., 1983-1984; Caye and Meinesz, 1985; Terrados, 1991), aunque aquí se detectó un retraso en la fructificación (julio-agosto en el Mediterráneo; Mayo-junio en el Médano).

Pirc et al. (1986) mostraron que las semillas de *Cymodocea nodosa* presentan un periodo de latencia de 7-8 meses y su germinación tiene lugar en la primavera siguiente a su formación.

### **1.1.3. El proceso de germinación**

La germinación comienza cuando el extremo distal de la cresta dorsal del fruto se abre y se separa del resto, permitiendo la salida del cotiledón (Fig. 12).



Fig. 12. Semilla abierta.

Mientras el cotiledón se elonga y se vuelve verde, la radícula se desarrolla, se ablanda y se cubre de numerosos pelos muy delicados, similares a los que se forman en las raíces (Caye and Meinesz, 1986; Reyes, 1993).

Cuando el cotiledón alcanza aproximadamente 4 cm de largo, las diferentes partes del embrión pueden verse claramente diferenciadas (Reyes, 1993) (Fig. 13):

- La radícula, con pelos radiculares y lateralmente hinchada. En las monocotiledóneas su duración es efímera, y pronto desarrollan las raíces adventicias.
- El hipocotilo o primer entrenudo, de color blanco, cilíndrico y con un pequeño engrosamiento terminal.
- El cotiledón, aunque cilíndrico, ya de color verde y aspecto similar al de las hojas (nomófilos).
- La gémula, situada en el interior de la vaina del cotiledón, formando una hendidura alargada en la base de este.

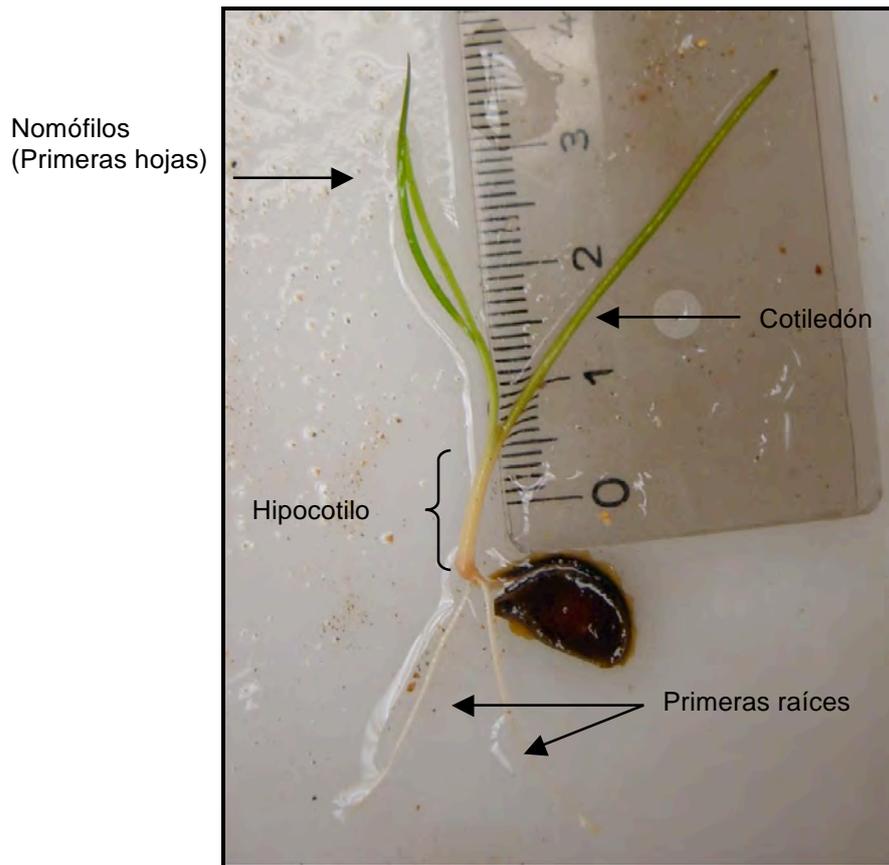


Fig. 13: Plántula.

Posteriormente, a cada lado del engrosamiento distal del hipocotilo se desarrollan dos pequeñas protuberancias opuestas, perpendiculares a la hendidura de la gémula, que se elongan y se rompen en sus ápices permitiendo la salida de las dos primeras raíces (Reyes, 1993). La primera hoja se desarrolla dentro del cotiledón, el cual funciona como vaina protectora (Caye and Meinez, 1986). Sucesivamente, se desarrollan la segunda y tercera hoja y, a la vez, el segundo y tercer par de raíces, con la misma disposición que las primeras. A partir de este entrenudo, las raíces presentan una disposición irregular (Reyes, 1993).

Con frecuencia, en este estadio de desarrollo de la plántula, los restos del endocarpio permanecen aun unidos a ella, aunque posteriormente se desprenden y se descomponen en el sedimento (Reyes, 1993).

## 1.2. ANTECEDENTES SOBRE EL ESTUDIO DE LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS EN LAS FANEROGAMAS MARINAS.

### 1.2.1. Observaciones de germinación de semillas de fanerógamas marinas “in situ”.

Varios autores han observado la germinación de diferentes fanerógamas en el mar.

McMillan (1981), estudió la germinación de las semillas de *Halodule wrightii* Ascherson (Cymodoceaceae) y *Syringodium filiforme* Kutzing (Cymodoceaceae) en diferentes sitios del Atlántico Oeste, observando bajos porcentajes de germinación para las dos especies durante extensos periodos de tiempo, a pesar de que la germinación para ambas fanerógamas ocurre en amplios rangos de salinidad, del 5 al 50‰ para *Halodule* y entre el 20 y el 50‰ para *Syringodium*.

El género *Phyllospadix* (Zosteraceae) fue estudiado por Kuo et al. (1990) y vieron que los porcentajes de germinación podían alcanzar el 65%, tras un periodo de dormancia de 6 semanas.

Otro autor, Churchill (1983) realizó experiencias de germinación con *Zostera marina* L. (Zosteraceae) sembrando las semillas en contenedores llenos de sedimento situados en aguas poco profundas. Entre el 76 y el 93% de las semillas recolectadas germinó, principalmente durante los meses de octubre a diciembre, 3-4 meses después de su liberación. El desarrollo de la plántula se dio durante el otoño y la primavera, pero no en invierno. Observó una disminución progresiva del número de plántulas durante el invierno, y ninguna sobrevivió a partir del mes de mayo.

Piazzini et al., (1999) estudiaron la supervivencia y el desarrollo de las plántulas de *Posidonia oceanica* (L.) Delile “in situ” durante dos años en la costa de Toscana. El número de plántulas observadas disminuyó de 3/m<sup>2</sup> el primer año a 1.9/m<sup>2</sup> el segundo. Estos autores concluyeron que el establecimiento de las plántulas, la supervivencia y el crecimiento dependen fuertemente de factores ambientales, de la profundidad y principalmente de las características del substrato, tal y como sugirieron Churchill (1983) y Harrison (1993) para *Zostera marina* L. Estos resultados coinciden con los estudios de

*Posidonia australis* Hooker (Clarke and Kirkman, 1989), que indicaban que el establecimiento de las plántulas dependía fuertemente del movimiento del agua, la profundidad y la estabilidad del sedimento.

Tras las observaciones llevadas a cabo en el estudio de Piazzzi et al., (1999) se puede concluir que dos años después de la germinación, la fase más sensible puede considerarse terminada y la supervivencia de las plántulas bien establecida. Esto les conduce a la conclusión de que hay un periodo crítico para la supervivencia de las plántulas que esta limitada al primer año de vida.

### **1.2.2. Observaciones de germinación de semillas de *Cymodocea nodosa* “in situ”.**

Estudios sobre la germinación de las semillas en *Cymodocea nodosa* muestran que en relación con el alto número de frutos generalmente encontrados en el sedimento, sólo un bajo número de plántulas son detectados con un rizoma desarrollado (Caye and Meinesz, 1985; Reyes et al., 1995) y la supervivencia de estas plántulas parece ser mayor en praderas bien establecidas que en substratos desnudos (Terrados, 1993).

Estudios de crecimiento sugieren, que si el substrato es probablemente el factor que más afecta a la supervivencia de la plántula, otros factores relacionados con la profundidad (por ejemplo luz y movimiento del agua) se vuelven más importantes en el crecimiento de la plántula (Piazzzi, Acunto and Cinelli, 1999).

En el estudio que realizó Reyes (1993), en la pradera de *Cymodocea nodosa* del Médano (sur de Tenerife) observó que la germinación de las semillas se daba desde febrero hasta septiembre, aunque sólo se encontraron plántulas desarrolladas, siempre de menos de un año de edad, entre abril y septiembre. Los valores máximos medios de germinación por m<sup>2</sup> hallados por este autor se encontraron en abril, con hasta 64 germinaciones/m<sup>2</sup>; el 52% del número total de frutos observados ese mes.

Otros autores (Pirc, Buia and Mazzella, 1986) realizaron estudios en el Mediterráneo sobre la germinación de esta especie tanto en laboratorio como “in situ”. Acerca de la germinación “in situ”, estos autores concluyeron que la

mayoría de las semillas germina en junio, a pesar de que algunas siguen germinando al final del verano. El porcentaje máximo de germinación “in situ” observada por estos autores fue del 54% en el mes de julio. Sin embargo vieron que el 50% de las plántulas germinadas se perdieron a finales de agosto por mortalidad.

En el Mediterráneo, se observa la existencia de praderas donde la germinación no se ha dado (Pérez, 1989), praderas donde el número de germinaciones es muy bajo (Caye and Meinesz, 1985) y praderas donde la germinación es abundante y parece ser un hecho recurrente todos los años (Terrados, 1991; Buia & Mazzella, 1991).

Lo que parece común en todas estas localidades es la escasa viabilidad de las plántulas, ya que generalmente se observan con menos de un año de edad y muy raramente con rizomas desarrollados (Reyes, 1993).

### **1.2.3. Experiencias de germinación con semillas de fanerógamas marinas en el laboratorio (“ex situ”)**

Se han llevado a cabo numerosas experiencias en el laboratorio sobre la germinación de semillas en las fanerógamas marinas.

Birch (1981) realizó experiencias de germinación con semillas recolectadas de *Halophila spinulosa* (R.Br.) Aschers. que mostraron periodos de dormancia de unas 5 semanas. Tras este periodo, los porcentajes de germinación fueron elevados. Pero todas las plántulas obtenidas en el laboratorio bajo distintos métodos de cultivo murieron en la fase de crecimiento de la segunda o tercera hoja.

McMillan (1983) obtuvo germinaciones de *Halodule wrightii* Aschers. y *Syringodium filiforme* Kutz. bajo condiciones de laboratorio durante 3 años. Observó que la longevidad potencial de las semillas en estas especies era mayor que en otras fanerógamas marinas.

Este mismo autor, McMillan (1983), realizó experiencias de germinación con otra fanerógama marina, *Zostera marina* L., en agua de mar artificial. Se vio que la germinación estaba más influenciada por la temperatura que por la

salinidad (al revés que en *Cymodocea nodosa*). La media en el porcentaje de germinación para semillas expuestas a salinidades del 15 o 35‰ fue aproximadamente igual. La germinación en *Zostera marina* se inhibe a 28-32°C, que es la temperatura cercana a las condiciones estivales.

McMillan (1987, 1988) recogió semillas de *Halophila engelmannii* Aschers. en Texas durante los meses de mayo y junio. Estas semillas comenzaban a germinar 3-4 semanas después de la recolección. Se observó un incremento en el porcentaje de germinación bajo condiciones de intensidad de luz elevada y todas tenían un parón en la germinación después de transferirlos a la oscuridad, indicando que la luz es un requerimiento para romper la dormancia endógena de la semilla. Pudo observar que las semillas probablemente no germinan si están enterradas en el sedimento, y que tras el movimiento del sedimento, y la exposición de las semillas a la luz, comienzan a germinar, permitiendo la colonización de nuevos substratos.

McMillan (1988) continuó sus estudios de germinación con otra especie de *Halophila*, *Halophila decipiens* Ostenfeld (Hydrocharitaceae). Las semillas permanecen sin germinar en la oscuridad, pero tras retirar las semillas del sedimento, estas germinaban en 2-3 días y obtuvo un 86% de germinación tras nueve días bajo condiciones de luz en el laboratorio. Las semillas a la luz germinan en salinidades entre 25-34‰ pero permanecen sin germinar a 42‰.

Hootsmans et al. (1987) estudiaron la germinación de *Zostera marina* L. y de *Zostera noltii* Hornem. en el laboratorio en relación a la temperatura (10, 20 y 30°C), salinidad (1, 10, 20, 30 y 40‰) y estratificación (4°C). Ambas especies mostraron un máximo de germinación a 30°C y 1‰ de salinidad, disminuyendo con mayores salinidades y menores temperaturas. La estratificación estimulaba la germinación sólo con salinidades iguales o superiores a 20‰. Las plántulas de *Z. marina* sobreviven mejor a 10°C y 10-20‰ de salinidad, y las de *Z. noltii* a 10°C y 1‰ de salinidad. De forma general, sobreviven mejor las plántulas de *Z. marina* que las de *Z. noltii*.

Loques, Caye and Meinesz, (1990) estudiaron la germinación de *Zostera noltii* Hornemann, con distintos tratamientos de temperatura, salinidad, estratificación e incisión en el tegumento de la semilla. Observaron 2 factores

que hacían aumentar el porcentaje de germinación, que eran la disminución de la salinidad (1-10‰) y la incisión en el tegumento. Tras la germinación, las plantas se desarrollaban mejor con tratamientos de salinidad del 10‰. Alcanzaban la etapa de la tercera hoja a los 20 días.

Balestri and Cinelli (1995) recogieron semillas de *Posidonia oceanica* y las pusieron a germinar en el laboratorio. Estudiaron el efecto de diversos factores (incluido la luz y tipo de contenedor de crecimiento) en los patrones de germinación, desarrollo y porcentaje de supervivencia de plántulas de *Posidonia oceanica*. El más alto porcentaje de germinación ( $86.5 \pm 9.2$ ) y de supervivencia ( $94.4 \pm 7.8$ ) se alcanzó a los 18 días con plastic mesh filter en condiciones de luz de  $40 \text{ mEm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Pero el porcentaje de mortalidad fue elevado tanto en arena como en plastic mesh filters.

Koch and Seelinger (1988), estudiaron la germinación de las semillas de dos poblaciones de *Ruppia maritima* L. Las procedentes de un hábitat efímero germinaban mejor después de secarse, mientras que las procedentes de hábitats más estables lo hacían mejor con temperaturas altas y bajas salinidades. La estratificación de las semillas en temperaturas más bajas que en condiciones normales dañan la semilla.

Estudios sobre la germinación, almacenamiento y viabilidad de las semillas de *Zostera capricorni* Aschers. (Conacher et al. 1994), mostraron que humedeciendo las semillas con 0.5% tetrazolium a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 horas es el mejor patrón para testar la viabilidad de las semillas de *Zostera* y ahora puede usarse para asegurar que las semillas son viables antes de ser usadas en posteriores estudios de germinación. Las semillas de *Zostera noltii* Hornem. a baja salinidad (1-10‰) e incisiones en la cubierta seminal dan una rápida y casi completa germinación. Observaron también que la temperatura no afecta a las semillas con baja salinidad (1.5 y 10‰). Sin embargo, con altas salinidades (20, 30 y 40‰) las semillas sólo germinan a bajas temperaturas ( $15^{\circ}\text{C}$ ). El mayor éxito de almacenamiento de las semillas fue a  $5-10^{\circ}\text{C}$  con agua aireada. Bajo estas condiciones, el  $58 \pm 10\%$  (SE) de las semillas seguían siendo viables 50 días después.

#### **1.2.4. Experiencias de germinación con semillas de *Cymodocea nodosa* en el laboratorio (“ex situ”).**

Caye and Meinesz (1986), bajo condiciones de laboratorio de salinidad reducida y temperaturas superiores a los 17°C, indujeron la germinación de semillas de *Cymodocea nodosa* a lo largo del año. Una vez germinadas, observaron que las plántulas sólo podían desarrollarse en condiciones de salinidad comprendidas entre 15 y 30‰ ya que, cuando la salinidad fue superior a 38‰, las semillas o no germinaban o lo hacían lentamente. Estos autores concluyeron que en condiciones naturales, la germinación sólo es posible cuando la temperatura es de 20-25°C y la salinidad de 15-20‰. Esto reduce mucho la capacidad de germinación de las semillas, que se limita a los periodos de abril a octubre, y a zonas cercanas a entradas de agua dulce.

Posteriormente, Caye et al. (1991) comprobaron que la presión osmótica del medio regulaba la germinación de las semillas. Cuando la salinidad del medio era de 38‰, ésta no tenía lugar mientras que con salinidades reducidas (20‰), se veía favorecida.

Otras experiencias de germinación de semillas en laboratorio fueron llevadas a cabo por Pirc et al. (1986). Alcanzaron unos índices de germinación en el laboratorio con agua de mar a temperatura ambiente del 100% en julio. Cuando expusieron las semillas a una temperatura constante de 15 y 20°C durante la dormancia, los porcentajes de germinación fueron respectivamente del 59.5% y del 30.9%. Vieron que los más altos porcentajes de germinación ocurren con la arena procedente del lugar de recolección, aunque también se dan buenos resultados con otros substratos, e incluso las semillas pueden germinar sin substrato.

#### **1.2.5. La dormancia de las semillas en las fanerógamas marinas.**

La dormancia se define generalmente como una suspensión temporal del crecimiento visible en distintas estructuras de la planta (por ejemplo yemas que contienen meristemos).

La regulación de la dormancia de yemas vegetales es un proceso complejo necesario para la supervivencia de las plantas, su desarrollo y

arquitectura. En muchos casos salir del estado de dormancia se traduce en un aumento de la división celular y en cambios en los programas de desarrollo. Señales internas, tales como hormonas y azúcares, y señales externas, como la luz, actúan de modo específico coincidiendo con señales de transducción que regulan la endo, eco y paradormancia (Horvath et al., 2003).

Según McMillan (1981), las semillas de *Halodule wrightii* sufren largos periodos de dormancia, que pueden durar varios años, ya que esta dormancia implica al embrión y a la cubierta seminal. Mientras, *Syringodium filiforme* presenta periodos de dormancia más cortos, ya que sólo se ve implicada en la dormancia la cubierta seminal.

También McMillan (1986), trabajando con *Halophila engelmannii* (Hydrocharitaceae) observó una dormancia endógena en la semilla que se rompía al transferir la semilla a la luz.

Semillas recolectadas de *Halophila spinulosa* (R.Br) Aschers. mostraron periodos de dormancia de unas 5 semanas en el laboratorio (Birch, 1981).

Las semillas de *Phyllospadix iwatensis* Makino (Zosteraceae) tienen un periodo de dormancia de 6 semanas (Kuo et al., 1990).

Sin embargo, otras especies como *Zostera noltii*, no presentan dormancia primaria de la semilla, y son las condiciones desfavorables del ambiente, y la impermeabilidad del tegumento los factores que previenen de una rápida germinación (Loques, Caye and Meinesz, 1990).

Koch and Seelinger (1988), estudiaron la germinación de las semillas de dos poblaciones de *Ruppia maritima* L., y observaron que en ambas poblaciones, las semillas parecen no requerir de un periodo de dormancia.

Estudios de germinación con *Zostera capricorni* Aschers. (Conacher et al. 1994), mostraron que las semillas no tienen una dormancia primaria, ya que a baja salinidad (1-10‰) e incisiones en la cubierta seminal dan una rápida y casi completa germinación.

### **1.2.6. La dormancia de las semillas en *Cymodocea nodosa***

La dormancia de las semillas en las fanerógamas permite la germinación a lo largo de un extenso periodo de tiempo y asegura la supervivencia en áreas perturbadas así como la colonización de nuevos hábitats.

La germinación sin dormancia se ha recogido para algunas especies (Den Hartog, 1970), mientras que para otras, incluida *Cymodocea*, se cree que se da un periodo de dormancia en las semillas (McMillan, 1981).

Bornet (1864), en su trabajo de *Phucagrostis major* Caval.(= *Cymodocea nodosa*) menciona que las semillas no germinan durante el invierno.

Pirc et al (1986) dijeron que las semillas de *Cymodocea nodosa* presentan distintos periodos de dormancia, entre 7 y 8 meses, y comienzan a germinar en mayo. En zonas templadas como el Mediterráneo, la dormancia de las semillas de *Cymodocea nodosa* puede verse como una adaptación a las condiciones ambientales del invierno, que son desfavorables para la germinación.

Buia and Mazzella (1991) estudiaron el ciclo reproductivo de *Cymodocea nodosa*, y observaron que duraba 12 meses, con unos 2 meses para la antesis y 2 meses para la formación del fruto, seguido de un periodo de dormancia de 8 meses.

Caye, Bulard, Meinesz and Loques (1991) observaron que las semillas de *Cymodocea nodosa* muestran una dormancia secundaria inducida por las condiciones normales de salinidad en el medio de 38‰. La germinación de la semilla se acompaña por la toma de agua del exterior. La cantidad de agua suplementaria que recoge la semilla presenta una relación inversa con la presión osmótica externa. Es decir, a mayor presión osmótica externa, menor cantidad de agua coge la semilla.

### **1.3. EL HÁBITAT FORMADO POR LAS FANERÓGAMAS MARINAS: IMPORTANCIA, PROBLEMÁTICA Y GESTIÓN.**

Según Sánchez-Jerez (2003), la mayoría de especies de fanerógamas marinas prefieren sustratos blandos donde pueden enterrar sus raíces y donde no tienen apenas competencia con otros macrófitos por el sustrato. La capacidad de colonizar este sustrato va a depender del hidrodinamismo, ya que en áreas donde existe una gran movilidad del sedimento por las corrientes o el oleaje, las fanerógamas se descalzan del sustrato y la pradera se erosiona.

El límite de la profundidad hasta donde pueden crecer las fanerógamas marinas va a depender de la irradianza de compensación ( $I_c$ =irradiación lumínica que permite una fotosíntesis suficiente para contrarrestar la respiración). La luz requerida como mínimo por las plantas marinas es, en promedio, un 11 % de la luz incidente en la superficie. La profundidad máxima a la que puede desarrollarse una pradera depende de los requerimientos de la especie considerada y de la transparencia del agua. Existen praderas, por ejemplo de *Halophila* en la Gran Barrera de Coral Australiana, que pueden alcanzar los 40 metros de profundidad. Otras especies, en función de la protección de la costa y el hidrodinamismo, pueden crecer en zonas intermareales y soportar la emersión durante períodos relativamente largos, como es el caso de *Zostera noltii*, que forma extensas praderas en el piso intermareal del océano Atlántico (Sánchez-Jerez, 2003).

#### **1.3.1. Importancia de las praderas de fanerógamas marinas.**

Las fanerógamas marinas ocupan extensas zonas en ambientes costeros y estuáricos, coincidiendo con la zona litoral donde también se da una mayor actividad humana, como la pesca y el turismo. El hábitat que forman estas praderas tiene una importante función ecológica y es un recurso económico muy provechoso. Además juegan un papel primordial en procesos costeros, incrementando la riqueza de especies, su abundancia y biomasa en comparación con sustratos sin vegetación (Sánchez-Jerez, 2003).

Esto es debido a que la existencia de la planta incrementa el espacio habitable y la complejidad física del área, proveyendo de protección y substrato a una gran variedad de plantas y animales (Stoner, 1983; Hargeby, 1990; Ansari et al., 1991).

Por otra parte las hojas, los rizomas y las raíces de las fanerógamas son utilizados por muchas especies de interés comercial como zonas de puesta y desarrollo de los juveniles (Bell y Pollard, 1989).

Además la cantidad de alimento disponible en las praderas de fanerógamas es varios órdenes de magnitud mayor en comparación con otros hábitats (Judge et al., 1993). Esto es debido a que la producción primaria de todo el sistema es favorecida con la captura de partículas orgánicas y nutrientes presentes en el agua y sedimentos.

En combinación a la propia producción primaria, los epífitos algales pueden presentar una alta productividad y ser la principal fuente de alimentos para la fauna en praderas de fanerógamas marinas (Van Montfrans et al., 1984; Schneider and Mann, 1991).

Las fanerógamas marinas pueden afectar a las características del ambiente, reduciendo la velocidad de las corrientes (Fonseca and Calahan, 1992) e incrementando la deposición y estabilidad del sedimento, impidiendo así que se produzcan grandes desplazamientos y preservando a la flora microbiana que vive en el sedimento. La reducción de la velocidad de la corriente puede favorecer la capacidad de alimentación así como un mayor asentamiento larvario (Mann and Lazier, 1996).

### **1.3.2. Regresión de las praderas de fanerógamas marinas y su protección.**

Las praderas de fanerógamas marinas se encuentran en la actualidad en regresión, haciendo referencia con este término a la destrucción total o parcial de su estructura, afectando asimismo a la comunidad asociada. La principal causa de esta regresión, además de las perturbaciones naturales, son las actividades humanas, como pueden ser los vertidos ligados a los asentamientos humanos e industriales en el litoral o por accidentes navales, el

anclaje de embarcaciones, las construcciones costeras, las playas artificiales y la pesca de arrastre (Sánchez-Jerez, 1994; 2003).

Como medidas de protección se deben adoptar leyes que protejan específicamente las praderas de fanerógamas, leyes que regulen las actividades que afectan a praderas, o leyes que promuevan la protección de áreas donde crecen fanerógamas marinas, como son la delimitación de reservas marinas o la instalación de arrecifes artificiales para evitar la pesca de arrastre (Sánchez-Jerez, 2003).

*Cymodocea nodosa* está incluida en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias, regulado por el decreto 151/2001, de 23 de julio, como “sensible a la alteración del hábitat”. Por otra parte, el tipo de hábitat constituido por los sebales se encuentra recogido en la Directiva 92/43/CEE, de 21 de mayo, del Consejo, relativa a la conservación de los hábitat naturales y de la fauna y flora silvestres, con el Código número 1110, estando pues protegidos por la Unión Europea. Cualquier actuación que cause una regresión, degradación o destrucción del sebadal puede considerarse una agresión medioambiental grave.

### **1.3.3. Rehabilitación y programas de restauración.**

Desde la segunda mitad del siglo XX llevan realizándose actuaciones en praderas de fanerógamas marinas degradadas por la actuación humana, con el fin de mejorar las condiciones ecológicas de las mismas (Fonseca et al., 1998; Phillips, 1980, 1990; Gordon, 1996).

Experimentos de restauración y proyectos de mitigación empleando diferentes especies han sido llevados a cabo con diferentes grados de éxito en Norte y Centro América (Sheridan et al., 1998; Harwell and Orth, 1999), Australia (e.g., Paling et al., 1998; 2000; Lord et al., 1999), Japón (e.g., Kawasaki et al., 1988; Watanabe & Terawaki, 1986) y Europa: Gran Bretaña (Ranwell et al., 1974), Dinamarca (Christensen et al., 1995), Holanda (Katwijk, 2003), Italia (Balestri et al., 1998; Piazzini et al., 1998) y Francia (Meinesz et al., 1993; Molenaar et al., 1993, 1995).

Las primeras experiencias de trasplante se realizaron en las costas de Estados Unidos, con las especies *Zostera marina*, *Thalassia testudinum* y *Halodule wrightii* (Addy, 1947; Phillips, 1974; Ranwell et al, 1974; Fuss and Nelly, 1969).

*Zostera marina* es una de las especies más estudiadas debido a las catastróficas pérdidas sufridas a comienzos del siglo XX, llevándose a cabo proyectos para la restauración de las praderas y la reintroducción en zonas donde existía antiguamente (Harwell and Orth, 1999; Katwijk, 2003). Junto con *Zostera*, las plantas *Thalassia testudinum*, *Halodule wrightii* y *Syringodium filiforme*, han sido foco de programas de restauración en EEUU (Thorhaug, 1983, 1985).

En Europa el mayor esfuerzo se ha realizado con *Posidonia oceanica*, intentando su recuperación de forma artificial en zonas degradadas por la pesca de arrastre o la contaminación (Cooper, 1982; Meinesz et al, 1993 (b); Balestri et al., 1998). Con *Posidonia* se han conseguido altas tasas de supervivencia después de tres años del trasplante de rizomas plagiotrópos (de crecimiento horizontal) (Molenaar et al., 1993; Molenaar and Meinesz, 1995; Piazzzi et al., 1998).

Todas estas experiencias previas y muchas más confirman que los planes de restauración y mitigación pueden ser factibles siempre que se tengan en cuenta una serie de factores como son (Sánchez-Jerez, 2003):

- a) La selección de sitios favorables para el desarrollo de la especie y de las praderas donantes.
- b) El desarrollo de una metodología apropiada.
- c) Favorecer las tasas de crecimiento para conseguir densidades y coberturas óptimas a partir de una actuación mínima.
- d) Minimizar el impacto en las praderas donantes.
- e) Conseguir reemplazar las funciones ecológicas naturales.

Uno de los mayores riesgos de los **planes de restauración** es la obtención del material de trasplante, ya que va a producir una perturbación en la pradera donante. La recolección de frutos, rizomas y semillas puede tener un efecto negativo que debe evaluarse con anterioridad. Una forma de remediar este problema es la propagación vegetativa “in vitro”, generalmente denominada micropropagación, que permita clonar en un corto espacio de tiempo las diferentes especies de fanerógamas marinas y proporcionar suficiente material para el trasplante, sin dañar praderas naturales. De momento no se conocen estudios de micropropagación que hayan tenido éxito con estas fanerógamas marinas. Con *Cymodocea nodosa* se ha conseguido llegar a la fase I de la micropropagación (generación de callo), y al establecimiento del cultivo “in vitro”, lo que ha servido para realizar estudios fisiológicos con distintos reguladores de crecimiento que servirán para el posterior establecimiento de las fases II y III de la micropropagación (García Jiménez et al, 2005).

*Ruppia maritima* es la única especie que se ha conseguido cultivar en el laboratorio y trasplantarla con éxito al medio natural (Bird et al, 1994).

La mayoría de los estudios se centran en la obtención de cultivos axénicos en laboratorio, bajo condiciones controladas (McMillan, 1980), y van más dirigidos hacia el estudio de parámetros fisiológicos, que hacia la obtención de plántulas para la restauración de los fondos.

Se ha conseguido el cultivo “in vitro”, en condiciones axénicas, de distintas especies de fanerógamas marinas como *Heterozostera tasmanica* (Hamill and Sumb, 2002), *Thalassia testudinum* (Moffler and Durako, 1984; Durako and Moffler, 1987), *Halophila ovalis*, *Posidonia australis* y *Posidonia coriacea* (Wilson and Bennett, 2002), *Posidonia oceanica* (Loques et al., 1990; Balestri et al., 1998; Balestri and Bertini, 2003), *Halophila decipiens* (Bird et al., 1998), *Halophila engelmannii* (Jewett-Smith and McMillan, 1990; Bird and Jewett-Smith, 1994), *Ruppia maritima* (Koch and Durako, 1991), y *Cymodocea nodosa* (Terrados, 1995; García Jiménez et al., 2005). El cultivo axénico y el tratamiento con reguladores de crecimiento (auxinas en el caso de *Posidonia oceanica*) pueden favorecer el establecimiento de estas plántulas en futuras replantaciones (Balestri and Bertini, 2003).

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo principal de este estudio es la obtención de plántulas de *Cymodocea nodosa* en el laboratorio, su aclimatación y trasplante al mar, como futura medida correctora para la recuperación y restauración de praderas degradadas o en regresión. Para ello, las técnicas *in vitro* deberán ser orientadas hacia la embriogénesis somática, de forma que parece evidente que primero tenga que controlarse la germinación y propagación de las semillas.

Planteamos como hipótesis de partida que la baja salinidad o la estratificación de las semillas con frío podrían activar la semilla y actuar contra los inhibidores que provocan la endodormancia de la semilla. Partimos de que las semillas de *Cymodocea nodosa* sufren un periodo de dormancia de 7-8 meses desde que se forma el fruto en la planta en los meses de julio y agosto, hasta que germina la semilla en la primavera del año siguiente (Caye & Meinesz 1985, 1986; Buia & Mazzella, 1991). También nos basamos, según la bibliografía, en que para romper esta dormancia son necesarias condiciones de baja salinidad u aportes de agua dulce (Caye & Meinesz, 1986).

Dividimos el estudio en tres fases:

I). La obtención de plántulas de *Cymodocea nodosa* a partir de semillas germinadas de forma aséptica, y bajo condiciones controladas en el laboratorio.

Realizaremos distintos tratamientos para inducir la germinación de las semillas, bajando la salinidad y aplicándoles frío. Una vez germinadas les añadiremos ácido giberélico, como inductor del desarrollo de la plántula (Terrados 1995, García-Jiménez et al., 2005).

II). Fase de aclimatación en acuarios. Una vez obtenidas las plántulas se acondicionarán los acuarios (luz, temperatura y agua corriente) para mantenerlas vivas durante el mayor tiempo posible y poder estudiar su crecimiento y desarrollo.

III).Trasplante al mar. Una vez que las plántulas hayan crecido lo suficiente, se llevarán al mar y se realizará un seguimiento durante los meses siguientes para obtener datos de supervivencia y crecimiento.

### **3. MATERIAL Y METODOS.**

#### **3.1. RECOGIDA DE SEMILLAS.**

Se recogieron a finales de abril de 2004, por medio de escafandra autónoma, 103 semillas en una pradera situada en la costa sureste de Gran Canaria, en la localidad de Juan Grande. Se trata de un sebadal en buen estado de conservación, cuyo límite inferior está situado a 4 metros de profundidad.

Para la recogida de semillas se empleó una pala para recoger arena, y un tamiz de luz de malla de 4 mm para tamizar la arena "in situ". Las semillas se encontraron tanto en superficie como a pocos centímetros de profundidad, entre las raíces de la planta, y se fueron guardando en botes de tapa roja, con agua de mar.

Una vez fuera del mar, y hasta la puesta en germinación de las semillas, estas se guardaron en los mismos botes, y en condiciones de oscuridad para evitar una posible activación de la semilla.

A principios de junio, para realizar el tratamiento de frío, se recogieron 30 semillas en la misma zona por medio de escafandra autónoma. Se conservaron en frío (4°C) durante 48 horas.

#### **3.2. ESTERILIZACIÓN DE LAS SEMILLAS**

Cada semilla lleva un tratamiento de esterilización previo a la siembra, para eliminar la flora bacteriana externa.

1º) Se frota la semilla con un pincel o cepillo de dientes.

2º) Se sumergen 10 minutos en lejía al 10% con agua de mar esterilizada + una gota de Tween 80.

3º) Se lavan 3 veces en agua de mar esterilizada.

### 3.3. EL MEDIO DE CULTIVO

Para sembrar las semillas se utilizaron unos recipientes tipo Magenta<sup>R</sup> – G7 (Sigma Co.) (Fig. 14) con arena y agua de mar esterilizada.



Fig. 14. Recipiente tipo magenta.

El agua de mar primero se diluye hasta conseguir la salinidad adecuada para cada tratamiento, y luego se enriquece con nutrientes y soluciones nutritivas. El medio de cultivo empleado se presenta en las Tablas I-IV y esta basado en la formulación de Provasoli (PES, Provasoli Enriched Seawater, Provasoli, 1968) y reformulado en base a experimentos previos con *Cymodocea nodosa* (García Jiménez et al., 2005).

Compuesto	Cantidad (mg)
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	50,34
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1140
Mn SO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	122,90
ZnCl <sub>2</sub>	10,48 (*)

CoCl <sub>2</sub>	4,03 (*)
Na-EDTA.2 H <sub>2</sub> O	1000

**(\*) a partir de solución stock conteniendo 104,8 mg de Zn y 40,3 mg de Co en 10 ml de agua destilada (añadir 1ml a 200 de PII)**

Tabla I: Composición de las soluciones de micronutrientes (PII) usada en la elaboración del medio PES (cantidad de compuesto para 200 ml de solución en agua bi-distilada).

Compuesto	Cantidad (mg)
FeSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	245
Na-EDTA.2H <sub>2</sub> O	330

Tabla II: Composición de la solución de EDTA ferroso (EDTA-Fe) del medio PES (cantidad de compuesto para 50 ml de agua bi-distilada).

Vitamina	Cantidad (mg)
Tiamina-HCl	100
Biotina	1(*)
Piridoxina	1(*)
B <sub>12</sub>	0,2(*)

**(\*) A partir de solución stock con 10 mg en 10 ml de agua destilada para biotina y piridoxina y 1mg en 20 ml para B<sub>12</sub> (preparar y añadir en su totalidad)**

Tabla III: Composición de la solución de vitaminas empleadas en la elaboración del medio PES (cantidades para 100 ml de agua bi-distilada).

Compuesto o solución	Cantidad
NH <sub>4</sub> Cl	70 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mg
Solución PII	1 ml

Solución EDTA-Fe	0,5 ml
Solución vitaminas	1 ml
Agua de mar	1000 ml

Tabla IV: Composición final del medio de cultivo PES (Provasoli, 1968).

Las soluciones de las Tablas I a III son las soluciones madre de los nutrientes, de las cuales añadimos una pequeña cantidad al medio (Tabla IV). Se formulan y construyen por separado, para evitar la interacción entre elementos y la formación de precipitados ya que se añaden en solución y acompañados por agentes quelantes como el EDTA. Esto es especialmente valido para el hierro, cuya forma libre se oxida y precipita.

El nitrógeno y el fósforo son nutrientes esenciales y limitantes del crecimiento de los vegetales en general. En el medio PES reformulado (Tabla IV), el nitrógeno se añade como cloruro de amonio y el fósforo como fosfato potásico dibásico, ya que son la fuente de nutrientes que mejor asimilan los explantos de *Cymodocea nodosa* (García-Jiménez et al., 2005).

A continuación se esteriliza en el autoclave (121°C, 20 min), la arena y el agua diluida y enriquecida, dispuestos ya en sus magentas (Fig. 15).

Dejaremos reposar los magentas durante dos días antes de meter las semillas, para que se igualen los niveles de fósforo y nitrógeno entre el agua y el sedimento.



Fig. 15. Autoclave.

### 3.4. GERMINACION DE LAS SEMILLAS

Se llevaron a cabo 2 experiencias distintas para inducir la germinación de las semillas de *Cymodocea nodosa*:

#### 3.4.1. Disminución de la salinidad

Se trataron las semillas con 4 salinidades distintas, para lo que se ajustó con agua bidestilada (DDW) el agua de mar utilizada como base y de acuerdo a las siguientes proporciones:

- 36‰ (100% sea water).
- 18‰ (50% sea water- 50% agua doble destilada, DDW)
- 11‰ (30.5% sea water- 69.5% agua doble destilada, DDW)
- 5‰ (13.8% sea water- 86.2% agua doble destilada, DDW)

Para cada tratamiento de salinidad se emplearon 12 recipientes tipo magenta y se sembraron 2 semillas en cada uno para evaluar el efecto “semilla” en cada tratamiento. El tamaño muestral fue determinado por Statgraphics 5.1.

Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivo tipo Koxka a  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $30\ \mu\text{moles de fotones m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  a nivel de los recipientes de cultivo y se les cambió el medio de cultivo de forma periódica cada 20 días. A partir del segundo mes, se homogeneizaron todas las salinidades al 36‰ y se añadieron concentraciones de  $10^{-6}\text{M}$  de  $\text{GA}_3$ . El  $\text{GA}_3$  (ácido giberélico) es un regulador de crecimiento endógeno en las plantas y aplicado de forma exógena produce una amplia variedad de respuestas en el desarrollo de la plántula. Según el estudio realizado por Terrados (1995) y García-Jiménez et al. (2005) con distintos reguladores de crecimiento, fue el ácido giberélico el que más eficazmente indujo el crecimiento de las hojas y las raíces en *Cymodocea nodosa*.

De las 103 semillas recolectadas para los tratamientos de salinidad, 48 se plantaron el 27-04-04 (tarros del 1 al 6 de cada tratamiento) y 55 el 04-05-04 (tarros del 7 al 12 de cada salinidad) por lo que hay entre ellas una diferencia

de 7 días. A los 15-20 días después de la siembra se observó el estado de germinación de las semillas. A partir de este momento se tomaron datos sobre el porcentaje de germinación y estado de crecimiento una vez al mes, durante los meses de mayo, junio y julio.

Para estudiar la germinación de las semillas se creó un índice semicuantitativo de 0 a V, según el estado de desarrollo de la plántula:

**0**⇒ No se ha inducido la germinación, la semilla permanece en estado de dormancia (Fig. 16).

**I**⇒ Primer estadio de germinación: el extremo distal de la cresta dorsal del fruto se abre y se separa del resto permitiendo la salida del cotiledón (Fig. 17).

**II**⇒ Segundo estadio de germinación: El cotiledón se elonga y se vuelve verde (Fig. 18).

**III**⇒ Estado en el que el cotiledón alcanza aproximadamente 4 cm de largo y la radícula se desarrolla (Fig. 19).

**IV**⇒ Desarrollo de la primera hoja (Fig. 20).

**V**⇒ Plántula con 2 o 3 hojas (Fig. 21).

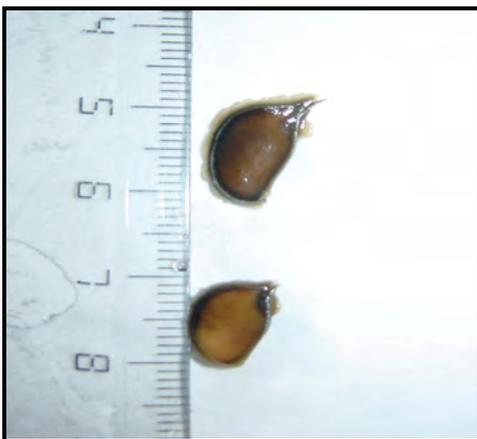


Fig. 16. Estado de desarrollo 0.



Fig. 17. Estado de desarrollo I.



Fig. 18. Estado de desarrollo II.



Fig. 19. Estado de desarrollo III.



Fig. 20. Estado de desarrollo IV.



Fig. 21. Estado de desarrollo V.

### **3.4.2. Tratamiento con Frío.**

A principios de Junio se recogieron de la misma pradera donante 30 semillas para realizar las experiencias con frío. Se conservaron durante 48 horas a una temperatura de 4°C para intentar romper la dormancia inicial de las semillas.

Las semillas siguieron el mismo proceso de esterilización que las anteriores, y se sembraron en 12 magentas con agua de mar al 36‰, enriquecida con PES y ácido giberélico como regulador del crecimiento.

Los magentas se guardaron en la cámara de cultivo y se les renovó el medio de forma periódica cada 20 días, durante los 3 meses que duró el experimento.

### 3.5. FASE DE ACLIMATACIÓN.

Para la aclimatación de las plántulas se empleó un acuario de 160m<sup>3</sup>, con una profundidad de arena de 10 cm y flujo continuo de agua de mar (Fig. 22).



Fig. 22. Acuario.

Se empleó un radiómetro (LI. 192SA Underwater Quantum Sensor de Licor-INC) para medir la luz incidente. Se obtuvieron unos datos medios de luz en el acuario de 39,4W/m<sup>2</sup> en días luminosos, 0,0004W/m<sup>2</sup> en días nublados, y 18,82W/m<sup>2</sup> en días intermedios. Se empleó un oxímetro para controlar la temperatura y el oxígeno disuelto en el acuario y en el medio natural (Tabla V).

	<b>ACUARIO</b>	<b>MAR</b>
<b>Oxígeno disuelto</b>	6,21 mg/l	6,71 mg/l
<b>Temperatura</b>	23,09 °C	22,71 °C

Tabla V. Media de los parámetros físicos y químicos en el acuario y en el medio natural.

Para favorecer el desarrollo de la plántula y su aclimatación se introdujeron en el sedimento, cada 15 días, barritas de nutrientes COMPO de difusión lenta, compuestos por un 12% de Nitrógeno total (N), 6% Anhídrido Fosfórico (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), 9% Oxido de Potasio (K<sub>2</sub>O) y Microelementos.

En todas las etapas de desarrollo de la plántula se tomaron fotos con una cámara digital (SONY P9), y se midió cada 15 días la longitud de la hoja más larga y de la hoja más corta desde su inserción con la semilla; se contó el número de raíces y de haces foliares, y se midió la longitud de la raíz más larga. Los datos se presentan en forma de tasas de crecimiento y en intervalos de tiempo de 15 días ( $t_1 - t_0 = 15$ ):

**Phyllochron ( $\text{cm} \cdot \text{d}^{-1}$ ):**

$$\text{Phy} = \frac{\text{LMF } t_1 - \text{LMF } t_0}{t_1 - t_0}$$

**Phy** = Phyllochron.

**LMF** = Longitud Media Foliar.

**$t_1 - t_0$**  = intervalo de tiempo de 15 días.

**Plastochron ( $\text{n}^\circ \text{haces foliares} \cdot \text{día}^{-1}$ ):**

$$\text{PI} = \frac{\text{NMHF } t_1 - \text{NMHF } t_0}{t_1 - t_0}$$

**PI** = Plastochron.

**NMHF** = N° medio de haces foliares.

**$t_1 - t_0$**  = intervalo de tiempo de 15 días.

**Tasa de emisión de raíces ( $\text{n}^\circ \text{raíces} \cdot \text{d}^{-1}$ ):**

$$\text{TER} = \frac{\text{NMR } t_1 - \text{NMR } t_0}{t_1 - t_0}$$

**TER** = Tasa de emisión de raíces.

**NMR** = N° medio de raíces.

**$t_1 - t_0$**  = intervalo de tiempo de 15 días.

**Tasa de crecimiento de la raíz ( $\text{cm} \cdot \text{d}^{-1}$ ):**

$$\text{TCR} = \frac{\text{LMR } t_1 - \text{LMR } t_0}{t_1 - t_0}$$

**TCR** = Tasa de crecimiento de la raíz.

**LMR** = Longitud media de las raíces.

**$t_1 - t_0$**  = intervalo de tiempo de 15 días.

Se emplearon los programas SIGMAPLOT para la representación gráfica de las distintas tasas de crecimiento halladas y los programas STATGRAPHICS PLUS 5.1 y SPSS V12.01 para realizar el análisis estadístico de los resultados (ANOVA, Kruskal-Wallis y Regresión lineal).

### 3.6. TRASPLANTE AL MAR

A principios de septiembre, tras mes y medio de aclimatación, se llevaron las plántulas al mar, y se realizó el seguimiento de las plántulas durante los meses siguientes y se calculó su supervivencia y su tasa de crecimiento o phyllochron en intervalos de tiempo de 30 días:

**Phyllochron (cm\*d<sup>-1</sup>):**

$$\text{Phy} = \frac{\text{LMF } t_1 - \text{LMF } t_0}{t_1 - t_0}$$

**Phy** = Phyllochron.

**LMF** = Longitud Media Foliar.

**t<sub>1</sub>-t<sub>0</sub>** = intervalo de tiempo de 30 días.

Para la fijación de las plantas al fondo se ataron previamente a una malla, la cual se fijó con grapas al fondo (Figs. 23-24). Se delimitó una parcela de 1m<sup>2</sup> con estacas y cuerda en el borde de una pradera laxa situada cerca del muelle de Taliarte, a una profundidad de 6 m (Figs. 25-28).

Se realizó un primer aporte de nutrientes en forma de barritas de nutrientes COMPO de difusión lenta, para facilitar la etapa crítica del transplante.

Se realizaron fotos de la parcela y las plántulas con una cámara digital SONY P9 + carcasa submarina.



Fig. 23. Detalle de la plántula unida a la malla.



Fig. 24. Plántulas unidas a la malla.



Fig. 25. Parcela con las plántulas enterradas.

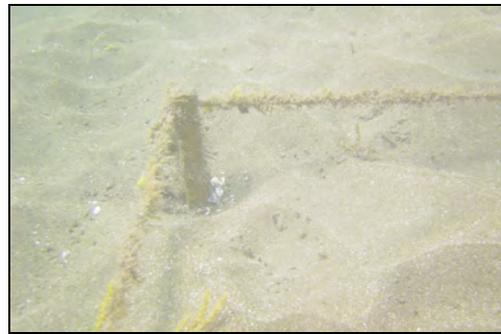


Fig. 26. Detalle de parcela.



Fig. 27. Parcela con las plántulas enterradas.



Fig. 28. Parcela con plántulas enterradas.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. SALINIDAD

En la siguiente tabla se muestran los resultados globales de germinación durante los tres meses que duró el experimento (Tabla VI).

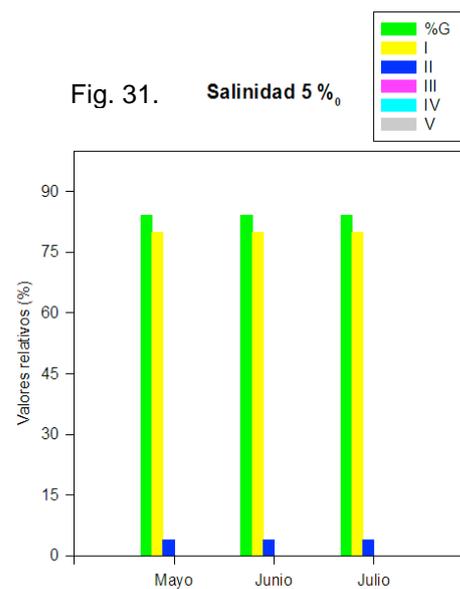
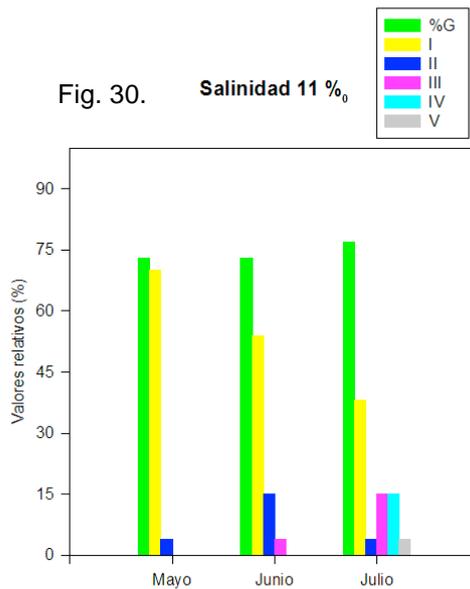
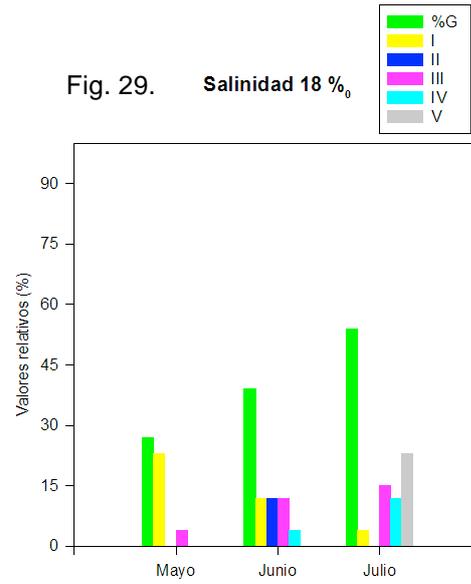
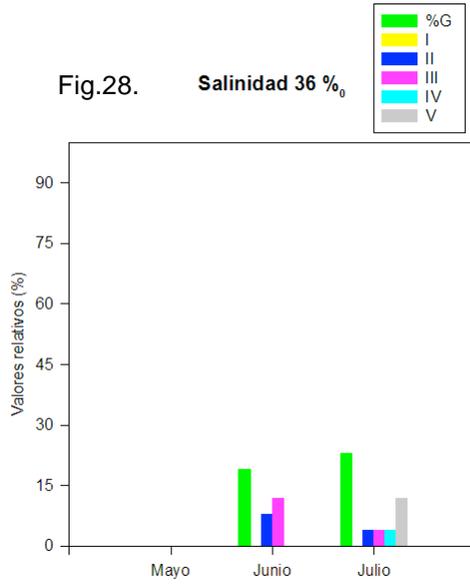
	% germinación
1 <sup>er</sup> mes	45,6
2 <sup>o</sup> mes	53,5
3 <sup>er</sup> mes	59,2

Tabla VI. % de germinación total durante el experimento.

En conjunto, se obtuvieron un 59,2% de germinaciones teniendo en cuenta todos los tratamientos empleados. Se puede observar que el grueso de las germinaciones se da en el primer mes, con un 45,6% del total. Estas germinaciones son debidas, en su mayoría, a la respuesta de las semillas a los tratamientos con salinidad reducida (5‰ y 11‰), como veremos más adelante. El segundo y tercer mes el porcentaje de germinación total aumenta ligeramente, con un incremento de 8 y 6 puntos respectivamente, en relación al mes anterior. Estas germinaciones más tardías ocurren con los tratamientos de mayor salinidad (36‰ y 18‰), en los que ésta tarda más en llegar.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Caye and Meinesz (1986) en su estudio experimental sobre la germinación de *Cymodocea nodosa*. Estos autores observaron que cuanto más baja es la salinidad y más alta es la temperatura (20-25°C) más rápida es la germinación y más alto el porcentaje de germinación.

Se estudió el efecto tratamiento. Para ello se hallaron los porcentajes de germinación inducidos en cada tratamiento y el crecimiento de las plántulas en relación al índice semicuantitativo propuesto (Figs. 28-31):



Figs. 28-31. Porcentaje de germinación según los diferentes tratamientos de salinidad (36‰, 18‰, 11‰ y 5‰) y estado de desarrollo de las plántulas en % según el índice de crecimiento propuesto, durante los meses de mayo, junio y julio.

**Salinidad 36‰** (Fig. 28)

Este tratamiento es considerado como el control, ya que no hemos manipulado la salinidad, es la salinidad propia del agua de mar. Esto hace que no se induzca la germinación en un primer momento, tal y como vemos en la Fig. 28 para el mes de mayo. Es en el segundo mes, en junio, cuando se da un aumento considerable en el porcentaje de germinación (19,2%). Además podemos observar que aunque las semillas germinadas son pocas, las plántulas en seguida crecen y se desarrollan bien, alcanzando los estadios II (7,5%) y III (11,5%) de crecimiento. En el tercer mes la germinación aumenta ligeramente alcanzando un máximo del 23%. Se observa un desarrollo progresivo en el crecimiento de las plántulas, ya que el 20% se encuentra entre los estadios III-V.

Finalmente todas las semillas germinadas con este tratamiento (23%) se desarrollaron bien y llegaron hasta la fase de aclimatación.

**Salinidad 18‰** (Fig. 29)

En este tratamiento se induce la germinación de forma progresiva a lo largo de los tres meses de estudio. De una germinación inicial del 27% en mayo, pasa a un 38,5% de germinaciones en junio, para finalizar en julio con un máximo de 54%.

Observamos que en este tratamiento las semillas pasan rápidamente del estado I, llegando en poco tiempo a los estados de mayor desarrollo. En el mes de julio, con el tratamiento de salinidad de 18‰, el 50% de las semillas se encuentran entre los estados de crecimiento III y V, muchas de ellas con 2 o más hojas. Al finalizar el tratamiento se observa que todas las semillas germinadas (54%) se desarrollan hasta plántula y pasan a la fase de aclimatación.

**Salinidad 11‰** (Fig. 30)

En la Fig. 30 podemos observar como este tratamiento induce la germinación de forma elevada en el primer mes, con un 73% del total de las

semillas. El porcentaje de germinación se mantiene prácticamente constante en los meses siguientes, con un 73% en junio y un 77% en julio.

Este tratamiento resulta algo agresivo para las plántulas recién germinadas. Inicialmente todas las semillas germinadas se encuentran en el estado I (70%). Parte de ellas (38,5%) sigue un crecimiento normal en los meses siguientes, alcanzando en julio los estadios III, IV y V. Sin embargo el 40% de las semillas germinadas el primer mes mueren en el estado I, y no continúan su desarrollo.

### **Salinidad 5‰** (Fig. 31)

El tratamiento con salinidad del 5‰ es el que inicialmente, mejor induce la germinación de las semillas, con un 84% de germinaciones. Sin embargo, en el segundo y tercer mes, el porcentaje de germinación se mantiene constante, lo que significa que no se han registrado más germinaciones. Además si observamos el estado de crecimiento de estas plántulas se ve que es nulo, ya que ninguna semilla continúa su desarrollo una vez germinadas. Todas las semillas mueren en el estado I (80%) y II (4%) de crecimiento, ya que no se han adaptado al cambio brusco de salinidad.

En el trabajo que realizaron Caye and Meinesz (1986) observamos unos resultados similares. Con salinidades inferiores al 15‰ obtuvieron germinaciones de cerca del 100% entre los 6 y 24 primeros días. La germinación fue rápida y elevada, sin embargo el crecimiento de la plántula lento; el cotiledón acaba volviéndose blanco y la plántula decae a los 10-20 días. Con salinidades mayores al 15‰ obtuvieron germinaciones más tardías (de 20 días a meses) y menos elevadas, pero las plántulas se desarrollaban bien. El cotiledón se vuelve verde a los 10-15 días, la primera hoja aparece la segunda semana y desarrollan las raíces adventicias entre la tercera y cuarta semana. Así concluyeron que la forma más adecuada de inducir la germinación y el desarrollo de la plántula es disminuyendo la salinidad bruscamente durante 2-6 días (10‰) donde germina el 80%, para luego mantenerla con salinidades del 27‰ durante 20 días más. Así, germina el 83% y hay un 50% de

supervivencia. Concluyeron además que cuanto mayor es la temperatura, más rápida es la germinación, pero la temperatura no afecta al % final de germinación, ya que el factor determinante en la germinación es la disminución de la salinidad.

#### 4.2. TRATAMIENTO CON FRIO.

Los resultados obtenidos fueron muy concluyentes, ya que ninguna semilla pasó del estado 0 al I. No hubo ninguna germinación. Todas las semillas permanecieron en estado de dormancia.

#### 4.3. FASE DE ACLIMATACIÓN.

Durante el mes de julio de 2004, se fueron trasladando al acuario las plántulas que alcanzaban el nivel IV y V de desarrollo, es decir, que desarrollaban la primera y segunda hoja. Se obtuvieron un total de 30 plántulas, procedentes de todos los tratamientos de salinidad excepto del de 5‰ y del tratamiento con frío. 20 plántulas se llevaron al acuario para la fase de aclimatación, el resto se usó para otros experimentos.

Nada más llegar al acuario se numeraron las plántulas del 1 al 20 y se realizó el estudio biométrico durante un mes y medio (3 periodos de 15 días), antes de llevarlas al mar (Fig. 32).

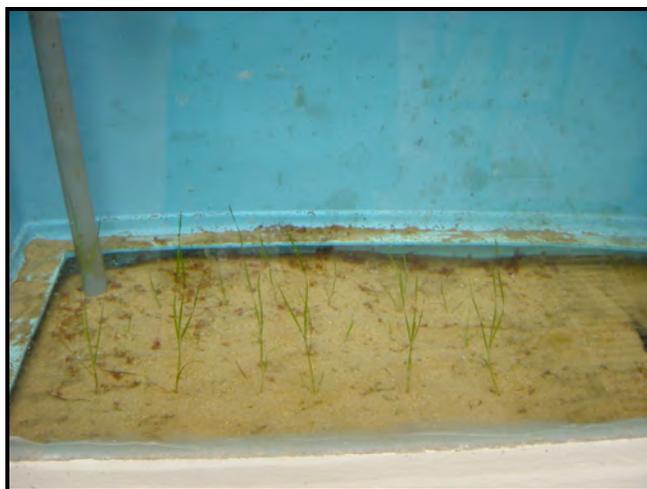


Fig. 32. Plántulas en el acuario.

Cada 15 días se introdujeron en el sedimento barritas de nutrientes de difusión lenta (12% N, 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 9% K<sub>2</sub>O y Microelementos). Estos nutrientes posiblemente favorecieron el crecimiento de las plántulas, pero no podemos concluir nada ya que se aplicaron a todas las plantas y no hubo ninguna que se tomara como control.

Las Figs. 33-36 muestran los 3 periodos de crecimiento para todos los parámetros medidos (phyllochron de la hoja larga y de la hoja corta, plastochron, tasa de emisión de raíces y tasa de crecimiento de la raíz).

En la Fig. 33 se observa la tasa de crecimiento de la hoja más larga o phyllochron en los tres periodos de crecimiento. La tasa de crecimiento en el segundo periodo (0,70cmd<sup>-1</sup>), es mucho mayor que en el primer (0,31cmd<sup>-1</sup>) y tercer periodo (0,43cmd<sup>-1</sup>). Lo mismo ocurre con la tasa de crecimiento de la hoja más corta (Fig. 34), donde la máxima capacidad de crecimiento se da en el segundo periodo con 0,36cmd<sup>-1</sup>, en relación al primer (0,21cmd<sup>-1</sup>) y tercer periodo (0,14cmd<sup>-1</sup>).

El plastochron o tasa de emisión de haces foliares\*d<sup>-1</sup> para los tres periodos se muestra en la Fig. 35, donde se observa que es en el periodo II donde más haces nuevos desarrollan las plantas (0,02hacesd<sup>-1</sup>) (Fig. 37).

La Fig. 36 nos muestra los índices de crecimiento de la raíz. Se observa que en el caso de emisión de raíces, la planta dedica el mayor esfuerzo en el periodo I, con una tasa de emisión de 0,08raíces\*d<sup>-1</sup>, que disminuye ligeramente en los periodos siguientes (0,07raíces\*d<sup>-1</sup> en el periodo II y 0,05raíces\*d<sup>-1</sup> en el periodo III). El crecimiento de las raíces se da mayoritariamente en el segundo periodo, con una tasa de crecimiento de 0,21cmd<sup>-1</sup>, y disminuye drásticamente en el tercero con una tasa de 0,04 cmd<sup>-1</sup> (Fig. 38).

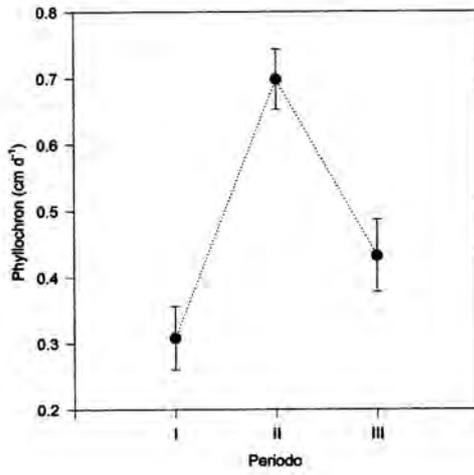


Fig. 33. Tasa de crecimiento o Phyllochron (media  $\pm$  ee) de la hoja más larga en los tres periodos de crecimiento de la aclimatación.

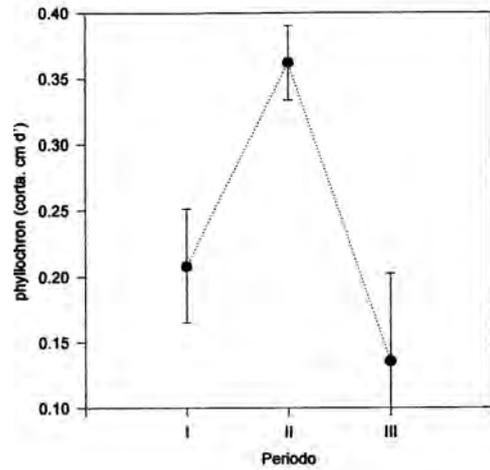


Fig. 34. Tasa de crecimiento o Phyllochron (media  $\pm$  ee) de la hoja más corta en los tres periodos de crecimiento de la aclimatación.

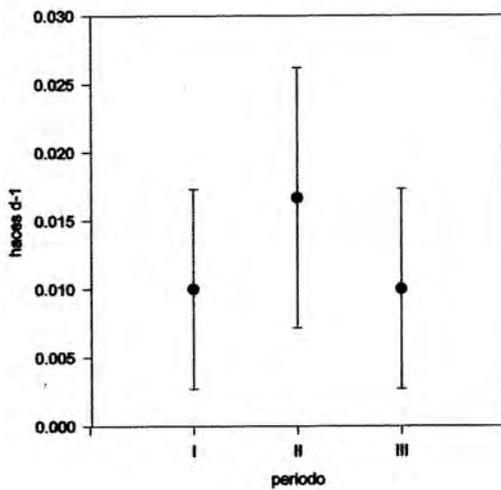


Fig. 35. Plastochron o tasa de emisión de haces foliares (media  $\pm$  ee) en los tres periodos de crecimiento de la aclimatación.

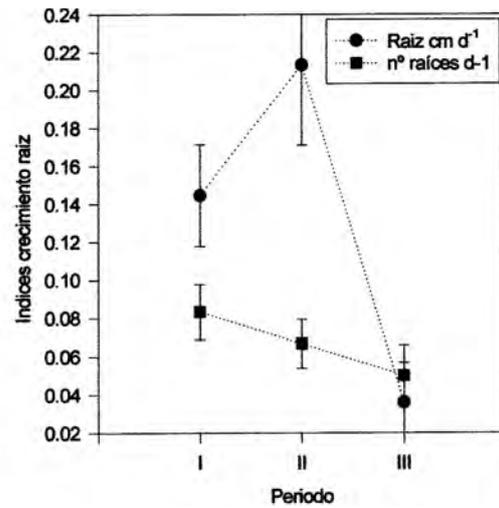


Fig. 36. Índices de crecimiento de la raíz en los tres periodos de crecimiento de la aclimatación.

- Tasa de crecimiento de la raíz (media  $\pm$  ee)
- Tasa de emisión de raíces (media  $\pm$  ee)



Fig. 37. Plántula con 2 haces, antes del trasplante al mar.



Fig. 38. Detalle del entramado de raíces.

De forma general observamos que la tasa de crecimiento en el tiempo no es lineal, hay un periodo de crecimiento máximo en las plantas, que coincide con el periodo II, excepto para la emisión de raíces que se da en el periodo I. En el periodo I el crecimiento es menor, debido posiblemente a que las plantas requieren un tiempo para aclimatarse, y ya en el tercer periodo el crecimiento se satura, y la tasa de crecimiento disminuye considerablemente.

Debido a esto, usamos los periodos de máximo crecimiento para realizar las comparaciones en las tasas de crecimiento de las plántulas en función de los distintos tratamientos de salinidad de donde proceden (Tabla VII).

Realizamos un análisis de varianza, ANOVA de un factor, tras comprobar que los datos muestran distribuciones normales y varianzas homogéneas en el caso de las hojas. Empleamos inferencia estadística no paramétrica, test de Kruskal-Wallis, para comparar las tasas de crecimiento de las raíces, ya que no siguen distribuciones normales.

	11‰	18‰	36‰	Análisis de la Varianza
<b>Phyllochron Hoja Larga (PII)</b> (cm*d <sup>-1</sup> )	0,66±0,08	0,77±0,05	0,56±0,14	ns
<b>Phyllochron Hoja Corta (PII)</b> (cm*d <sup>-1</sup> )	0,33±0,05	0,40±0,04	0,28±0,03	ns
<b>Plastochron (PII)</b> (nºhaces foliares*dia <sup>-1</sup> )	0,03±0,02	0,02±0,02	0,00±0,00	-
<b>Tasa de emisión de raíces (PI)</b> (nº raíces*d <sup>-1</sup> )	0,10±0,02	0,08±0,02	0,05±0,03	ns
<b>Tasa de crecimiento de la raíz (PII)</b> (cm*d <sup>-1</sup> )	0,23±0,05	0,27±0,06	0,04±0,05	ns

Tabla VII. Media ± error estandar de todos los parámetros medidos en su periodo de máximo crecimiento y conforme al tratamiento de salinidad del que proceden las plántulas. No hay diferencias significativas entre tratamientos. ns: diferencia no significativa ( $p \geq 0,05$ ).

Aparentemente, la tabla muestra que las plantas procedentes del tratamiento de salinidad de 18‰ crecen mejor que las procedentes del resto de tratamientos. Sin embargo, los análisis estadísticos no detectan diferencias significativas en el crecimiento de las plantas.

Al medir la longitud de las hojas y de las raíces, nos pareció en algún momento que había una correlación negativa en el crecimiento de ambas variables, es decir, que a mayor longitud de hojas, menor longitud de raíces y viceversa. Planteamos como hipótesis nula que existe una dependencia lineal negativa entre ambas variables.

Para comprobarlo hicimos un análisis de regresión lineal cuyo resultado lo observamos en la Fig. 39:

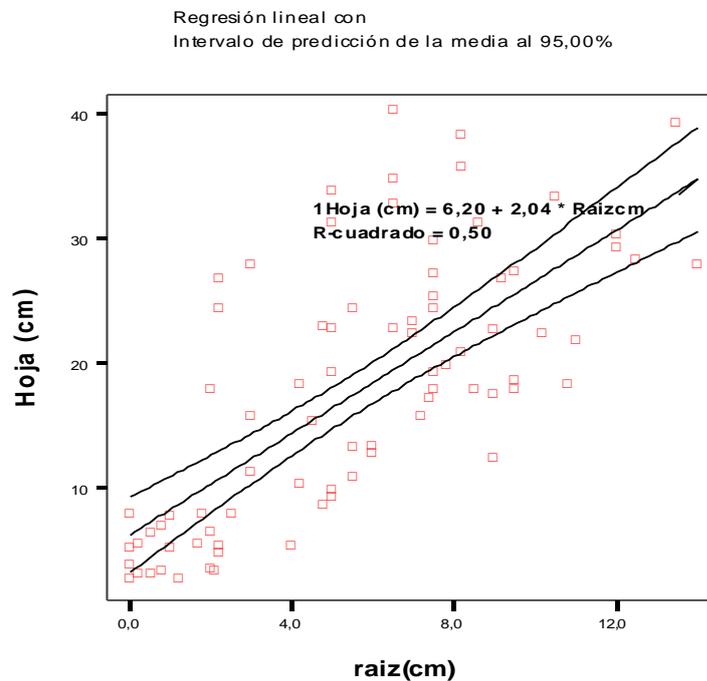


Fig. 39. Dispersión y recta de regresión para las variables longitud de hoja y longitud de raíces.

La tabla del ANOVA nos da un valor de significación inferior a 0,01 ( $p=0,000$ ), lo que nos indica que hay una relación significativa entre ambas variables. Lo mismo indica el coeficiente de correlación que es igual a 0,70.

Además el coeficiente de determinación es igual a 50, por lo que la variable raíz es capaz de explicar un 50% de la varianza de la variable hoja.

Observamos en el gráfico que se trata de una relación positiva lineal, es decir, conforme crece la raíz crece también la hoja. De esta forma rechazamos la hipótesis nula y concluimos que existe una dependencia lineal positiva moderada entre las variables.

Si en vez de tomar valores absolutos de longitud de hojas y raíces, utilizamos las tasas de crecimiento para realizar la regresión obtenemos resultados distintos (Fig. 40).

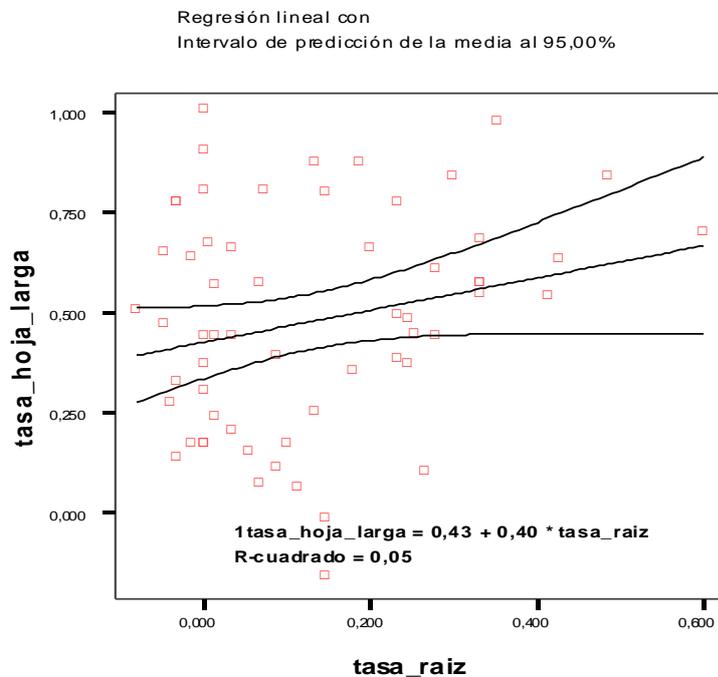


Fig. 40. Dispersión y recta de regresión para las variables tasa de crecimiento de la hoja y tasa de crecimiento de la raíz.

En esta ocasión la tabla del ANOVA nos da un valor de significación superior a 0,05 ( $p=0,07$ ), lo que nos indica que no hay una relación significativa entre ambas variables. Lo mismo indica el coeficiente de correlación que es igual a 0,23.

Además el coeficiente de determinación es igual a 0,05, por lo que la variable raíz es capaz de explicar tan solo un 0,05% de la varianza de la variable hoja. Esto nos indica que las variables son prácticamente independientes.

De esta forma rechazamos igualmente la hipótesis nula, no existe una dependencia lineal negativa entre variables.

Tras este segundo análisis concluimos que el crecimiento no es lineal, no existe una dependencia positiva ni negativa en el crecimiento de la raíz y de la hoja. No hay un crecimiento equilibrado, ni sincrónico. El ritmo de crecimiento es independiente entre ambas partes de la planta.

Esto puede ser debido al estrés que sufren las plantas en el periodo de aclimatación debido a la manipulación que hicimos de ellas para la toma de datos, lo que puede llevarles a un desequilibrio en el crecimiento. Más grave sería si este desequilibrio significara que las plantas no se han adaptado al medio, y que están haciendo uso de sus propias reservas para el crecimiento, lo que implicaría la muerte segura a los pocos meses. Pero esto deberá comprobarse en estudios posteriores de aclimatación.

#### 4.4. TRASPLANTE AL MAR

Los datos de longitud de hojas medidos en el mar se presentan en la Tabla VIII en forma de tasas de crecimiento (Phyllochron):

	Periodo I (Sept-Oct)	Periodo II (Oct-Nov)
<b>Phyllochron Hoja Larga (cm*d<sup>-1</sup>)</b>	-0,62±0,02	-0,06±0,01
<b>Phyllochron Hoja Corta (cm*d<sup>-1</sup>)</b>	-0,24±0,01	-0,04±0,01

Tabla VIII: Media ± error estandar de la tasa de crecimiento o phyllochron (cm\*d<sup>-1</sup>) de la hoja larga y corta a lo largo de los 2 periodos de estudio.

Podemos observar como para los dos periodos y para las dos hojas, la tasa de crecimiento es negativa. El aporte de nutrientes realizado en forma de barritas no puede ser cuantificado por carecer de una experiencia control.

El crecimiento es mucho más negativo en el período I que en el II, donde parece que las plantas se estabilizan ligeramente. Esto puede ser debido a que el periodo I se corresponde con la etapa crítica que sigue al trasplante. Las plantas tienen que adaptarse a las nuevas condiciones de luz, sedimento, nutrientes, y a los posibles ataques por herbivoría.

Aunque el crecimiento descende, el porcentaje de supervivencia es relativamente elevado (Tabla IX), y se mantiene en los meses siguientes.

	<b>Nº plántulas</b>	<b>Supervivencia</b>
<b>Septiembre</b>	20	100%
<b>Octubre</b>	17	85%
<b>Noviembre</b>	17	85%

Tabla IX: Numero de plántulas y % de supervivencia de las plántulas trasplantadas al mar

La disminución en la supervivencia no es debida a la mortalidad propia de la plántula, sino a las perdidas debidas a la incorrecta fijación de la plántula a la malla.

## **5. CONCLUSIÓN**

### **I) Germinación de semillas**

- 1- De los distintos tratamientos empleados para inducir la germinación de las semillas, fueron los tratamientos de baja salinidad los que aparentemente rompieron la dormancia de la semilla. Podemos concluir que cuanto menor es la salinidad, mayor es el porcentaje de germinación. Observamos también que por muy bueno que sea el tratamiento (por ejemplo 5‰), existen semillas que no reaccionan, por lo que hay un efecto del estado inicial de la semilla.
- 2- El tratamiento con frío no sirve para romper la dormancia, por lo que no activa la germinación de la semilla.
- 3- Del estudio del crecimiento de las plántulas germinadas a partir de los distintos tratamientos de salinidad observamos que los tratamientos que inicialmente mejor inducen la germinación (11 y 5‰) no favorecen el posterior desarrollo de las plántulas. Así podemos concluir que el mejor tratamiento para inducir la germinación y posterior propagación es el de 18‰, ya que todas las semillas germinadas con este tratamiento (54%) crecen bien y llegan pronto al estado V de desarrollo.

### **II) Fase de Aclimatación.**

- 4- Respecto a la aclimatación se obtuvieron 30 plántulas de las cuales 20 pasaron a la fase de aclimatación durante mes y medio. Del estudio realizado concluimos que las plántulas no tienen una tasa de crecimiento lineal, sino que presentan un periodo de crecimiento máximo que coincide con el Periodo II, excepto para la emisión de raíces que se da en el Periodo I.
- 5- Tras los análisis estadísticos realizados concluimos que los tratamientos de salinidad afectan inicialmente a la germinación de las semillas y al desarrollo de la plántula en los primeros estadios de crecimiento, pero no arrastran los efectos a la fase de aclimatación.

### III) Trasplante al mar

- 6- Todas las plántulas que llegaron a la fase de aclimatación pudieron llevarse al mar, donde permanecieron tres meses. La supervivencia fue elevada en los meses siguientes al trasplante (85%). Las pérdidas fueron debidas posiblemente a la incorrecta fijación de la plántula a la malla.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

- Addy, C. E., 1947. Eelgrass planting guide. Maryland Conservationist 24, 16-17.
- Afonso-Carrillo, J., Gil Rodríguez, M.C., 1980. *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson (Zannichelliaceae) y las praderas submarinas o seabadales en el Archipiélago Canario. Vieraea 8, (2) 365-376.
- Ansari, Z.A., Rivonker, C.U., Ramani, P., Parulekar, A.H., 1991. Seagrass habitat complexity and macroinvertebrate abundance in Lakshadweep coral reef lagoons, Arabian Sea. Coral Reefs 10, 127–131.
- Balestri, E., Cinelli, F., 1995. Culture of seedlings of *Posidonia oceanica* under laboratory conditions. Supplemento alla R.M.
- Balestri, E., Piazzzi, L., Cinelli, F., 1998. In vitro germination and seedlings development of *Posidonia oceanica* (L.) Delile. Aquat. Bot. 60, 83- 93.
- Balestri, E., Piazzzi, L., Cinelli, F., 1998. Survival and growth of transplanted and natural seedlings of *Posidonia oceanica* (L.) Delile in a damaged coastal area. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 228, 209-225.
- Balestri, E., Bertini, S., 2003. Growth and development of *Posidonia oceanica* seedlings treated with plant growth regulators: possible implications for meadow restoration. Aquat. Bot. 76, 291-297.
- Bell, J.D., Pollard, D.A., 1989. Ecology of fish assemblages and fisheries associated with seagrasses. In A.W.D. Larkum, A.J. McComb and S.A. Shepherd (eds.), Biology of Seagrasses. A Treatise on the Biology of Seagrasses with Special Reference to the Australian Region. Aquatic Plant Studies 2, Elsevier, Amsterdam, 565-609.
- Birch, W.R., 1981. Morphology of germinating seeds of the seagrass *Halophila spinulosa* (R. Br.) Aschers. (Hydrocharitaceae). Aquat. Bot. 11, 79 - 90.
- Bird, K.T., Jewett-Smith, J., Fonseca, M.S., 1994. Use of in vitro–propagated *Ruppia maritima* for sea meadow restoration. J. Coast. Res. 10, 732 – 737.

- Bird, K.T., Jewett-Smith, J., 1994. Development of a medium and culture system for in vitro propagation of the seagrass *Halophila engelmannii*. *Can. J. Bot.* 72, 1503-1510.
- Bird, K.T., Johnson, J.R., Jewett-Smith, J., 1998. In Vitro Culture of the seagrass *Halophila decipiens*. *Aquat. Bot.* 60, 377 - 387.
- Bornet, E., 1864. Recherches sur le *Phucogrostis Major* Caval. *Ann. d. Sci. Nat. Ser. V., Bot* 1, 5-51.
- Buia, M.C., Mazzella, L., 1991. Reproductive strategies of the Mediterranean seagrasses: *Posidonia oceanica* (L.) Delile, *Cymodocea nodosa* (Ucria) Aschers., *Zostera noltii* Hornem. *Aquat. Bot.* 40, 343-362.
- Caye, G., Rossignol, M., 1983. Étude des variations saisonnières de la croissance des feuilles et des racines de *Posidonia oceanica*. *Mar. Biol.* 75, 79–88.
- Caye, G., Meinesz, A., 1985. Observations on the végétative development, flowering and seeding of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, on the Mediterranean coast of France. *Aquat. Bot.* 22, 277-289.
- Caye, G., Meinesz, A., 1986. Experimental study of seed germination in the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Aquat. Bot.* 26, 75-87.
- Caye, G., Bulard, C., Meinesz, A., Loques, F., 1991. Dominant role of seawater osmotic pressure on germination in *Cymodocea nodosa*, *Aquat. Bot.* 42,187-193.
- Christensen, P.B., Sortkjaer, O., McGlathery, K. J., 1995. Transplantation of eelgrass. National Environmental Research Institute, Silkeborg, Denmark.
- Churchill, A.C., 1983. Field studies on seed germination and seedling development in *Zostera marina*. *Aquat. Bot.* 16, 21-29.
- Clarke, S.M., Kirkman, H., 1989. Seagrass Dynamics. In: *Biology of Seagrasses: A Treatise on the Biology of Seagrasses with Special Reference to the Australian Region*. By Larkum, A.W.D, McComb, A.J., and Shepherd, S.A. (1989). Elsevier, Amsterdam.

- Conacher, C.A., Poiner, I.R., Butler, J., Pun, S., Tree, D.J., 1994. Germination, storage and viability testing of seeds of *Zostera capricorni* Aschers. from a tropical bay in Australia. *Aquat. Bot.* 49, 47-58.
- Cooper, G., 1982. Réimplantation de *Posidonia oceanica*. Protection des implants. *Bull. Ecol., Fr.*, 13 (1), 65-73.
- Den Hartog, C., 1970. Seagrasses of the World. *Verh. Kon. Ned. Akad. Wetens. Afd. Naturk. Ser. 2* 59, 1-275+31 plates
- Durako, M.J., Moffler, M.D., 1987. Nutritional studies of the submerged marine angiosperm *Thalassia testudinum*. I. Growth responses of axenic seedlings to nitrogen enrichment. *Amer. J. Bot.* 74, 234-240.
- Fonseca, M.S., Calahan, J.A., 1992. A preliminary evaluation of wave attenuation by four species of seagrass. *Est. Coast. Shelf Sci.* 35, 565-576.
- Fonseca, M.S., Kenworthy, W.J., Thayer, G.W., 1998. Guidelines for the conservation and restoration of seagrasses in the United States and adjacent waters. NOAA Coastal Ocean Program Decision Analysis Series No. 12. NOAA Coastal Ocean Office, Silver Spring, Maryland.
- Fuss, C. M., Kelly, J. A., 1969. Survival and growth of seagrasses transplanted under artificial conditions. *Bull. Mar. Sci.* 19,351-365.
- García-Jiménez, P., Navarro, E., Santana, C., Luque, A., Robaina, R.R., 2005. Anatomical and nutritional requirements for induction and sustained growth in vitro of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. *Aquat. Bot.* In press.
- Gordon, D., 1996. Status of Seagrass Restoration: Review of International Literature. Le Provost Dames and More, Perth
- Hamill, J., Sumb, J., 2002. In vitro culture of *Heterzostera tasmanica* and *Zostera muelleri*. The Western Port Sea Grass Seminar, Hastings, Victoria, Australia on 29<sup>th</sup> November 2002
- Hargeby, A., 1990. Macrophyte associated invertebrates and the effect of habitat permanence. *Oikos.* 57,338-346.
- Harrison, P.G., 1993. Variations in demography of *Zostera marina* and *Z. noltii* on an intertidal gradient. *Aquat. Bot.* 45: 63-77.

- Harwell, M.C., Orth, R.J., 1999. Eelgrass (*Zostera marina* L.) seed protection for field experiments and implications for large scale restoration. *Aquat. Bot.* 64, 51-61.
- Hootsmans, M.J.M., Vermaat, J.E., Vierssen, van W., 1987. Seed-bank development, germination and early seedling survival of two seagrass species from the Netherlands: *Zostera marina* L. and *Zostera noltii* Hornem. *Aquat. Bot.* 28, 275-285.
- Horvath, D.P., Anderson, J.V., Chao, W.S., Foley, M.E., 2003. Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends Plant Sci.* 8,11
- Jewett-Smith, J., McMillan, C., 1990. Germination and seedling development of *Halophila engelmannii* aschers. (Hydrocharitaceae) under axenic conditions. *Aquat. Bot.* 36, 167-177.
- Judge, M.L., Coen, L.D., Heck, K.L., 1993. Does *Mercenaria mercenaria* encounter elevated food levels in seagrass beds? Results from a novel technique to collect suspended food resources. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 92,141–150.
- Katwijk, M.M. Van., 2003. Reintroduction of eelgrass (*Zostera marina* L.) in the Dutch Wadden Sea; a research overview and management vision. In: Wolff, W.J., Essink, K., Kellermann, A., van Leeuwe, M. (Eds.), *Challenges to the Wadden Sea. Proceedings of the 10th International Scientific Wadden Sea Symposium, Groningen 2000.* Ministry of Agriculture Nature Management and Fisheries / University of Groningen, Dept. of Marine Biology, Den Haag, pp. 173-197.
- Kawasaki, Y., Lituka, T. et al., 1988. Study on the technique for *Zostera* bed creation. *Denryoku Chuo Kenkyusho Hokoku (U14):* 1-231.
- Koch, E.W., Seeliger, U., 1988. Germination ecology of two *Ruppia maritima* L. populations in southern Brazil. *Aquat. Bot.* 31, 321-327.
- Koch, E.M., Durako, M.J., 1991. In vitro studies of the submerged angiosperm *Ruppia maritima* L.: Auxin and cytokinin effects on plant growth and development. *Mar. Biol.* 110, 1-6.
- Kuo, J., Iizumi, H., Nilsen, B.E., Aioi, K., 1990. Fruit anatomy, seed germination and seedling development in the Japanese seagrass *Phyllospadix* (Zosteraceae). *Aquat. Bot.* 37(3), 229-245.

- Kuo, J., Den Hartog, C., 2001. Chapter 2. Seagrass taxonomy and identification key. pp 31- 58. Short, F. & Coles R.G. (Editors), 2001. Global Seagrass Research Methods. Elsevier Science. 473 pp.
- Lipkin, Y., 1977. Seagrass vegetation of Sinai and Israel. Pages 263-293 in C.P. McRoy and C. Helffericheds. Seagrass ecosystems: a scientific perspective. Marcel Dekker, N.Y.
- Loques, F., Caye, G., Meinesz, A., 1990. Axenic culture of selected tissue of *Posidonia oceanica*. Aquat. Bot. 37,171–188.
- Loques, F., Caye, G., Meinesz, A., 1990. Germination in the marine phanerogam *Zostera noltii* Hornemann at Golfe Juan (French Mediterranean) *oceanica*. Aquat. Bot. 38, 249-260.
- Lord, D., Paling, E., Gordon, D., 1999. Review of Australian Rehabilitation and Restoration Programs. In: Seagrasses In Australia: Strategic Review and Development of an R & D Plan. By Butler, A. and Jernakoff, P. (1999) CSIRO Publishing, Collingwood, p 65- 115.
- Mann, K.H., Lazier, J.R.N., 1996. Dynamics of Marine Ecosystems. Biological-Physical Interactions in the Oceans. Blackwell, Oxford. 394 pp.
- Mazzella, L., Buia, M.C., Russo, G. F., 1983-1984. Osservazioni “in situ” sul ciclo riproduttivo della *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson prairies. Rapp. Comm. Int. Mer Medit. 30, 265.
- McMillan, C., 1980. Culture Methods. In, Phillips, R.C. and C.P. McRoy (eds.). Handbook of Seagrass Biology: An Ecosystem Perspective. Garland STPM Press. New York. p. 41- 56.
- McMillan, C., 1981. Seed reserves and seed germination for two seagrasses, *Halodule wrightii* and *Syringodium filiforme*, from the western Atlantic. Aquat. Bot. 11, 279-296.
- McMillan, C., 1983. Seed germination for an annual form of *Zostera marina* from the sea of Cortez, Mexico. Aquat. Bot. 16,105-110.
- McMillan, C., 1983. Seed germination in *Halodule wrightii* and *Syringodium filiforme* from Texas and the U.S. Virgin Islands. Aquat. Bot. 15, 217- 220.
- McMillan, C., 1986. Fruits and Seeds of *Halophila engelmannii* (Hydrocharitaceae) in Texas. 2 Mar. Sci. 9, 1-8.

- McMillan, C., 1987. Seed germination and seedling morphology of the seagrass *Halophila engelmannii* (Hydrocharitaceae). *Aquat. Bot.* 28, 179-188.
- McMillan, C., 1988. Seed germination and seedling development of *Halophila decipiens* Ostenfeld (Hydrocharitaceae) from Panama. *Aquat. Bot.* 31, 169-176.
- McMillan, C., 1988. The seed reserve of *Halophila engelmannii* (Hydrocharitaceae) in redfish bay, Texas. *Aquat. Bot.* 30, 253-259.
- McMillan, C., 1988. The seed reserve of *Halophila decipiens* Ostenfeld (Hydrocharitaceae) in Panama. *Aquat. Bot.* 31, 77-182.
- Meinesz, A., Caye, G., Loques, F., Molenaar, H., 1993 (b). Polymorphism and development of *Posidonia oceanica* transplanted from different parts of the Mediterranean into the National Park of Port-Cross. *Bot. Mar.* 36, 209-216.
- Moffler, M.D., Durako, M.J., 1984. Axenic culture of *Thalassia testudinum* Banks ex König (Hydrocharitaceae). *Amer. J. Bot.* 71, 1455-1460.
- Molenaar, H., Meinesz, A., Caye, G., 1993. Vegetative reproduction in *Posidonia oceanica* survival and development in different morphological types of transplanted cuttings. *Bot. Mar.* 36, 481-488.
- Molenaar, H., Meinesz, A., 1995. Vegetative reproduction in *Posidonia oceanica*: survival and development of transplanted cuttings according to different spacings, arrangements and substrates. *Bot. Mar.* 38, 313-322.
- Ott, J., 1980. Growth and production in *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *P.S.Z.N.I. Mar. Ecol.* 1, 47-64.
- Paling, E.I., van Keulen, M., Wheeler, K., 1998. "Project S2, Phase 2: Seagrass Rehabilitation in Owen Anchorage, Western Australia. Annual report August 1997 - June 1998" Report no. MAFRA 98/4 Marine and Freshwater Research Laboratory, Murdoch University, Perth
- Paling, E.I., van Keulen, M., Wheeler, C., Wheeler, K., 2000. The effects of depth on manual transplantation of the seagrass *Amphibolis griffithii* (J.M. Black) den Hartog on Success Bank, Western Australia *Pacific Conservation Biology* 5, 314-320.

- Panayotidis, P., Giraud, G., 1981. Sur un cycle de renouvellement des feuilles de *Posidonia oceanica* (Linnaeus) Delile, dans le Golfe de Marseille (France). *Vie et Milieu*, 31(2):129-13.
- Pérez, M., 1989. Fanerógamas marinas en sistemas estuáricos: producción, factores limitantes y algunos aspectos del ciclo de nutrientes. Tesis Doctoral. Univ. Barcelona.
- Phillips, R.C., 1974. Transplantation of seagrasses, with special emphasis on eelgrass, *Zostera marina* L. *Aquaculture* 4 (1), 161-176.
- Phillips, R.C., 1980. Transplanting methods. In, Phillips, R.C. and C.P. McRoy (eds.). *Handbook of Seagrass Biology: An Ecosystem Perspective*. Garland STPM Press. New York. p. 41- 56.
- Phillips, R.C., 1990. Transplant methods. Chap. 7. In: *Seagrass research methods*. (Eds: Phillips,RC; McRoy,CP) (Monographs on Oceanographic Methodology, 9.) UNESCO, Paris, 51-54.
- Piazzzi, L., Balestri, E., Magri, M., Cinelli, F., 1998. Experimental Transplanting of *Posidonia oceanica* (L.) Delile into a Disturbed Habitat in the Mediterranean Sea. *Bot. Mar.* 41, 593-601.
- Piazzzi, L., Acunto, S., Cinelli, F., 1999. In situ survival and development of *Posidonia oceanica* (L.) Delile seedlings. *Aquat. Bot.* 63, 103-112.
- Pignatti, S., 1953. Introduzione allo studio fitosociologico della pianuraveneta orientale con particolare riguardo alla vegetazione litoranea. *Arch. Bot.* 28 (4):265-329; 29 (1): 1-25, 65-98, 129-174
- Pirc, H., Buia, M.C., Mazzella, L., 1986. Germination and seedling development of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Aschers. under laboratory conditions. *Aquat. Bot.* 26(1-2), 181-188.
- Provasoli, L., 1968. Media and prospects for cultivation of marine algae. In *Cultures and Collections of Algae* (A. Watanabe & A. Hattori, Eds.). Jap. Society Plant Physiol. Tokyo. 47-74.
- Ranwell, D.S., Wyer, D.W., Boorman, L.A., Pizzey, J.M., Waters, R.J., 1974. *Zostera* transplants in Norfolk and Suffolk, GB. *Aquaculture*. 4, 185-198.
- Reyes, J., 1993. Estudio de las praderas marinas de *Cymodocea nodosa* (*Cymodoceaceae*, *Magnoliophyta*) y su comunidad de epífitos, en el

- Médano (Tenerife, Islas Canarias). Tesis Doctoral. Universidad de la Laguna. 424 pp.
- Reyes, J., Sansón, M., Afonso-Carrillo, J., 1995. Distribution and reproductive phenology of the seagrass *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson in the Canary Islands. *Aquat. Bot.* 50, 171-180.
  - Sánchez Jerez, P., 1994. Degradación de las praderas de *Posidonia oceanica* (L.) Delile por la pesca de arrastre en El Campello (SE Ibérico): influencia sobre la estructura de la comunidad animal asociada. Tesis de licenciatura. Universidad de Alicante. Alicante, España. 123 pp.
  - Sánchez Jerez, P., 2003. Ecosistemas marinos: Sebadales. Curso de Formación en Gestión Integrada de la Zona Costera.
  - Schneider, F.I., Mann, K.H., 1991. Species speci@c relationships of invertebrates to vegetation in a seagrass bed. I. Correlational studies. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 145,101-117.
  - Sheridan, P., McMahan, G., Hammerstrom, K., Pulich, W. Jr., 1998. Factors affecting restoration of *Halodule wrightii* to Galveston Bay, Texas. *Rest. Ecol.* 6,144–158.
  - Stoner, A. W., 1983. Distribution of fishes in seagrass meadows: role of macrophyte biomass and species composition. *Fish. Bull.* 81 (4), 837-846.
  - Terrados, J., 1991. Crecimiento y producción de las praderas de macrófitos del Mar Menor, Murcia. Tesis de Doctorado, Univ. de Murcia, 229 pp.
  - Terrados, J., 1993. Sexual reproduction and seed banks of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson meadows on the Southeast Mediterranean coast of Spain. *Aquat. Bot.* 46(3-4), 293-299.
  - Terrados, J., 1995. Effects of some plant growth regulators on the growth of the seagrass *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. *Aquat. Bot.* 51(3), 311-318(8).
  - Thorhaug, A. 1983. Habitat restoration after pipeline construction in a tropical estuary: seagrasses. *Mar. Poll. Bull.* 14, 422-425.
  - Thorhaug, A., 1985. Large-scale seagrass restoration in a damaged estuary. *Mar. Poll. Bull.* 16, 55-62.

- Van Montfrans, J., Wetzel, R.L., Orth, R.J., 1984. Epiphyte-grazer relationships in seagrass meadows: consequences for seagrass growth and production. *Estuaries*. 4A, 289-309.
- Watanabe, Y., Terawaki, T., 1986. Development of techniques for marine macrophyte bed creation in the coastal zone near a power plant: 6. Assessment of a transplanting method to prevent the eelgrass (*Zostera marina* L.) from being washed away. *Denryoku Chuo Kenkyusho Hokoku* (U86008), 1-16.
- Watanabe, Y., Terawaki, T., et al., 1986. On the growth of eelgrass (*Zostera marina* L.) after transplanting: The influence of the seedling age and nutrient condition of the substrate. *Denryoku Chuo Kenkyusho Hokoku* (486004), 1-19.
- Wildpret, W., Gil-Rodríguez, M. C., Afonso-Carrillo, J., 1987. Cartografía de los campos de algas y fanerógamas marinas del piso infralitoral del Archipiélago Canario. Consejería de Agricultura y Pesca, Gobierno de Canarias, Santa Cruz de Tenerife.
- Wilson, J.G., Bennett, I.J. In vitro propagation of western Australian seagrasses. *Altweb- In vitro Animal Journal*.

